

Sorafenib, eine neue *Targeting*-Option für
Kopf-Hals-Tumoren: Untersuchung zellulärer
Effekte und molekularer Mechanismen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Lisa Gleißner

Hamburg, 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

2. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Tag der Disputation: 3. November 2017

Die Dissertation wurde zwischen April 2013 und April 2017 im Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Anleitung von Prof. Dr. Ekkehard Dikomey durchgeführt.

Zusammenfassung

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs stellen die sechsthäufigste maligne Tumorentität weltweit dar. Allein in Deutschland erkranken jährlich ca. 17.000 Personen an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (englisch: *head and neck squamous cell carcinomas*; HNSCC). Diese Patienten erfahren eine sehr intensive Therapie bestehend aus Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie mit allerdings einer 5-Jahresüberlebensrate von nur 50 %. Trotz vieler Bemühungen konnte in den letzten Jahrzehnten diese Heilungsrate nicht weiter gesteigert werden. Aufgrund dieser schlechten Prognose, insbesondere der humanen Papillomvirus-negativen HNSCC und der unter Therapie entstehenden zum Teil schweren Nebenwirkungen, sind neue Therapieansätze erforderlich, um das Überleben der Patienten weiter zu verbessern. Von großem Interesse sind diesbezüglich vor allem Konzepte, bei denen gezielt das zelluläre *Signaling* der Tumorzellen als Angriffspunkt genutzt wird, um dadurch die Wirkung der Strahlentherapie zu steigern.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit der Multikinaseinhibitor Sorafenib die zellulären Prozesse in HNSCC beeinflussen und für eine gezielte Strahlensensibilisierung genutzt werden kann, da für andere Tumorentitäten bereits eine anti-tumorigene sowie auch strahlensensitivierende Wirkung beschrieben wurde. Diese Untersuchungen wurden an einer großen Zahl an HNSCC-Zelllinien durchgeführt, um durch systematische Vergleiche auch den bisher noch unbekanntem molekularen Mechanismus für diese Strahlensensibilisierung aufzudecken.

- Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sorafenib eine strahlensensitivierende Wirkung für einige aber nicht für alle HNSCC-Zelllinien hat (*Sorafenib-Responder*), wobei sich aber vor allem strahlenresistente HNSCC-Zelllinien unter den *Responder*-Linien befanden. Bei alleiniger Behandlung der Zellen mit Sorafenib konnte eine ausgeprägte Inhibition der Proliferation und eine starke Zellinaktivierung sowohl in den sensitivierbaren *Responder*- als auch in den nicht sensitivierbaren *Non-Responder*-Zelllinien beobachtet werden.
- Es wird gezeigt, dass die Strahlensensitivierung nicht durch eine verstärkte Apoptose-Induktion oder frühe permanente Zellzyklusarreste verursacht wird.
- Ursache für die Strahlensensitivierung ist eine unterdrückte DNA-DSB-Reparatur in den *Responder*-Zelllinien nach Bestrahlung, die nicht in den *Non-Responder*-Zelllinien beobachtet wird. Diese Unterdrückung kann auf eine Inhibition der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) zurückgeführt werden, welches der zentrale DNA-DSB-Reparaturweg in Säugerzellen ist. Andere Reparaturwege wie die Homologe Rekombination oder die Alternative Endverknüpfung werden dagegen nicht durch Sorafenib beeinträchtigt. Die Ergebnisse deuten zudem an, dass die Inhibition

des NHEJ auf einer unterdrückten Phosphorylierung eines Schlüsselproteins des NHEJ, der DNA-PKcs an der Stelle T2609, beruht.

- In weiteren Experimenten wurde untersucht, welche *upstream*-Kinasen durch Sorafenib inhibiert werden und damit für die beobachteten Effekte auf die Proliferation, Zellinaktivierung sowie Strahlensensitivierung verantwortlich sind. Erstaunlicherweise konnte für die untersuchten HNSCC-Zelllinien in keiner der bekannten Zielkinasen von Sorafenib wie Raf-1, PDGFR- β , VEGFR-2, Flt-3, Src, bzw. dem Transkriptionsfaktor STAT3 eine signifikante Inhibition beobachtet werden. Allein für den Ras/Raf/MAPK-Signalweg wurde eine deutliche Inhibition zumindest in einer *Responder*-Linie gefunden, die aber nicht für die Strahlensensitivierung verantwortlich ist.
- Um weitere bisher unbekannt *Targets* von Sorafenib zu identifizieren, wurden explorative Ansätze eingesetzt und die Signaltransduktion mit dem *Tyrosine kinase PamChip*[®]-Array umfassend bestimmt. Dabei wurde für die HNSCC-Zelllinien eine starke Heterogenität bezüglich der Kinaseaktivität nach Sorafenib-Behandlung beobachtet. Hierbei konnten mit c-Met und EphA1 zwei neue potentielle Zielkinasen von Sorafenib identifiziert werden. Diese beiden Kinasen sind vermutlich nicht für die beobachtete Strahlensensibilisierung nach Sorafenib-Behandlung verantwortlich. Die Rolle dieser Rezeptoren für die Sorafenib-vermittelten zellulären Effekte muss in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden.

Insgesamt sind die in dieser Arbeit erlangten Kenntnisse für das molekulare *Targeting* bei HNSCC von großer Relevanz. So zeigen sie, dass Sorafenib für bestimmte HNSCC für eine gezielte Strahlensensitivierung eingesetzt werden könnte. Die Arbeiten demonstrieren zudem, dass die Inhibition der DNA-DSB-Reparatur der entscheidende Mechanismus für die Strahlensensitivierung ist, was letztendlich die effektive Wirkung von Sorafenib in Kombination mit einer Röntgenbestrahlung erklärt. Darüber hinaus unterstreichen die Ergebnisse aber auch die ausgeprägte Heterogenität von HNSCC, welche die Identifizierung der genauen Zielstrukturen (Biomarker) für den individuellen Einsatz bestimmter Substanzen (personalisierte Therapie) für eine erfolgreiche Therapie unerlässlich machen.

Summary

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are the sixth most malignant tumor entity in the world. In Germany, 17.000 new cases of HNSCC are reported every year. HNSCC patients are intensely treated with surgery, chemotherapy and radiotherapy but still have a poor five-year overall survival of approximately 50 %. Despite many efforts no significant improvement in treatment outcomes has been achieved in the last decades. The poor prognosis, especially for patients with human papilloma virus-negative HNSCC, and the high risk of treatment-associated severe side effects require new strategies to improve patient survival. Molecular strategies targeting tumor cell signaling to enhance radiotherapy efficacy are of great interest in this context.

This project investigated to what extent the multi-kinase inhibitor sorafenib can affect the cellular processes in HNSCC and furthermore can be used for targeted radiosensitization, as it has already been shown to exhibit anti-tumorigenic as well as radiosensitizing effects in other tumor entities. These studies were performed with a large number of HNSCC cell lines to unveil, by systematic comparisons, the so far unknown molecular mechanisms for the radiosensitization.

- This work shows that sorafenib radiosensitizes several but not all HNSCC cell lines (sorafenib responders), including especially the more radioresistant lines. Furthermore, treatment with sorafenib alone strongly inhibited proliferation and caused cell inactivation in both responder and non-responder cell lines (which are not radiosensitized by sorafenib).
- It is shown that the observed radiosensitization was not caused by enhanced induction of apoptosis or early permanent cell cycle arrest.
- Instead the observed radiosensitization is caused by impaired repair of radiation-induced DNA double strand breaks (DSB) in responders that is not observed in non-responder cell lines. This repression is linked to an inhibition of non-homologous end-joining (NHEJ), a major DNA DSB repair mechanism in mammalian cells. Other repair mechanisms such as homologous recombination or alternative end-joining were not affected by sorafenib. The results also suggest that the inhibition of NHEJ by sorafenib is driven by impaired phosphorylation of the key NHEJ protein, the DNA-PKcs, at T2609.
- Further experiments aimed to determine which upstream kinases are inhibited by sorafenib and could be responsible for the observed effects on proliferation, cell inactivation or radiosensitization. Surprisingly, the tested HNSCC cell lines failed to show any significant inhibition of the already known target kinases of sorafenib, namely Raf-1, PDGFR- β , VEGFR-2, Flt-3, Src and the transcription factor STAT3. However, a distinct inhibition in the Ras/Raf/MAPK signaling pathway was found in one responder cell line but this was not responsible for the radiosensitization.
- To identify so far unknown targets of sorafenib exploratory approaches were used and the signaling transduction of HNSCC extensively analyzed with the tyrosine kinase PamChip® array. Strongly heterogeneous kinase activities were observed in sorafenib-treated HNSCC cell lines. Even so, two

new potential targets of sorafenib, c-Met and EphA1, were identified which, however, are probably not responsible for the observed radiosensitization. The role of these receptors in sorafenib-induced cellular effects has to be investigated in future experiments.

Altogether the results of this project are of great importance for the molecular targeting of HNSCC. It could be shown that sorafenib might be used for targeted radiosensitization in specific HNSCC. Furthermore, the inhibition of DNA DSB repair is the determining mechanism for the radiosensitization that finally explains the effectivity of sorafenib in combination with ionizing radiation. Beyond that, these results underline the distinct heterogeneity among HNSCC. Consequently, the identification of the exact targeted structures (biomarkers) is essential for individual applications of specific drugs, especially with regard to a personalized therapy.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Krebserkrankungen	1
1.2 Kopf-Hals-Tumoren	1
1.2.1 Molekulare Pathologie HPV-negativer Kopf-Hals-Tumoren.....	2
1.2.2 Therapie.....	3
1.3 Strahlentherapie und DNA-Reparatur	4
1.3.1 Wirkung von ionisierender Strahlung	4
1.3.2 Erkennung von strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen.....	5
1.3.3 Primäre Apoptose	5
1.3.4 Primäre Zellzyklusarreste.....	5
1.3.5 Reparatur von strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen.....	6
1.3.6 Regulation der DNA-Reparatur durch die Signaltransduktion.....	8
1.4 Molekulares <i>Targeting</i>	9
1.5 Sorafenib	13
2 Ziel der Arbeit	17
3 Materialien	19
3.1 Zelllinien	19
3.2 Antikörper	19
3.2.1 Primäre Antikörper.....	19
3.2.2 Sekundäre Antikörper.....	21
3.3 Kits	21
3.4 Reagenzien und Medien für die Zellkultur.....	22
3.5 Chemikalien und Reagenzien	22
3.6 Puffer und Lösungen	23
3.7 Verbrauchsmaterialien.....	25
3.8 Geräte und Hilfsmittel	26
3.9 Software	27
4 Methoden	29
4.1 Zellbiologische Methoden	29
4.1.1 Zellkultivierung	29
4.1.2 Zellzahlbestimmung	29

4.1.3	Bestimmung des Zellwachstums	29
4.1.4	Analyse des Zellüberlebens mittels Koloniebildungstest	30
4.1.5	Bestrahlung von Zellen	30
4.2	Durchflusszytometrische Methoden	30
4.2.1	Analyse der Zellzyklusverteilung durch Propidiumiodid-Färbung	30
4.2.2	Nachweis eines Zellzyklusarrests	31
4.2.3	Nachweis von apoptotischen Zellen	31
4.2.4	Nachweis von PARylierung	32
4.3	Proteinchemische Methoden	33
4.3.1	Nachweis von residuellen γ H2AX/53BP1 Reparaturkomplexen	33
4.3.2	Herstellung von Ganzzelllysaten	33
4.3.2.1	SDS-Ganzzelllysate	33
4.3.2.2	Ganzzelllysate für <i>PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array</i>	34
4.3.2.3	Ganzzelllysate für <i>Tyrosine Kinase PamChip®Array</i>	34
4.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
4.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
4.3.5	Western Blot	35
4.3.6	Analyse von Phosphoproteinen mittels <i>PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array</i>	36
4.3.7	Analyse der Tyrosinkinaseaktivität mittels <i>Tyrosine Kinase PamChip®Array</i>	37
4.4	Molekularbiologische Methoden	39
4.4.1	Analyse von Chromosomen-Aberrationen	39
4.4.1.1	Analyse von Chromosomen mittels Metaphasen	39
4.4.1.2	Analyse von Chromosomen mittels <i>Premature Chromosome Condensation</i>	39
4.4.1.3	Chromosomen-Präparation	39
4.4.2	Analyse der DNA-Reparaturkapazität mittels Gelelektrophorese	40
4.4.2.1	Konstant-Feld-Gelelektrophorese	40
4.4.2.2	Puls-Feld-Gelelektrophorese	41
4.5	Auswertung und Statistik	41
5	Ergebnisse	43
5.1	Wirkung von Sorafenib auf HNSCC-Zelllinien	43
5.1.1	Proliferation	43
5.1.2	Zellinaktivierung	45
5.2	Einfluss von Sorafenib auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit	46
5.3	Mechanismus der Sorafenib-induzierten Strahlensensibilisierung	48
5.3.1	Auswirkung von Sorafenib auf die Apoptoserate	49
5.3.2	Auswirkung von Sorafenib auf den Zellzyklus	50
5.3.3	Auswirkung von Sorafenib auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	53
5.3.3.1	Chromosomen-Aberration	53
5.3.3.2	<i>Premature Chromosome Condensation</i>	55
5.3.3.3	Residuelle Reparaturkomplexe	55
5.3.3.4	Konstant-Feld-Gelelektrophorese	57
5.3.3.5	Puls-Feld-Gelelektrophorese	59
5.3.4	Analyse der DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturwege	62

5.3.4.1	Homologe Rekombination.....	62
5.3.4.2	Alternative Endverknüpfung	63
5.3.4.3	Nicht-homologe Endverknüpfung	64
5.4	Identifizierung der Zielkinasen von Sorafenib in HNSCC-Zelllinien.....	67
5.4.1	Untersuchung bekannter Zielkinasen von Sorafenib.....	67
5.4.2	Identifizierung potentieller Sorafenib-Targets	70
5.4.2.1	<i>PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array</i>	70
5.4.2.2	<i>Tyrosine Kinase PamChip®Array</i>	73
6	Diskussion	81
6.1	Wirkung von Sorafenib auf HNSCC-Zelllinien	82
6.2	Strahlensensibilisierung durch Sorafenib	82
6.3	Inhibition der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur als Ursache für die Strahlensensibilisierung durch Sorafenib	84
6.4	Wirkung von Sorafenib auf das Signaling von Kopf-Hals-Tumorzelllinien.....	88
6.5	Zusammenfassung	91
6.6	Ausblick	91
7	Literaturverzeichnis.....	93
8	Abbildungsverzeichnis	101
9	Tabellenverzeichnis	103
10	Abkürzungsverzeichnis.....	105
11	Publikationen.....	109
12	Danksagung.....	111
13	Eidesstattliche Erklärung	113

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Aktuell gehört Krebs mit ca. einer halben Million Neuerkrankungen pro Jahr zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland und stellt die zweithäufigste Todesursache dar [1, 2]. Im Verlauf des Lebens erkrankt jeder zweite Mann (51 %) und zwei von fünf Frauen (43 %) an Krebs. Mit den heutigen Behandlungsoptionen wie Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie wird eine relative 5-Jahresüberlebensrate von ca. 60 % erreicht. Das Risiko an Krebs zu erkranken nimmt mit dem Alter zu. Aufgrund der hohen Lebenserwartung wird die Bevölkerung immer älter, sodass die Anzahl der Krebsneuerkrankungen kontinuierlich ansteigt [1]. Die Krebsentstehung ist dabei auf die molekularen Veränderungen einer Normalgewebszelle zurückzuführen. Unter dem Begriff „*The Hallmarks of cancer*“ von Hanahan und Weinberg wurden zehn tumorfördernde molekulare Charakteristika zusammengefasst, wie zum Beispiel die Umgehung der Apoptose, die Aufrechterhaltung der Proliferationsfähigkeit und der Erwerb von Mutationen und der damit einhergehenden genomischen Instabilität [3]. Für die resultierende Entartung der Normalgewebszelle müssen nicht alle Charakteristika zutreffen, aber besonders solide Tumoren werden durch diese charakteristischen *Hallmarks* ausgezeichnet. Die Komplexität der Tumorentstehung und die damit einhergehenden molekularen Eigenschaften von Tumoren wirken dabei der Tumorheilung häufig entgegen.

1.2 Kopf-Hals-Tumoren

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs gehören zu den sechsthäufigsten Tumorerkrankungen weltweit, mit mehr als 500.000 Neuerkrankungen und mehr als 300.000 Sterbefällen jährlich [4]. Allein in Deutschland erkranken jedes Jahr ca. 17.000 Personen an Kopf-Hals-Tumoren [1]. Diese maligne Tumorentität betrifft zu 90 % das Plattenepithel und wird daher auch Plattenepithelkarzinom (engl. *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) genannt. Besonders im Bereich der Mundhöhle, der Nasenhöhle mit Nasennebenhöhlen, Rachenhöhle (Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx) und dem Kehlkopf manifestieren sich die Kopf-Hals-Tumoren. Dabei hängt der Entstehungsort der Tumoren stark von den jeweiligen Risikofaktoren ab. So kann durch die Hauptrisikofaktoren Tabak- oder Alkoholkonsum nahezu der gesamte Kopf-Hals-Bereich betroffen sein. Werden beide Noxen kombiniert, kann das Risiko für eine Karzinogenese weiter steigen [5]. Weitere Risikofaktoren sind eine unzureichende Mundhygiene, chronisch mechanische Traumen, berufliche Exposition zu Stäuben (z.B. Asbest, Holz, Chemikalien), ein geschwächtes Immunsystem sowie Sonnenexposition. Ein weiterer wichtiger Risikofaktor kann eine humane Papillomvirus (HPV)-Infektion sein, vor allem im Falle vom Oropharynx-Karzinom [6]. Besonders die Hochrisikostämme HPV-16 und 18 werden mit der

Tumorbildung in Verbindung gebracht. Die HPV-positiven HNSCC-Patienten zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine deutlich bessere Prognose haben als Patienten mit HPV-negativen Tumoren. Neben einem geringeren Alter und damit meist einhergehenden besseren gesundheitlichen Verfassung haben HPV-positive Patienten zudem ein geringeren Alkohol- und Tabakkonsum [7]. Während die Karzinogenese der HPV-negativen Tumoren durch eine Vielzahl von molekularpathologischen Veränderungen gekennzeichnet ist, zeichnen sich HPV-positive Tumoren durch weniger Mutationen aus. Diese genetischen Veränderungen umfassen Mutationen, chromosomale Translokationen, Amplifikationen oder Überexpressionen, die sich auf die Funktion regulatorischer Proteine im Bereich der Proliferation, des Zellzyklus, der Angiogenese und der Apoptose auswirken können [8].

1.2.1 Molekulare Pathologie HPV-negativer Kopf-Hals-Tumoren

Die molekularpathologischen Veränderungen der HPV-negativen HNSCC betreffen zumeist Membranrezeptoren, zelluläre Signalwege oder Transkriptionsfaktoren. Ein in diesem Zusammenhang sehr bedeutendes Protein ist der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), der in HNSCC amplifiziert und überexprimiert ist [9]. Der EGFR reguliert zahlreiche *downstream*-Signalwege, wie die PI3K/Akt/mTOR, Ras/Raf/MAPK, PLC γ /PKC und JAK/STAT-Signalwege, die einen Einfluss auf Proliferation, Zellzyklus, Apoptose, DNA-Reparatur, Transkription, Invasion und Metastasierung haben (PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase; Akt - Proteinkinase B; mTOR - engl. *mechanistic Target of Rapamycin*; Ras - *Rat sarcoma* Protein; Raf - zelluläre Variante des *virus-induced rapidly accelerated fibrosarcoma proteins*; MAPK - engl. *mitogen-activated protein kinase*; PLC γ - Phospholipase C γ ; PKC - Proteinkinase C; JAK - Januskinase; STAT - engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*; DNA - engl. *deoxyribonucleic acid*) [10]. Insbesondere Amplifikationen oder konstitutiv aktivierende Mutationen des EGFR gelten als Ursache für die Entwicklung von HNSCC und gehen zudem mit einer schlechten Prognose einher [11, 12].

Neben dem EGFR werden auch weiteren Rezeptortyrosinkinasen, wie der c-Met-Rezeptor (engl. *hepatocyte growth factor receptor*) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR), eine wichtige Bedeutung bei der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren zugeschrieben [13, 14]. Eine Stimulation dieser Rezeptoren kann durch aktivierende Mutationen am Rezeptor selbst, aber auch durch Überexpression der Liganden induziert werden. Ein erhöhtes Vorkommen des c-Met Liganden, hepatozytärer Wachstumsfaktor (engl. *hepatocyte growth factor*, HGF), fördert Proliferation, Invasion und Metastasierung und trägt zudem zur Angiogenese bei [15]. Letzteres wird auch durch den VEGFR-Liganden VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) angeregt und begünstigt die Vaskularisierung und Metastasierung von Kopf-Hals-Tumoren [16].

Weitere molekularpathologische Veränderungen, die zur Entstehung von HNSCC beitragen, können verschiedene *downstream*-Signalwege betreffen. Eine Überexpression von KRas (45 % in HNSCC) des

Ras/Raf/MAPK-Signalwegs oder aktivierende Mutationen von PIK3CA (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*, 10-20 %) des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs sind nur einige Beispiele für eine Aktivierung von Signalwegen, die zu einer gesteigerten Proliferationsfähigkeit bzw. verminderten Apoptose führen und damit die Tumorentstehung fördern [17-19]. Die Phosphatase PTEN (engl. *Phosphatase and Tensin homolog*) kann durch inaktivierende Mutationen oder heterozygote Deletionen in 10 % der HNSCC die Regulation des aktivierten PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs nicht mehr gewährleisten, wodurch die Tumorzellen ebenfalls eine gesteigerte Proliferation und verminderte Apoptose-Induktion zeigen [20-22].

Des Weiteren können auch Transkriptionsfaktoren zur Karzinogenese beitragen. So steigert der konstitutiv aktive STAT3 des JAK/STAT-Signalwegs die Transkription von Genen, die die Proliferation und das Überleben von Kopf-Hals-Tumoren fördern [23].

Zudem ist p53 mit über 50 % das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen in HNSCC [24]. Mit dem Verlust der p53-Funktion wird bereits früh in der Tumorgenese die Checkpoint-Kontrolle der G1-Zellzyklusphase ausgeschaltet und damit ein unkontrolliertes Zellwachstum gefördert. Zudem geht der Verlust von p53 mit einer deutlichen Reduktion der Apoptose-Induktion einher [25].

Obwohl in den HPV-negativen HNSCC deutlich mehr molekularpathologische Veränderungen vorkommen, zeigen die HPV-positiven Tumoren ebenfalls Mutationen z.B. in der Isoform HRas oder PIK3CA, die z.B. die Proliferation vorantreiben [26]. Dennoch beruht die Karzinogenese besonders auf der Degradation des p53-Proteins durch das HPV-Onkogen E6 bzw. auf die Inhibition des Retinoblastom Proteins durch das HPV-Onkogen E7, wodurch der Übergang von der G1- in die S-Phase und damit die Proliferation gefördert wird [27].

1.2.2 Therapie

Ungeachtet der großen genetischen Heterogenität und des HPV-Status, umfasst die derzeitige Therapiestrategie zur kurativen Behandlung von HNSCC die Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Während HNSCC im Frühstadium (WHO-Klassifikation Grad I-II) oftmals mit einer unimodalen Therapie behandelt werden (Chirurgie und/ oder Strahlentherapie), werden fortgeschrittene Kopf-Hals-Tumoren (WHO-Klassifikation Grad III-IV) zumeist mit einer multimodalen Therapie behandelt (Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie) [28]. Seit einigen Jahren steht zudem die gezielte Inhibition des EGFR mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Cetuximab (Erbixim®, Merck KGaA) als Option für das molekulare *Targeting* zur Verfügung (siehe Abschnitt 1.4) [29]. Trotz der stetigen Verbesserung der Behandlungsstrategien kann bei diesen Tumorpatienten ein sehr hohes Therapieversagen beobachtet werden, das sich in den seit Jahrzehnten unveränderten schlechten 5-Jahresüberleben von ca. 50 % widerspiegelt [5, 30, 31]. Zudem ergeben sich häufig unter Therapie zum Teil schwere Nebenwirkungen, wie Organ- bzw. Organfunktionsverlust nach Operation, Nierenschäden durch Cisplatin sowie Gewebsfibrosen, Gefäßstenosen und Mukositis durch die Strahlentherapie [32-35]. Angesichts des begrenzten Therapieerfolgs, der starken Nebenwirkungen und

des schlechten Allgemeinzustandes der HPV-negativen HNSCC-Patienten kann in vielen Fällen die maximale Therapieintensität nicht erreicht werden [32]. Um dennoch die Heilungsrate vor allem der HPV-negativen HNSCC-Patienten zu verbessern, ohne jedoch die limitierenden Nebenwirkungen zu erhöhen, werden aktuell neue molekulare *Targeting*-Ansätze intensiv untersucht.

1.3 Strahlentherapie und DNA-Reparatur

Die Strahlentherapie ist neben Chirurgie und Chemotherapie eine der drei Hauptsäulen der Therapie von HNSCC. Das Ziel der Strahlentherapie ist die Abtötung aller Tumorzellen, um eine Rezidivbildung des Tumors zu verhindern. Hierbei spielt die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen eine große Rolle. Gerade bei strahlenresistenten Tumorzellen ist der Erfolg der Strahlentherapie dadurch limitiert, dass die Strahlendosis durch akute und späte Normalgewebsschäden beschränkt wird [36].

1.3.1 Wirkung von ionisierender Strahlung

Das Ziel der Strahlentherapie ist die Inaktivierung von Tumorzellen mit Hilfe von ionisierender Strahlung, wie z.B. Röntgenstrahlung. Die ionisierende Strahlung führt zu direkten und indirekten DNA-Schäden. Unter einer direkten Schädigung wird die Ionisierung von Atomen der DNA verstanden, die jedoch den kleineren Teil der induzierten DNA-Schäden bilden. Die hauptsächlichlichen DNA-Schäden sind indirekte Schäden durch hochreaktive freie Radikale, die durch Radiolyse des Wassers entstehen. Bereits bei 1 Gy Strahlendosis werden ca. 2000 Basenschäden, 1000 Einzelstrangbrüche und 20-40 DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) generiert [36]. Um den Verlust von genetischer Information durch DNA-Schäden zu vermeiden, entwickelten die Zellen Reparaturmechanismen. So werden strahlungsinduzierte Basenschäden sowie Einzelstrangbrüche in der Regel durch die Basenexzisionsreparatur repariert, wobei für diesen Reparaturweg der zweite DNA-Strang als Matrize für eine fehlerfreie Reparatur zur Verfügung steht. Hingegen ist die Reparatur von DSB deutlich komplexer, da die Matrize für eine fehlerfreie Reparatur nicht gegeben ist. Deshalb haben die DSB, wenngleich sie in geringerer Anzahl generiert werden, die größere Bedeutung für das Überleben der Zellen nach ionisierender Strahlung [36].

Direkt nach Induktion des DNA-Schadens wird die DNA-Schadensantwort ausgelöst. Diese prozessiert die DNA um den DSB herum und aktiviert Signalkaskaden, die die Reparatur der DSB einleitet (siehe Abschnitt 1.3.2). Nicht reparierte DSB können zu chromosomalen Aberrationen und damit zu einer Inaktivierung der Tumorzelle durch den mitotischen Zelltod führen. Neben dem mitotischen Zelltod kann eine Inaktivierung der Tumorzelle auch durch Induktion der primären Apoptose bzw. durch die Aktivierung von Zellzyklusarresten eingeleitet werden [36]. Diese Prozesse werden in den nachfolgenden Abschnitten näher erklärt.

1.3.2 Erkennung von strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen

Humane Zellen reagieren unmittelbar nach DNA-Schadensinduktion mit der Aktivierung der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR). Im Rahmen der DDR werden Signalkaskaden aktiviert, die die Apoptose induzieren (siehe Abschnitt 1.3.3) und Zellzyklusarreste aktivieren (siehe Abschnitt 1.3.4). Zudem kann die DDR DSB erkennen, markieren und Reparaturproteine rekrutieren, sodass die DNA-DSB-Reparatur eingeleitet wird (siehe Abschnitt 1.3.5).

Zu Beginn der DDR werden die DSB mit Hilfe des MRN-Komplex, bestehend aus MRE11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 (*DNA repair protein 50*) und NBS1 (*Nijmegen breakage syndrom 1*) erkannt und eines der ersten Schlüsselproteine, die Proteinkinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) rekrutiert [37, 38]. Daraufhin findet die Autophosphorylierung von ATM statt, infolgedessen das Histon 2AX phosphoryliert wird [39, 40]. Die Phosphorylierung von H2AX (γ H2AX) erfolgt im Umfeld von mehreren Megabasenpaare um den DSB, wodurch die DNA-Struktur aufgelockert und die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen ermöglicht wird. Eines der ersten DNA-Reparaturproteine ist 53BP1 (p53-bindendes Protein 1) [41]. Durch diese zentralen Schritte kann die Detektion von γ H2AX und 53BP1 als Marker für strahleninduzierte DSB genutzt und durch Fluoreszenz-markierte Antikörper am Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden [42].

1.3.3 Primäre Apoptose

Ionisierende Strahlung kann in humanen Zellen zu einer primären Apoptose führen. Dieser programmierte Zelltod tritt innerhalb weniger Stunden auf und findet vor allem vor dem Erreichen der ersten Mitose statt. Von einer sekundären Apoptose wird gesprochen, wenn z.B. in Folge mangelhafter DNA-Reparatur, also nach der ersten Mitose, die Apoptose ausgelöst wird. Obwohl die strahlungsinduzierte Apoptose durch verschiedene initiale Signalwege ausgelöst werden kann, ist sie durch die Aktivierung von Caspasen und Nukleasen gekennzeichnet. Die strahlungsinduzierten DNA-Schäden führen zur Aktivierung von p53. Dadurch werden pro-apoptotische Proteine aktiviert, anti-apoptotische Proteine inhibiert und infolgedessen die Aktivierung der Caspasen eingeleitet. Da zahlreiche solide Tumoren p53-mutiert oder defizient sind, ist die primäre Apoptose nach Röntgenbestrahlung häufig schwach ausgeprägt [36].

1.3.4 Primäre Zellzyklusarreste

Strahlungsinduzierte DNA-Schäden können in humanen Zellen verschiedene Zellzyklusarreste hervorrufen. Diese Zellzyklusarreste können sowohl transient als auch permanent sein. Während transiente Arreste wahrscheinlich durch die DDR induziert werden, damit ausreichend Zeit für die DNA-Reparatur gewährt wird, haben Zellen mit einem permanenten Arrest die Fähigkeit zur Proliferation vollständig verloren. Weiterhin werden primäre als auch sekundäre permanente Arreste beschrieben, die entweder vor dem Erreichen der ersten Mitose (primär) oder infolge von mangelhafter

DNA-Reparatur (Chromosomen-Aberrationen) nach der ersten Mitose (sekundär) verursacht werden. Ein primärer permanenter G1-Arrest kann auf eine p53-Aktivität zurückgeführt werden. Zu diesem G1-Arrest sind p53-defiziente Tumorzellen jedoch nicht fähig, wodurch G2-Zellzyklusarreste in den Vordergrund treten [36].

1.3.5 Reparatur von strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen

Die Reparatur von strahlungsinduzierten DSB stellt die größte Herausforderung für humane Zellen dar, da bei fehlerhaften bzw. unreparierten DNA-Schäden Mutationen bzw. Chromosomen-Aberrationen entstehen können. Infolge dieser genetischen Veränderungen werden essentielle Proteine und damit lebenswichtige biologische Prozesse inaktiviert, die sich wiederum auf die Zellteilung auswirken und somit die Inaktivierung der Zelle zur Folge haben können [36]. Sowohl Normalgewebszellen als auch Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt um DNA-DSB zu reparieren. Die Möglichkeit diese DNA-DSB zu reparieren, wirkt sich direkt auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit und damit auf das Ansprechen der Strahlentherapie aus [36].

Die Reparatur der DSB wird durch verschiedene Reparaturwege in humanen Zellen durchgeführt. Die Wahl der Reparaturwege ist hierbei abhängig von den Umständen der Entstehung des DSB. So wird einer der beiden Hauptreparaturwege, die Homologe Rekombination (HR), in der S- bzw. G2-Phase des Zellzyklus aktiv. Hingegen kann der zweite Hauptreparaturweg, die Nicht-homologe Endverknüpfung (engl. *non-homologous end-joining*, NHEJ), prinzipiell in allen Zellzyklusphasen aktiv sein [43]. Deshalb und aufgrund, dass die Schlüsselproteine des NHEJ, die Ku-Proteine, eine hohe Bindungskapazität zu den DSB-Enden haben, werden bis zu 80 % der strahlungsinduzierten DSB durch das NHEJ repariert. Bei Inaktivierung oder dem Verlust der Schlüsselproteine nimmt die Reparaturkapazität des NHEJ ab und es kommt zu einer ausgeprägten Strahlenempfindlichkeit [36]. Neben dem NHEJ werden zwei weitere Reparaturwege, die alternative Endverknüpfung (engl. *alternative end-joining*, Alt-EJ) und das *single-strand annealing* (SSA) beschrieben, die ebenfalls in allen Zellzyklusphasen funktionstüchtig, jedoch fehleranfälliger sind. Die vier Reparaturwege sind in Abbildung 1.1 dargestellt und werden im Folgenden kurz beschrieben.

Das NHEJ benötigt für die Reparatur von DNA-DSB keine Sequenzhomologien, wodurch dieser Reparaturweg, insbesondere bei komplexen DSB, fehlerbehaftet sein kann und unter anderem zu chromosomalen Aberrationen führen kann [44]. Obwohl das NHEJ in allen Zellzyklusphasen aktiv ist, erlangt es besondere Bedeutung während der G1- und frühen S-Phase [45]. Zu Beginn des NHEJ binden die Schlüsselproteine Ku70 und Ku80 mit hoher Affinität an den freien DSB-Enden und bilden so ein Heterodimer [46]. Auf diese Weise sind die DNA-Enden vor Degradation geschützt. Das DNA-gebundene Heterodimer Ku70/Ku80 rekrutiert daraufhin die katalytische Untereinheit der Proteinkinase DNA-PK (DNA-PKcs) und bildet den vollständigen DNA-PK-Proteinkomplex [47]. Infolgedessen werden die beiden DNA-Enden in einer räumlichen Umgebung gehalten. Anschließend wird DNA-PKcs an Serin 2056 und Threonin 2609, zwei für die DNA-DSB-Reparatur wichtige

Phosphorylierungsseiten, autophosphoryliert und eine Konformationsänderung des DNA-PK-Proteinkomplexes eingeleitet. Folglich werden die beiden DSB-Enden für die Ligation frei zugänglich [48, 49]. Bei DSB mit glatten DNA-Enden werden diese direkt verknüpft, bei komplexen DSBprozessiert die Nuklease Artemis die DNA-Enden, bevor diese durch den Proteinkomplex aus DNA-Ligase IV, XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) und XLF (*XRCC4-like factor*) legiert werden (Abbildung 1.1) [50-53].

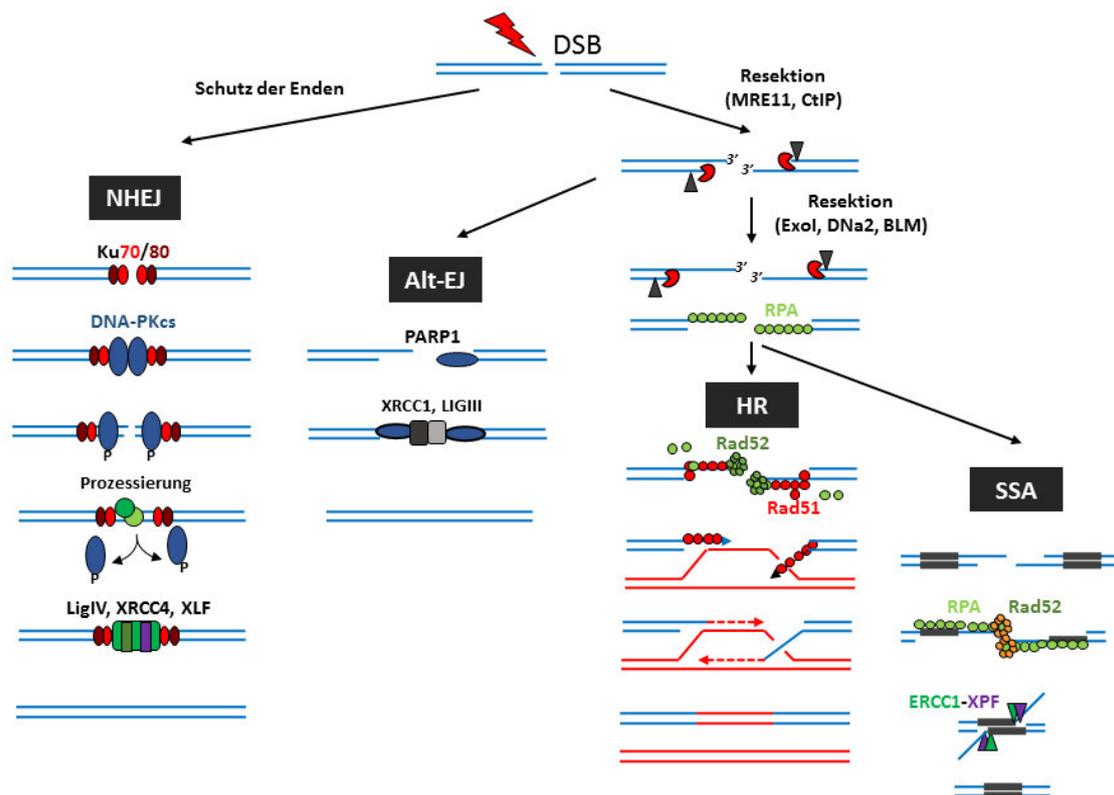


Abbildung 1.1 Strahlungsinduzierte DNA-Doppelstrangbruch Reparaturwege.

Strahlungsinduzierte Doppelstrangbrüche werden direkt durch die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) bzw. nach DNA-Einzelstrangprozessierung durch das *alternative end-joining* (Alt-EJ), die Homologe Rekombination (HR) bzw. das *single-strand annealing* (SSA) repariert. Modifiziert nach Iliakis *et al.*, 2012 [54].

Das Alt-EJ wird auch als PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase)-abhängiges EJ bezeichnet. Obwohl dieser Reparaturweg in der Regel nur eine untergeordnete Rolle bei der DNA-DSB-Reparatur spielt, zeigen Tumoren häufig ein verstärktes Alt-EJ [55-57]. Das Alt-EJ orientiert sich an kurzen Mikrohomologien auf der einzelsträngigen DNA (engl. *single-stranded DNA*, ssDNA), wodurch überlappende DNA-Sequenzen verloren gehen können [54, 58, 59]. Der Ablauf des Alt-EJ ist mit der Simplizität des NHEJ vergleichbar. Nach Resektion der DNA-Enden bindet das Reparaturprotein PARP1 an die ssDNA-Enden. Dort dient es als Plattform zur Rekrutierung der Reparaturproteine DNA-Ligase III und XRCC1, die den DSB ligieren (Abbildung 1.1) [60, 61].

Der zweite Hauptreparaturweg, die HR, benötigt für die DSB-Reparatur Sequenzhomologien vom Schwesterchromatid, wodurch die Aktivität der HR auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus beschränkt

ist [43]. Mit dem Schwesterchromatid als *Template* wird eine fehlerfreie Reparatur der DSB gewährleistet. Die Erkennung des DSB erfolgt durch die DDR-Proteine des MRN-Komplexes und ATM (siehe Abschnitt 1.3.2). Anschließend werden Proteine für die notwendige Prozessierung rekrutiert und die DSB-Enden reseziert, um ssDNA zu bilden [62]. Diese ssDNA wird direkt mit RPA (*replication protein A*) beladen, damit die Degradation der ssDNA durch Nukleasen oder die Ausbildung von Sekundärstrukturen unterbunden wird. Anschließend wird RPA durch Rad51 verdrängt und formt ein Nukleoproteinfilament [62]. Mit diesem Nukleoproteinfilament findet die Suche nach Sequenzhomologien im Schwesterchromatid statt, was zur Invasion der ssDNA in die geeignete doppelsträngige DNA führt. Daraufhin wird die DNA-Synthese induziert und nach Erreichen des komplementären DNA-Endes wird die neusynthetisierte DNA gelöst und kann anschließend mit dem zweiten Ende des DSB ligiert werden. Letztendlich wird die Lücke auf dem komplementären Strang des ursprünglichen DSB aufgefüllt und der verbliebene Schnitt verknüpft (Abbildung 1.1) [62, 63].

Ein weiterer DNA-Reparaturweg, das SSA, spielt bei der Reparatur von DSB eher eine untergeordnete Rolle. Es findet zwischen zwei repetitive DNA-Sequenzen statt. Das SSA ist mit einem deutlichen Verlust von DNA assoziiert, da neben einer repetitiven DNA-Sequenz auch der dazwischen liegende DNA-Bereich verloren geht. Nach einem DSB werden die DNA-Enden gebunden und stabilisiert. Anschließend erfolgt die Resektion, wobei die freiwerdende ssDNA durch RPA und Rad52 beladen wird. Daraufhin werden die homologen Sequenzen gesucht und gebunden, die dazwischen liegende DNA und eine repetitive DNA-Sequenz entfernt und die DNA-Enden miteinander verknüpft (Abbildung 1.1) [63].

1.3.6 Regulation der DNA-Reparatur durch die Signaltransduktion

Die Regulation von DNA-Reparaturproteinen nach ionisierender Strahlung erfolgt nicht nur durch die DDR-Schadensantwort, sondern auch über *upstream*-Signalwege. Meyn *et al.* fasste hierfür drei verschiedenen Mechanismen für eine mögliche Regulation der DNA-Reparaturproteine zusammen [64]. Einer der Mechanismen beschreibt die intrazelluläre Verteilung der Reparaturproteine und deren Umverteilung nach ionisierender Strahlung. So wurde durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt, dass der EGFR direkt oder auch indirekt – über *downstream*-Signalwege – eine Translokation von z.B. DNA-PKcs, Ku70 und Ku80 vom Zytoplasma in den Nukleus reguliert [65-67].

Der zweite Mechanismus für die Regulation der DNA-Reparaturproteine beinhaltet die Transkription der Reparaturproteine. Yacoub *et al.* konnten zeigen, dass der MAPK-Signalweg die Expression des DNA-Reparaturproteins XRCC1 einleitet [68]. Zudem reguliert der EGFR über den MAPK-Signalweg die Rad51 Transkription [69].

Der dritte Mechanismus befasst sich mit der direkten Aktivierung der DNA-Reparaturproteine. Ein Großteil der Reparaturproteine sind Phosphoproteine, welche hauptsächlich durch Phosphorylierung aktiviert werden. Toulany *et al.* konnten zeigen, dass der PI3K/Akt-Signalweg die Phosphorylierung von DNA-PKcs an S2056 und T2609 und damit das NHEJ reguliert [70]. Zudem steuert der EGFR über

den MAPK-Signalweg sowohl das NHEJ als auch die HR [71-73]. Eigene vorangegangene Arbeiten konnten zudem einen Zusammenhang zwischen dem EGFR, dem MAPK-Signalweg und dem DNA-Reparaturprotein PARP1 zeigen [74].

Diese regulatorischen Mechanismen veranschaulichen den Zusammenhang zwischen dem zellulären *Signaling* und der DNA-Reparatur. Im Hinblick auf die Tumorthherapie können diese regulatorischen Prozesse als potentielle Angriffspunkte für molekulare *Targeting*-Strategien zur gezielten Behandlung von strahlenresistenten Tumoren dienen.

1.4 Molekulares *Targeting*

Beim molekularen *Targeting* stehen besonders die molekularpathologischen Veränderungen der Tumorzellen im Fokus. Im Gegensatz zu den Normalgewebszellen zeichnen sich Tumorzellen häufig durch hyperaktive Kinasen aus, die unter anderem durch Überexpression oder Mutationen konstitutiv aktiv sind (siehe Abschnitt 1.2). Deshalb ist ein Ziel des molekularen *Targetings* die Inhibition dieser veränderten Kinasen bzw. Kinase-abhängigen Signalwege. Hierfür stehen monoklonale Antikörper und niedermolekulare Inhibitoren (engl. *small molecule inhibitors*) zur Verfügung. Die Inhibition sollte sich vor allem negativ auf die Tumorzellen, nicht jedoch auf die Normalgewebszellen auswirken.

Aktuelle Forschungsschwerpunkte verdeutlichen die Vielfältigkeit des molekularen *Targetings*. So richtet sich der Fokus nicht nur gegen Kinasen (z.B. Cetuximab gegen EGFR), sondern auch gegen Liganden (z.B. Bevacizumab gegen VEGF), DNA-Reparaturproteine (z.B. Olaparib gegen PARP1) oder sogar gegen immunologische Ziele (z.B. Nivolumab gegen PD-1 T-Zellrezeptor). Durch diese gezielte Inhibition können unter anderem die Proliferation, die Angiogenese und das Überleben der Tumorzellen unterbunden werden (Abbildung 1.2) [75].

Ein Forschungszweig des molekularen *Targetings* umfasst die Immuntherapie. Immunzellen besitzen einen Immuncheckpoint, der auf einer Wechselwirkung zwischen T-Zellrezeptor (z.B. PD-1) und dessen Liganden (z.B. PD-L1, dendritische Zelle) beruht, wodurch die T-Zelle inaktiv bleibt. Tumorzellen können ebenfalls diesen Liganden exprimieren, wodurch sie dem Immunsystem entgehen. Der monoklonale Antikörper Nivolumab (Opdivu®, Bristol-Myers Squibb) bindet den PD-1 Rezeptor der T-Zellen, wodurch die Ligandenbindung gehemmt und das Immunsystem stimuliert wird [76]. Nivolumab verstärkt die Inaktivierung der Tumorzellen durch das patienteneigene Immunsystem, sodass es von der *European Medicines Agency* (EMA) zur Anwendung von Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (engl. *non small cell lung cancer*, NSCLC), Hodgkin-Lymphom, fortgeschrittenem Melanom und Nierenzellkarzinom freigegeben wurde.

Ein weiterer Ansatz des molekularen *Targetings* greift gezielt die DNA-Reparatur an. Gerade BRCA1 (engl. *breast cancer 1, early onset*) und BRCA2-mutierte Tumorzellen besitzen einen Defekt in der Homologen Rekombination (siehe Abschnitt 1.3.5). Bei zusätzlicher gezielter Inhibition eines weiteren DNA-Reparaturwegs, z.B. die Basenexzisionsreparatur durch Inhibition von PARP1, bleiben

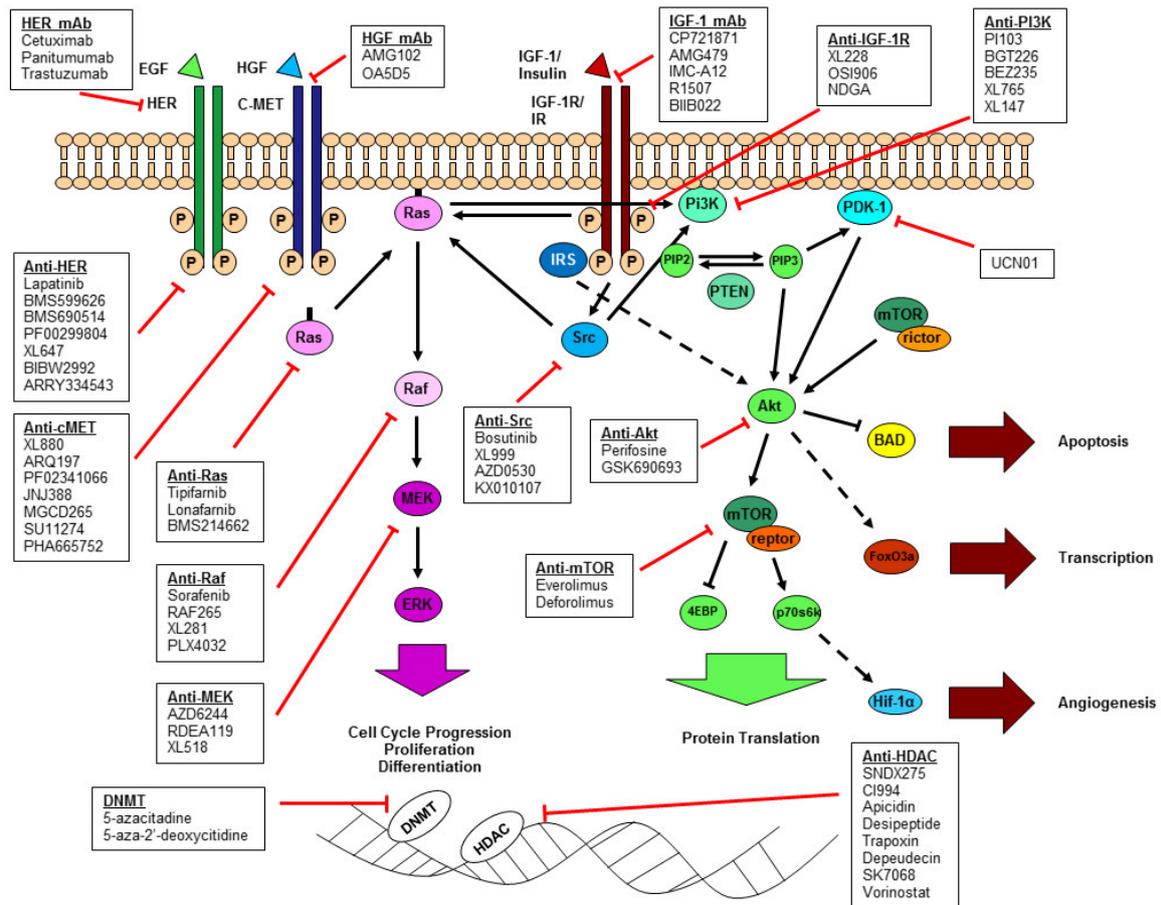


Abbildung 1.2 Angriffspunkte des molekularen Targetings in der Tumorthherapie.

Dargestellt sind verschiedene zum Teil noch experimentelle Inhibitionsansätze (schwarze Boxen), die zur Inhibition von biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und zellulären Überleben führen sollen. Modifiziert nach Ma *et al.*, 2009 [75].

Einzelstrangbrüche unrepariert. Während der Replikation werden aus diesen Einzelstrangbrüchen DSB generiert, welche in der G2-Phase hauptsächlich durch die HR repariert werden. Da BRCA1-/BRCA2-defiziente Tumorzellen nicht in der Lage sind die HR durchzuführen, bleiben die DNA-Schäden unrepariert (chromosomale Aberrationen), die im weiteren Verlauf des Zellzyklus zur Inaktivierung der Tumorzelle führen können (siehe Abschnitt 1.3.1). Das Ergebnis des Zellsterbens aus zwei nicht-letalen Veränderungen (z.B. Gendefekt und gezielte Inhibition eines Proteins) wird auch als *synthetic lethality* bezeichnet [77, 78]. Die anti-tumorigene Wirkung des PARP1-Inhibitors Olaparib (Lynparza™, AstraZeneca) wurde in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien hinsichtlich des Ansprechens in BRCA-mutierten Tumorentitäten untersucht [79-82]. Aus diesem Grund wurde Olaparib als Monotherapie zur Behandlung von Ovarialkarzinom mit vorhandenen BRCA-Mutationen zugelassen.

Eine weitere molekulare Targeting-Therapie richtet sich gegen die Angiogenese und der damit verbundenen Neovaskularisierung. Die Angiogenese wird hierbei insbesondere durch den Liganden VEGF-A und den VEGFR-1/2 reguliert, die im Folgenden die *downstream*-Signalwege Ras/Raf/MAPK und PI3K/Akt/mTOR stimulieren [83]. Mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Roche Pharma AG), der gegen den Liganden VEGF-A gerichtet

ist, wurde die Aktivierung des VEGFR-2 effektiv inhibiert [84]. Infolgedessen wurde Bevacizumab in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika zur klinischen Anwendung von Kolorektal-, Zervix-, Ovarial-, Mamma-, Nierenzellkarzinom und NSCLC zugelassen.

Ein großer Bereich des molekularen *Targetings* umfasst die direkte Inhibition von Kinasen bzw. Kinase-abhängigen Signalwegen. Viele Kinasen sind an biologischen Prozessen, wie dem Tumorwachstum, das Zellüberleben und die Differenzierung, beteiligt. Eines der am intensivsten untersuchten molekularen *Targets* ist dabei der EGFR (siehe Abschnitt 1.2). Gerade zu Beginn der molekularen *Targeting*-Therapie erlangte der EGFR eine große Bedeutung. Präklinische Untersuchungen konnten einen anti-tumorigenen Effekt des monoklonalen Antikörpers Cetuximab, wie auch der *small molecule* Inhibitoren Erlotinib (Tarceva®, Roche Pharma AG) und Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca), in zahlreichen Tumorentitäten zeigen [85-91]. Die daraus resultierenden klinischen Studien führten dazu, dass die *US Food and Drug Administration* (FDA) und die EMA Cetuximab als Monotherapie bei Kolorektalkarzinom, Erlotinib bei NSCLC und Pankreaskarzinom und Gefitinib ebenfalls bei NSCLC zuließen.

Während der Standardtherapie werden über 50 % aller Tumoren mit einer Strahlentherapie behandelt [92]. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, in wie weit die Effizienz des molekularen *Targetings* auch bei einer Kombination mit der Strahlentherapie oder der Radiochemotherapie bestehen bleibt. Zeigt die Kombinationsbehandlung zudem ein verbessertes Ansprechen als die Einzelbehandlung wird von einer Chemo- oder Strahlensensitivierung gesprochen. Diese Sensitivierung kann dabei auf eine verstärkte Zellinaktivierung der Tumorzellen, z.B. durch eine verstärkte Apoptose-Induktion, ein induzierter primärer Zellzyklusarrest oder ein Anstieg des mitotischen Zelltods durch eine verschlechterte DNA-Reparatur (siehe Abschnitt 1.3), zurückgeführt werden.

In einer klinischen Phase III Studie behandelte Bonner *et al.* lokal fortgeschrittene HNSCC-Patienten mit Cetuximab in Kombination mit Röntgenstrahlung und konnte mit der Kombinationsbehandlung ein verlängertes Gesamtüberleben gegenüber der alleinigen Strahlentherapie (49,0 vs. 29,3 Monaten) erreichen [29]. Aufgrund dieser hinzukommenden ca. 10 %igen Heilungsrate wurde Cetuximab in Kombination mit einer Strahlentherapie für die Behandlung von lokal fortgeschrittenen HNSCC zugelassen. Dies ist die einzige molekulare *Targeting*-Therapie, die derzeit von der FDA und EMA in der klinischen Anwendung mit Strahlentherapie zugelassen ist.

Ang *et al.* untersuchten darüber hinaus das Ansprechen von lokal fortgeschrittenen HNSCC-Patienten hinsichtlich einer Kombinationsbehandlung aus Cetuximab mit Radiochemotherapie. Jedoch konnte in der Phase III Studie kein Überlebensvorteil der multimodalen Therapie gegenüber der Radiochemotherapie gezeigt werden [93].

Die *small molecule* Inhibitoren, Erlotinib und Gefitinib, wurden in zahlreichen klinischen Phase I/II Studien in Kombination mit Röntgenstrahlung bzw. Radiochemotherapie getestet und zeigten in verschiedenen Tumorentitäten ein besseres progressionsfreies Überleben bzw. Gesamtüberleben [94-99]. Diese klinische Effizienz muss in ausstehenden Phase III Studien im Vergleich zur alleinigen

Strahlen- bzw. Radiochemotherapie weiter untersucht werden. Bisher wurde einzig in einer Phase III Studie das Ansprechen von Erlotinib in Kombination mit Bestrahlung zur Behandlung der Hirnmetastasen von NSCLC-Patienten untersucht, wobei keine Verbesserung des Gesamtüberlebens gegenüber der herkömmlichen Therapie (Bestrahlung und Temozolomid, einem Standardzytostatikum bei Gehirntumoren) erreicht wurde [100].

Bevacizumab wird derzeit in mehreren klinischen Phase III Studien in neu diagnostizierten und wiederkehrenden hochgradigen Gliomen in Kombination mit Bestrahlung und Temozolomid untersucht [101]. Für andere Tumorentitäten stehen noch weiterführende Studien hinsichtlich der Wirksamkeit von Bevacizumab in Kombination mit Radiochemotherapie im Vergleich zur gegenwärtigen Standardtherapie aus.

Die Inhibition der DNA-Reparatur mit PARP1-Inhibitoren wird aufgrund der strahlensensitivierenden Wirkung in Kombination mit Bestrahlung in klinischen Phase I/II Studien getestet [102-105].

Obwohl viele Substanzen in Phase I/II Studien untersucht werden, gibt es derzeit nur wenige Phase III Studien, die das Ansprechen einer molekularen *Targeting*-Therapie mit Strahlentherapie überprüfen [101]. Dies liegt unter anderem daran, dass die molekulare *Targeting*-Therapie kombiniert mit Strahlentherapie in der Summe nur ein moderates Ansprechen der gesamten Patienten-Kohorte zeigt und lediglich einzelne Subgruppen von der Behandlung profitieren. Am Beispiel der Behandlung der HNSCC-Patienten mit Cetuximab und Bestrahlung sprechen vorrangig die Patienten an, die einen Hautausschlag Grad III und höher ausgebildet haben [29]. Um diese Subgruppen zu definieren, müssen Unterschiede der molekularpathologischen Eigenschaften entschlüsselt und prädiktive Biomarker identifiziert werden. Diese sollen eine Aussage über einen möglichen Therapieerfolg liefern, sodass individualisierte Therapien die Heilungsrate von Tumorpatienten steigern können.

Eine weitere Problematik der molekularen *Targeting*-Therapie ist ein unter Behandlung erworbenes Resistenzverhalten, das zu einem Therapieversagen führen kann. Neueste Studien beschäftigen sich deshalb mit der Fragestellung, welcher zugrundeliegende Mechanismus für die erworbene Resistenz verantwortlich ist und ob durch entsprechende Behandlungsstrategien dieses Resistenzverhalten überwunden werden kann. Am Beispiel des EGFR liefern Rabinowits & Haddad eine Übersicht über aktuelle Resistenzmechanismen in Folge einer EGFR-Inhibition [106]. So kann eine Resistenz gegenüber Cetuximab oder Gefitinib erworben werden, wenn andere Mitglieder der ErbB-Familie oder deren Liganden verstärkt exprimiert bzw. aktiviert werden [107, 108]. Um dieser Resistenzbildung entgegen zu wirken, werden derzeit in Kombinationsbehandlungen verschiedene molekulare *Targeting*-Substanzen, wie z.B. Cetuximab mit monoklonalen Antikörper oder *small molecule* Inhibitoren gegen HER2 (ErbB2) gemeinsam getestet [106].

Ein weiterer Resistenzmechanismus der EGFR-Therapie betrifft den c-Met-Rezeptor, welcher durch Amplifizierung, Überexpression oder Mutation oder durch Überexpression des Liganden in HNSCC eine verstärkte Aktivität aufweist [13, 109]. So wurde in einer Vielzahl von Tumorzelllinien eine verminderte Sensitivität von Erlotinib beobachtet, die auf eine Liganden-abhängige Aktivität des

c-Met-Rezeptors zurückgeführt wurde [110]. Eine Kombinationsbehandlung mit Erlotinib und einem Multikinaseinhibitor, der gegen c-Met gerichtet ist, wirkt effektiv der erworbenen Resistenzbildung nach EGFR-Inhibition entgegen [106].

Basierend auf der aktuellen Studienlage wird deutlich, dass die Behandlung von HNSCC mit einer molekularen *Targeting*-Therapie derzeit noch nicht hinreichend effektiv ist, weshalb die Therapie weiterhin stark von der Standardtherapie abhängt. Aus diesem Grund werden weiterhin neue molekulare Behandlungsstrategien untersucht, die das Überleben der HNSCC-Patienten verbessern, wie z.B. der Einsatz von Sorafenib.

1.5 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar®, *Bayer Pharmaceuticals*, Abbildung 1.3 A) ist ein Multikinaseinhibitor mit hoher Effektivität gegenüber der Kinase Raf-1. Zudem hemmt Sorafenib Wildtyp B-Raf und die *b-rafV600E* Mutante. Sorafenib kann aufgrund von Strukturhomologien in der katalytischen ATP-Bindungsdomäne neben Serin-/Threoninkinasen auch Tyrosinkinasen, wie VEGFR-1/-2/-3, PDGFR- β (engl. *platelet-derived growth factor receptor- β*), FGFR1 (engl. *fibroblast growth factor receptor 1*), c-Kit (Stammzellfaktor-Rezeptor), Flt-3 (engl. *fms like tyrosine kinase 3*) und RET effektiv inhibieren. Keine inhibitorische Wirkung wurde bisher bei den Rezeptortyrosinkinasen EGFR, HER2, c-Met, IGFR1 (engl. *insulin-like growth factor receptor 1*), und bei den Proteinkinasen MEK1 (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase 1* (MAPK Kinase)), ERK1 (engl. *extracellular signal-regulated kinases*, auch MAPK genannt), PKA (Proteinkinase A), PKB, PKC α und PKC γ beobachtet. Die Wirkungsweise von Sorafenib beruht auf der Bindung in der katalytischen ATP-Bindungsdomäne von Kinasen, wodurch die inaktive Konformation dieser Proteine stabilisiert wird [111]. Durch Sorafenib können eine Vielzahl biologischer Prozesse in den Tumorzellen beeinflusst werden (Abbildung 1.3 B). Dies zeigt sich vor allem in der Inhibition der Proliferation von soliden Tumoren. Gerade Tumorzellen mit einer aktivierenden Mutation im MAPK-Signalweg (z.B. KRas, B-Raf) zeigen nach Sorafenib-Behandlung eine ausgeprägte Inhibition der Proliferation, dies konnte ebenfalls in verschiedenen Xenograft-Experimenten gezeigt werden [112].

Weiterhin kann Sorafenib die Angiogenese von Tumoren inhibieren, indem die Liganden-induzierte Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1/-2/-3 und PDGFR- β unterbunden wird [113]. Dies führt zu einer verminderten Proliferation von vaskulären Endothelzellen und Perizyten, wodurch die Stabilisierung neugebildeter Blutgefäße inhibiert wird (Abbildung 1.3 B) [114]. Zudem vermindert Sorafenib die Mikrogefäß-Fläche und Dichte in verschiedenen Xenograft-Modellen [112]. Darüber hinaus kann Sorafenib in verschiedenen Zelllinien Apoptose induzieren [115, 116]. Obwohl der Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, beruht ein möglicher pro-apoptotischer Effekt von Sorafenib auf der Inhibition der Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF4E (engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E*), wodurch die Synthese des anti-apoptotischen Proteins, Mcl-1 (engl. *myeloid cell leukemia-1*), verhindert wird. Die Reduktion des Mcl-1 Proteins

führt zur Freisetzung von Zytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma, wodurch Caspasen aktiviert werden und der apoptotische Zelltod eingeleitet wird [115].

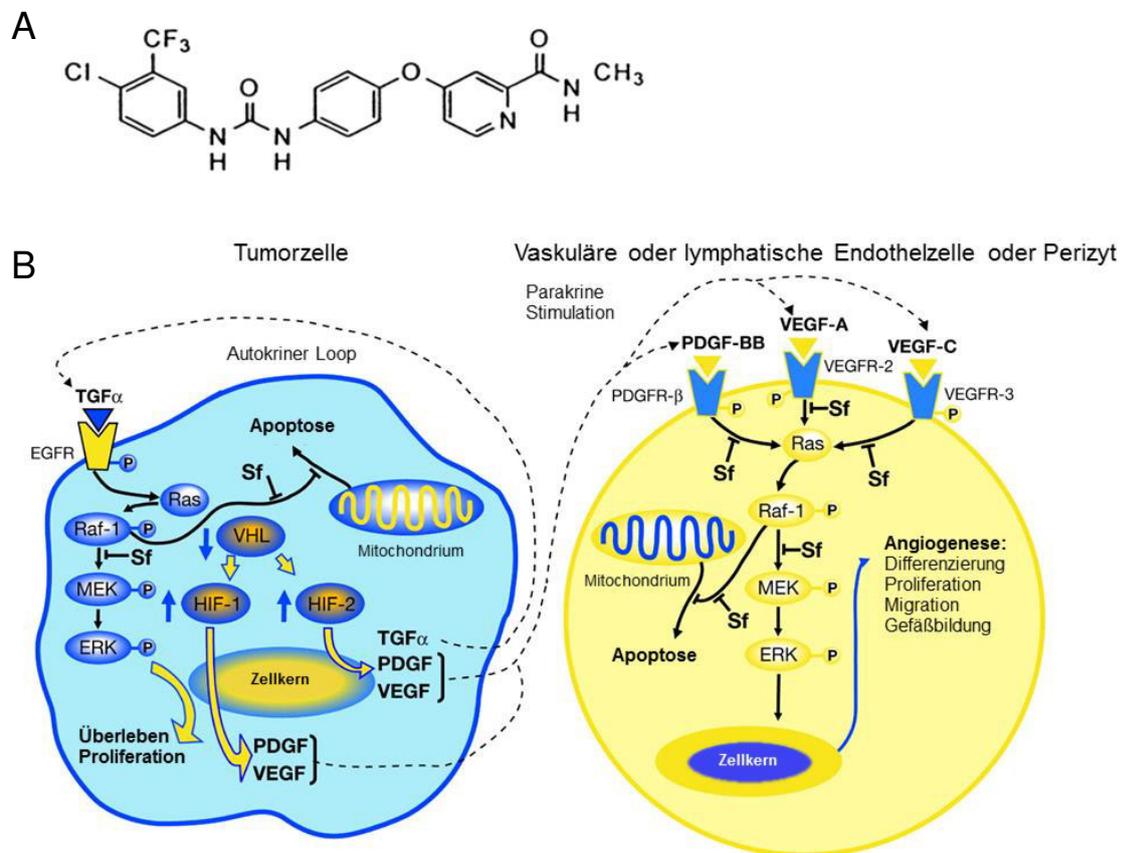


Abbildung 1.3 Wirkmechanismus von Sorafenib.

(A) Chemische Struktur von Sorafenib [112]. (B) Dargestellt ist die Deregulation des Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK)-Signalwegs in Tumorzellen, Endothelzellen und Perizyten am Beispiel des Nierenzellkarzinoms. Hierbei kann Sorafenib durch Inhibition von Raf-1, VEGFR-1/-2/-3 bzw. PDGFR- β die Proliferation, das Zellüberleben und die Angiogenese hemmen. Modifiziert nach Wilhelm *et al.*, 2008 [113].

Aufgrund dieser vielversprechenden anti-tumorigenen Wirkung und der daraus resultierenden klinischen Studien wurde Sorafenib sowohl durch die FDA als auch durch die EMA als Monotherapie zur Behandlung von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und differenzierten Schilddrüsenkarzinomen zugelassen.

Darüber hinaus wurde jedoch nur eine geringe anti-tumorigene Wirkung mit Sorafenib in der Monotherapie in anderen Tumorentitäten erzielt [117-120]. In zwei klinischen Studien mit rezidiv-bildenden und metastasierenden HNSCC bzw. fortgeschrittenen und metastasierenden HNSCC hat Sorafenib in der Monotherapie z.B. nur geringe klinische Aktivität gezeigt, die mit anderen *Targeting*-Therapien in dieser Tumorentität vergleichbar waren [121, 122]. Aus diesem Grund fokussieren sich aktuelle Studien auf die Kombinationsbehandlung mit Sorafenib und Chemotherapie bzw. Sorafenib und Bestrahlung.

Die Kombination von Sorafenib und dem Chemotherapeutikum Doxorubicin wurde in der klinischen Studie von Abou-Alfa *et al.* an fortgeschrittenen HCC (hepatozelluläres Karzinom) untersucht, wobei

eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens gegenüber der alleinigen Doxorubicin-Therapie erreicht wurde [123]. Für metastasierende Nierenzellkarzinome zeigte Bellmunt *et al.* ebenfalls eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens mit Sorafenib und Chemotherapie (Gemcitabin/ Capecitabin) [124].

Die Wirkung von Sorafenib in Kombination mit ionisierender Strahlung beschränkte sich zu Beginn dieser Arbeit, 2013, auf wenige Studien im Bereich der Zellkultur, Xenograft-Modellen und einer klinischen Studie im Glioblastom. So zeigten Heravi *et al.* in präklinischen, *in vitro* und *in vivo*, Studien eine Strahlensensitivierung durch Sorafenib in Mammakarzinomen, die auf eine erhöhte Apoptose-Induktion und einen G2-Zellzyklusarrest zurückzuführen war [125]. Eine Strahlensensitivierung wurde ebenfalls von Kuo *et al.* *in vitro* und *in vivo* in Kolorektalkarzinomen beobachtet, die durch eine verstärkte Apoptose hervorgerufen wurde [126]. Weiterhin wurde eine strahlensensitivierende Wirkung von Sorafenib in *in vitro* und *in vivo* Experimenten mit HCC-Zellen beobachtet, die auf eine unterdrückte DNA-Reparaturkapazität und eine erhöhte Apoptose-Induktion zurückgeführt wurde [127]. Im Gegensatz dazu konnten Plasteras *et al.* keine Strahlensensitivierung durch Sorafenib in Kolonkarzinom zeigen, beobachteten aber eine starke Tumorwachstumsverzögerung in Kombination mit ionisierender Strahlung [128]. Eine starke Verzögerung des Tumorwachstums wurde auch von Suen *et al.* in Kolorektalkarzinomen deutlich, es wurde jedoch keine Strahlensensitivierung beobachtet [129]. In der klinischen Studie von Den *et al.* wurden primäre und rezidiv-bildende Gliom-Patienten mit einer Kombination aus Sorafenib und Bestrahlung bzw. Sorafenib, Bestrahlung und Temozolomid behandelt, wobei ein Überlebensvorteil für beide Behandlungsstrategien beobachtet wurde [130].

Im Hinblick auf HPV-negative HNSCC mit Sorafenib-Behandlung war zum Zeitpunkt des Beginns der Promotion einzig die Arbeit von Yadav *et al.* bekannt. Darin wurde an lediglich zwei HNSCC-Zelllinien eine Sensitivierung gegenüber einer kombinierten Behandlung mit Cisplatin und Röntgenbestrahlung gezeigt. Diese Radiochemosensitivierung wurde auf eine verminderte Expression der DNA-Reparaturproteine ERCC1 und XRCC1 zurückgeführt, Proteine von Bedeutung bei der Nukleotidexzisionsreparatur und Einzelstrangbruchreparatur [131].

Insgesamt zeigen die präklinischen und klinischen Daten das mögliche Potential von Sorafenib als neue Option für das molekulare *Targeting* von soliden Tumoren, insbesondere in Kombination mit einer Chemo-/Strahlentherapie. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit die Effektivität von Sorafenib allein und in Kombination mit Röntgenstrahlung in HNSCC-Zelllinien zu untersuchen. Wegen der relativ großen Unspezifität von Sorafenib sollte zudem die Wirkung von Sorafenib auf die zelluläre Signaltransduktion systematisch analysiert werden. Aufgrund der großen Zahl möglicher Ziele und der ausgeprägten Heterogenität der HNSCC-Zellen – resultierend aus den umfangreichen molekularpathologischen Eigenschaften – sollten neue explorative Methoden eingesetzt werden, wie z.B. das Kinaseaktivitäts-*Profiling* (Kinomprofiling).

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es:

- I) die Wirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib allein und in Kombination mit Röntgenstrahlung auf HNSCC-Zellen zu untersuchen;
- II) die zugrundeliegenden Mechanismen einer möglichen Strahlensensibilisierung aufzudecken;
- III) die Wirkung von Sorafenib auf die zelluläre Signaltransduktion in den HNSCC-Zelllinien zu untersuchen.

3 Materialien

3.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit den humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien Cal33, HSC4, SAS, UT-SCC 5, UT-SCC 29, UT-SCC 42B und UT-SCC 60B gearbeitet, die in Tabelle 3.1 näher charakterisiert sind. Für ein Screening-Ansatz wurden zudem die HNSCC-Zelllinien FaDuDD, SAT, UT-SCC 8, UT-SCC 14, UT-SCC 15, UT-SCC 19A, UT-SCC 23, UT-SCC 38, UT-SCC 42A, UT-SCC 43, UT-SCC 49, UT-SCC 60A, UT-SCC 75, UT-SCC 103, UT-SCC 113 (aus Primärtumoren), sowie UT-SCC 19B und XF354 (aus Metastasen) verwendet.

Tabelle 3.1 Charakterisierung der Plattenepithelkarzinom-Zelllinien

Zelllinie	p53-Status	KRas-Status (Exon2-4)	Ursprungsgewebe
Cal33	mut*	wt	Primärgewebe der Zunge
HSC4	mut*	wt	Primärgewebe der Zunge
SAS	mut*	wt	Primärgewebe der Zunge
UT-SCC 5	mut*	wt	Primärgewebe der Zunge
UT-SCC 29	mut*	wt	Primärtumor des Larynx
UT-SCC 42B	kA	wt	Primärtumor des Larynx
UT-SCC 60B	mut**	kA	Metastase der Tonsille

mut - mutiert; wt - Wildtyp; kA - keine Angabe; * Kriegs *et al.*, 2016 [132]; ** Primärtumor ist p53 mutiert

Alle Zellen wurden durch das Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie mit Hilfe der Analyse der *short tandem repeats* identifiziert.

3.2 Antikörper

3.2.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3.2 Eigenschaften der primären Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
53BP1	Kaninchen	monoklonal	1:600 (IF)	Novus Biologicals, Littleton, USA, # NB-100-3004
Akt	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #9272
pAkt (T308)	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #13038
Artemis	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Novus Biologicals, Littleton, USA, # NB-100-542
β-Aktin	Maus	monoklonal	1:20000 (WB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #A-2228

Fortsetzung von Tabelle 3.2

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
c-Met	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #3127
p-c-Met (Y1234/1234)	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #3077
DNA-Ligase IV	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, sc-271299
DNA-PKcs	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, sc-9051
pDNA-PKcs (S2056)	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Abcam®, Cambridge, UK, ab18192
pDNA-PKcs (T2609)	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Abcam®, Cambridge, UK, ab18356
EGFR	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #2661
pEGFR (Y1173)	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #4407
EphA1	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Antibodies online, Aachen, # ABIN969478
pEphA1 (Y605)	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Antibodies online, Aachen, # ABIN2706106
ERK1/2	Maus	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #9102
pERK1/2 (T202/Y204)	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #9101
FLT-3	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #3462
pFLT-3 (Y589/591)	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #3464
GAPDH	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology®, Heidelberg, sc-32233
Ku70	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #4104
Ku80	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #2753
PDGFR-β	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #3169
pPDGFR-β (T751)	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #3166
Poly(ADP-ribose) (PAR)	Maus	monoklonal	1:250 (IF)	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, #ALX-804-220
Src	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #2110
pSrc Family (Y416)	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #2101
γH2AX (S139)	Maus	monoklonal	1:250 (IF)	Merck Millipore, Schwalbach/Ts, #05-636
STAT3	Kaninchen	monoklonal	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #4904
pSTAT3 (Y705)	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #9138

Fortsetzung von Tabelle 3.2

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
VEGFR-2	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #9698S
pVEGFR-2 (Y1059)	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #3817S
XRCC4	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology®, Heidelberg, sc-365055

IF - Immunfluoreszenz; WB - Western Blot

3.2.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3.3 Eigenschaften der sekundären Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor®594 <i>goat anti-mouse</i>	Ziege	polyklonal	1:1000 (IF)	Life Technologies, Carlsbad, USA, #A 11005
Alexa Fluor®488 <i>goat anti-rabbit</i>	Ziege	polyklonal	1:1000 (IF)	Life Technologies, Carlsbad, USA, #A 11001
IRDye® 800CW <i>goat anti-rabbit</i>	Kaninchen	polyklonal	1:7500 (WB)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-32211
IRDye® 800CW <i>goat anti-mouse</i>	Maus	polyklonal	1:7500 (WB)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-32210
IRDye® 680RD <i>goat anti-rabbit</i>	Kaninchen	polyklonal	1:7500 (WB)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-68071
IRDye® 680RD <i>goat anti-mouse</i>	Maus	polyklonal	1:7500 (WB)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-68070

IF - Immunfluoreszenz; WB - Western Blot

3.3 Kits

Tabelle 3.4 Verwendete Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
EdU-Click 488	Analyse von Zellzyklusarresten	Base click GmbH, Neuried, # BCK-EdU 488
<i>FAM-FLICA® in vitro Caspase Detection Kit</i>	Analyse von apoptotischen Zellen	ImmunoChemistry Technologies LLC
FAM-YVAD		Part #655
Waschpuffer (10x)		Part #634
<i>PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array Kit</i>	Analyse der Tyrosinkinase- phosphorylierung	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, #7949
<i>Protein Tyrosine Kinase Assay on PamStation®12</i>	Analyse der Tyrosinkinaseaktivität	PamGene International B.V.
PTK PamChip® for Pam Station		Dichrom GmbH, Marl, #32500
PTK Reagent Kit		Dichrom GmbH, Marl, #32112

3.4 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Tabelle 3.5 Verwendete Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #D6429
Fötales Kälberserum	Biochrom GmbH, Berlin, #S0615
0,05 % Trypsin-EDTA	Life Technologies, Carlsbad, USA, #25300-054

3.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3.6 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
BD FACST TM Sheath Fluid	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, #342003
BD FACST TM BD FACSRinse Solution	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, #340346
BD FACST TM Clean Solution	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, #340345
<i>bicinchoninic acid</i> -Lösung (BCA, Reagenz A)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #B9643
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #A7030
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, #B5525
Calyculin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, #C5552
<i>CertifiedTMPCR Low Melt Agarose</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., München #161-3113
CHEF DNA Size Standard-Marker	Bio-Rad Laboratories, Inc., München, #170-3605
Coulter-Isoton II Lösung	BeckmanCoulter GmbH, Krefeld, #8448011
Demecolcine (Colcemid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #D7385
Diamindinophenylinodol (DAPI)	Merck, Darmstadt, #1246530100
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #D2650
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O)	Merck, Darmstadt, #106586
Entellan	Merck, Darmstadt, #OB475016
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, #3738.1
Ethanol	TH Geyer, Renningen, #2294
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, #E7637
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, #11280
Formaldehyd (37 % (wt/col))	Merck, Darmstadt, #104002
<i>FxCycleTMFarRed stain</i>	Life technologies, Carlsbad, USA, #F10348
Giemsa	Merck, Darmstadt, #HX56879304
Glycin	Roth, Karlsruhe, #3808.2
H ₂ O ₂	Calbiochem®, Merck, Darmstadt, #386790
<i>Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail</i>	Thermo Scientific, Rockford, USA, #78426
<i>Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA free</i>	Thermo Scientific, Rockford, USA, #78429
<i>Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA free</i> (PamGene)	Thermo Scientific, Rockford, USA, #78415
Immersionsöl	Zeiss, Göttingen, #444969-0000-000
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, #104936

Fortsetzung von Tabelle 3.6

Bezeichnung	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, #104873
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, #115940
Kupfer(II)-sulfat-Lösung (BCA, Reagenz B)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #C2284
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, USA, #LC5602
Methanol	J.T.Baker, Pleasant Prairie, #8045
<i>M-PER Mammalian Protein Extraction Buffer</i>	Thermo Scientific, Rockford, USA #78501
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #S6150
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #S8045
Natrium-Lauryl-Sulfat (NLS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #L5777
Propidiumiodid	Merck, Darmstadt, #537059
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim, #P2308
<i>Pulse Field Certified Agarose</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., München, #1620137
RNase A (Ribonuklease A)	Serva, Heidelberg, #34388
SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, USA, #LC5925
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #L4509
<i>Sorafenib-Tosylate</i> (gelöst in DMSO)	Nexavar®, BAY43-9006, Bayer Pharmaceuticals
Staurosporin	Calbiochem®, Merck, Darmstadt, #569396
Sucrose	Serva, Heidelberg, #35580.02
Tris-EDTA (TE)-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T9285
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T1503
Tris-Borat-EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T7527
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T3253
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T8787
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, #P1379
UltraPure™ Distilled Water	Life Technologies, Carlsbad, USA, #10977
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA, #H-1000
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, #M3148

3.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.7 Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1x PBS, pH 7,4	137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 2,7 mM KCl 2 mM KH ₂ PO ₄
Ethanol	70 % (v/v) bzw. 80 % (v/v)
Chromosomen-Aberration	
Fixierungslösung	75 % (v/v) Methanol 25 % (v/v) Eisessig
Giemsa-Lösung	4 % (v/v) Giemsa in bidest. H ₂ O
Kaliumchlorid (KCl)-Lösung	0,075 M KCl in bidest. H ₂ O

Fortsetzung von Tabelle 3.7

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>constant field gel electrophoresis/ pulsed field gel electrophoresis</i>	
0,5 M EDTA	0,5 M EDTA
5x TBE-Puffer (pH 8)	5 % 10 M NaOH
Tris-EDTA (TE)-Puffer	86 g (w/v) TBE-Puffer in bidest. H ₂ O
<i>Pulse Field Certified Agarose</i>	10 % (v/v) TE-Puffer in bidest. H ₂ O
Ethidiumbromid-Lösung	0,8 % (w/v) in 0,5x TBE-Puffer
<i>Certified™PCR Low Melt Agarose</i>	0,5 % Ethidiumbromid-Stocklösung (1 mg/ml)
Lysis-Lösung	1,6 % (w/v) in DMEM-Medium (FKS-frei)
	80 % (v/v) 0,5 M EDTA
	20 % (v/v) NLS (10 %)
	1 mg/ml Proteinase K
	1 % (v/v) 1 mg/ml RNase A
Natriumhydroxid (NaOH, 10 M)	40 % (w/v) NaOH in bidest. H ₂ O
Natrium-Lauryl-Sulfat (NLS)	10 % (w/v) NLS in bidest. H ₂ O
Durchflusszytometrie	
Propidiumiodid (PI)-Lösung	10 µg/ml PI-Lösung
	1 % RNase A
	0,1 % Tween® 20
Waschpuffer	1x PBS
	0,1 % (v/v) Tween® 20
Immunfluoreszenz/ Poly(ADP-Ribose)-Färbung	
Blockierungslösung	1x PBS
	3 % BSA (w/v)
Permeabilisierungslösung	1x PBS
	0,2 % (v/v) Triton™ X-100
Waschlösung	1x PBS
	0,5 % (v/v) Tween® 20
Koloniebildungstest	
Färbelösung	0,1 % (w/v) Kristallviolett in bidest. H ₂ O
SDS-Gelelektrophorese/ Western Blot	
10 % BSA-Lösung	10 % (w/v) BSA in 1x TBS-T
10x TBS-Puffer	150 mM NaCl
	50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
10x Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M Glycin
	250 mM Tris-Base
1x SDS-Lysepuffer	200 mM Tris-HCl (w/v) (pH 8,8)
	5 mM (w/v) EDTA
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	10 % (w/v) Sucrose
	3,3 % (w/v) SDS
	2 % (v/v) β-Mercaptoethanol
1x TBS-T (0,2%)	10 % (v/v) 10x TBS
	0,2 % (v/v) Tween® 20

Fortsetzung von Tabelle 3.7

Bezeichnung	Zusammensetzung
1x Transferpuffer	10 % (v/v) 10x TG-Puffer 20 % (v/v) Methanol
5 % BSA-Lösung	50 % 10x BSA 50 % 1x TBS-T
Blockierungslösung	1x TBS-T 10 % BSA (w/v)
Laufpuffer	10 % (v/v) 10x TG-Puffer 10 % (v/v) SDS
SDS	10 % (w/v) in bidest. H ₂ O

3.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.8 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Criterion-Gradientengele (4-15 % Tris-HCl)	Bio-Rad Laboratories, Inc., München, #345-0028
Deckgläschen, Ø 15 mm	Roth, Karlsruhe, #P232.1
Discardit™ Spritzen, 5 ml	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, USA, #301285
Einmal-Kanülen, Sterican	Braun, Melsungen, #4657519
Einmal-Skalpell	Braun, Tuttlingen, #5518075
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, #551579
Feindosierspritzen, Omnifix-F, 1 ml	Braun, Melsungen, #9161406V
Filterpapier CriterionBlotter	Bio-Rad Laboratories, Inc., München, #170-4085
Handschuhe, MicroTouch® Nitra-Tex®, Gr. M	Ansell, Brüssel, Belgien, #700113
Kulturflasche 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3910
Kulturflasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3911
Objektträger Superfrost	Roth, Karlsruhe, #1880.1
Odyssey Nitrozellulose-Membran	LI-COR, Nebraska, USA, #926-31092
Petri-Schalen, Ø 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3902.300
Petri-Schalen, Ø 6 cm	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3901
Pipette serolog., 10 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1254.001
Pipette serolog., 2 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1252.001
Pipette serolog., 25 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1685.001
Pipette serolog., 5 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1253.001
Pipette serolog., 50 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1689.001
Pipettenspitzen, 0,5-20 µl	Greiner bio-one, Frickenhausen, #140660
Pipettenspitzen, 200-1250 µl	Greiner bio-one, Frickenhausen, #143024
Pipettenspitzen, 50-200 µl	Greiner bio-one, Frickenhausen, #136369
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #72.690.001
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1171.001
Zellkulturplatte, 12-well	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3921
Zellkulturplatte, 6-well	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3920
Zellschaber	Thermo Scientific, Rockford, USA, #179693

3.8 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 3.9 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Mediatech, Norderstedt
Blot-Kammern (CriterionPrecast)	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Brutschrank	Sanyo, Medical, Bad Nenndorf
Coulter Counter Z1	BeckmanCoulter GmbH, Krefeld
Detektiersystem (CFGE/PFGE)	AlphaImager Mini System, Protein Simple, San Jose, USA
Detektionssystem (LI-COR)	Odyssey CLX 289, LI-COR Biosciences GmbH
Durchflusszytometer (BD FACScanCanto™)	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, USA
Eismaschine (FM-120DE-50)	Hochizaki, GC Amsterdamm
Gefrierschrank (-20 °C, -80 °C)	Kryotec-Kryosafe GmbH, Hamburg
Gelelektrophoresekammer mit Equipment (CFGE)	Sub-Cell®GT, Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Gelelektrophoresekammer mit Equipment (PFGE)	Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Gelelektrophoresekammer mit Equipment (SDS-Gel)	CriterionCell, Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Kamerasystem (Fluoreszenzmikroskop)	AxiocamMRm, Zeiss, Göttingen
Kolbenhubpipetten (0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank (Standard 432)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg
Magnetrührer	Ikameg Ret, IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop	Axioplan 2 Imaging, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
	Axiovision Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Mikroskop	Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Netzgerät (PFGE)	CHEF-DR®III System, Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Netzgeräte (SDS-Gel, WB, CFGE)	Consort E455, Fröbel Laborgeräte, Lindau
	Consort E802, Fröbel Laborgeräte, Lindau
PamStation®12	PamGene International B.V., Wolvenhoek, Niederlande
pH-Meter	BeckmanCoulter GmbH, Krefeld
Photometer	Bio-Photometer, Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer (Accu-jet® pro)	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Röntgenröhre	Gulmay RS225, Surrey, UK
Schüttler	ST5, Neolab, Heidelberg
	Polymax 1040, Heidolph, Schwabach
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Ultraschall (UP50H)	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow
Variable Speed Pump/ cooling module (PFGE)	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Vortexer	Vortex-Genie® 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	P1200, Mettler Toledo, Giessen

Fortsetzung von Tabelle 3.9

Bezeichnung	Hersteller
Waagen	AM100, Mettler Toledo, Giessen AE160, Mettler Toledo, Giessen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbäder	Haake W19/D3, Karlsruhe Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Biofuge 15 R, Heraeus, Hanau Laborfuge 400 R, Heraeus, Hanau Microfuge R, BeckmanCoulter GmbH, Krefeld Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau

CFGE - *constant field gel electrophoresis*; PFGE - *pulsed field gel electrophoresis*; WB – Western Blot

3.9 Software

Tabelle 3.10 Verwendete Software

Programm	Hersteller
AlphaImager® Mini	Protein Simple, San Jose, USA
Axio-Vision Rel. 4.7	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Axio-Vision SE64	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
BD FACS Diva 6.1.2.	Becton Dickson Biosciences, NJ, Franklin Lakes, USA
Bionavigator2	PamGene International B.V., Wolvenhoek, Niederlande
Evolve	PamGene International B.V., Wolvenhoek, Niederlande
GraphPadPrism 5	GraphPad Software Inc., CA, San Diego, USA
ImageJ	Wayne Rasband
<i>Kinome render</i>	<i>Najmanovich Research Group</i> mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology, Inc.
<i>LI-COR Image Studio 2.1</i>	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg von der Höhe
Microsoft® Office (Excel 2013, PowerPoint 2013)	Microsoft Corporation, Santa Rosa, USA
ModFit LT™ software	Verity Software House, Inc.

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkultivierung

Die Arbeiten mit Tumorzelllinien erfolgten unter einer sterilen Werkbank mit entsprechenden sterilen Puffern, Lösungen und Medien. Die Kultivierung aller HNSCC-Zelllinien erfolgte in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) bei 37 °C, 10 % CO₂-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit in sterilen Zellkulturflaschen. Die Zelllinien wurden alle 3-4 Tage passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin inkubiert, um den Zellrasen zu lösen. Nach 3-5 minütiger Inkubation im 37 °C Wärmeschrank wurden die Zellen resuspendiert und entweder zum Erhalt verdünnt in neue Zellkulturflaschen oder für entsprechende Experimente ausgelegt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die einzelnen Versuchen mit proliferierenden Zellen durchgeführt.

4.1.2 Zellzahlbestimmung

Für das Auslegen einer definierten Zellzahl wurden 200 µl trypsinierte Zellen in 9,8 ml isotoner Lösung (Coulter-Isoton II Lösung) resuspendiert und mittels Coulter Counter innerhalb einer definierten Größenverteilung (8,5 – 25 µm) gezählt.

4.1.3 Bestimmung des Zellwachstums

Um das Wachstumsverhalten, die Zellzyklusverteilung und den Einfluss von Sorafenib auf das Zellwachstum zu bestimmen, wurden Wachstumskurven erstellt. Hierzu wurden 1×10^5 Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgelegt und mit 4 ml Medium kultiviert. Nach 24 h (Tag 0) wurden die Zellen mit 10 µM Sorafenib bzw. der entsprechenden DMSO-Verdünnung als Kontrolle behandelt. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurde täglich die Zellzahl bestimmt, wobei am Tag 1 gegebenenfalls ein Mediumwechsel erfolgte.

Der Einfluss unterschiedlicher Sorafenib-Konzentrationen auf das Zellwachstum wurde mittels Dosis-Wirkungsbeziehung untersucht. Hierzu wurden ebenfalls am Tag 0 die Zellen mit DMSO bzw. den verschiedenen Sorafenib-Konzentrationen (1, 2, 5, 10, 15, 20 µM) behandelt. Als Ausgangswert dient eine unbehandelte Probe am Tag der Behandlung. Nach drei Tagen wurden die Proben geerntet und die Zellzahl bestimmt. Die Proliferation nach Sorafenib-Behandlung wurde als erstes auf den Tag 0 und anschließend auf die DMSO-Kontrolle am Tag 3 normiert.

4.1.4 Analyse des Zellüberlebens mittels Koloniebildungstest

Um die Strahlenempfindlichkeit zu untersuchen, wurde der Koloniebildungstest unter *delayed plating*-Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden proliferierende Zellen mit 10 μM Sorafenib bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden die Zellen mit 0, 2, 4 und 6 Gy bestrahlt und anschließend für 24 h inkubiert. Anschließend wurde in Abhängigkeit von der Zelllinie eine definierte Anzahl von Zellen in neue 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgelegt (HSC4 und UT-SCC 60B - 800 Zellen; SAS - 500 Zellen; UT-SCC 5 - 300 Zellen) und entsprechend ihrer Verdopplungszeit für 6-14 Tage im Wärmeschrank inkubiert. Um eine einheitliche Koloniegröße zwischen den verschiedenen Behandlungen zu gewährleisten, durften die Sorafenib-behandelten und bestrahlten Zellen nachwachsen. Nach der Koloniebildung wurden die Zellen mit 70 %igem Ethanol für 5 min fixiert. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und die Kolonien mit 0,1 % Kristallviolett für 5 - 10 min gefärbt. Das Kristallviolett wurde entfernt und die überschüssige Färbelösung mit Leitungswasser ausgespült und luftgetrocknet. Für die Analyse wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt. Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien nach Bestrahlung auf die Anzahl der unbestrahlten Zellen normiert. Mit Hilfe der Anwachsrate bei 0 Gy (*plating efficiency*) wurde zudem die Zytotoxizität von Sorafenib bestimmt. Hierzu wurde das Verhältnis gebildeter Kolonien zur eingesetzten Zellzahl bestimmt.

4.1.5 Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung der Tumorzellen erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Röntgenröhre (Gulmay RS225) bei 200 kV und 15 mA mit einer Dosisrate von 1,2 Gy/min (0,5 mm Kupfer und 0,8 mm Beryllium Filter).

4.2 Durchflusszytometrische Methoden

4.2.1 Analyse der Zellzyklusverteilung durch Propidiumiodid-Färbung

Um die Zellzyklusverteilung der Zellen zu untersuchen, wurde die DNA mit dem Interkalator Propidiumiodid (PI) angefärbt und der Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen (G1-, S-, G2-Phase) ermittelt. Dabei kann zwischen einem einfachen DNA-Gehalt (G1-Phase) und einem doppelten DNA-Gehalt (G2-Phase) unterschieden werden, wohingegen die S-Phase Zellen dazwischen zugeordnet werden sollten. Bei der Analyse der Zellzyklusverteilung wurden 1×10^5 Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgelegt und mit 4 ml Medium für zwei Tage kultiviert. Anschließend wurden die Proben nach DMSO bzw. 10 μM Sorafenib-Behandlung zu entsprechenden Zeitpunkten (0 h - unbehandelt; 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 h) geerntet. Hierbei wurden die trypsinisierten und resuspendierten Proben zentrifugiert (5 min, 300x g, Raumtemperatur (RT)), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde langsam unter vortexen

4 ml 80 %iges eiskaltes Ethanol dazu getropft. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei -20 °C gelagert. Die fixierten Zellen wurden anschließend zentrifugiert (5 min, 300x g, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 2 ml 1x PBS + 0,1 % Tween® 20 gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 300x g, RT). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit PI-Lösung (10 µg/ml PI-Lösung mit 1 % RNase A und 0,1 % Tween® 20) für mindestens 30 min im Dunkeln bei RT gefärbt. Die Proben wurden durch Gase in FACS-Röhrchen filtriert und am Durchflusszytometer (BD FACScanCanto™, mit BD FACS Diva 6.1.2 Software) gemessen. Die Quantifizierung der Zellzyklusverteilung erfolgte mit der Software ModFit LT™.

4.2.2 Nachweis eines Zellzyklusarrests

Der Nachweis von im Zellzyklus arretierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Thymidinanalogs (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU;). Dieses wird während der Replikation (S-Phase) in die DNA eingebaut. Die Fähigkeit proliferierende EdU-positive Zellen von den nicht proliferierenden EdU-negativen Zellen zu unterscheiden, ermöglicht die Quantifizierung von arretierten Zellen. Diese Experimente erfolgten unter *delayed plating*-Bedingungen. Hierbei wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib für 2 h behandelt und mit 0 bzw. 6 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 h wurden jeweils 4×10^5 Zellen neu ausgelegt und nach 5 h mit 10 µM EdU behandelt. Nach weiteren 24 und 48 h wurden die Zellen abtrypsiniert, zentrifugiert (5 min, 300x g, RT) und in 80 % eiskaltem Ethanol fixiert. Die Proben wurden bis zur EdU-Färbung bei -20 °C gelagert. Für die EdU-Färbung wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 300x g, RT), den Überstand verworfen und zweimal mit der Waschlösung (1x PBS + 0,2 % Triton™ X-100 + 1 % BSA) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in frisch angesetzten 100 µl *Reaction-Cocktail* (75,2 µl *aqua dest*, *Reaction buffer* (10x) 10 µl, *Catalyst solution* 4 µl, *6-FAM-Azide* (10 mM) 0,2 µl, *Buffer additive* (10x) 10 µl; EdU-Click 488 Kit) für 30 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (5 min, 300x g, RT) und einmal mit der Waschlösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 300x g, RT) wurde das Pellet in 500 µl DNA-Färbelösung (Waschlösung mit 5 µl RNase A und 2 µl *FxCycle™FarRed*) für mindestens 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden durch Gase in FACS-Röhrchen filtriert und am Durchflusszytometer (BD FACScanCanto™, mit BD FACS Diva 6.1.2 Software) gemessen. Die Quantifizierung der arretierten Zellen erfolgte mit der Software BD FACS Diva 6.1.2.

4.2.3 Nachweis von apoptotischen Zellen

Die Analyse von apoptotischen Zellen erfolgte durch die Bestimmung von aktiven Caspasen mittels *FAM-FLICA® in vitro Caspase Detection Kit*. Dabei bindet ein *Fluorescent Labeled Inhibitors of Caspases* (FLICA®) kovalent an aktiven Caspasen, wodurch diese anhand eines Fluoreszenzsignals visualisiert werden können. Für den Versuch wurden 1×10^5 Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen in 4 ml Medium ausgelegt (Proben 72, 48 und 24 h). Nach 24 h wurden die Zellen mit DMSO bzw.

10 μM Sorafenib behandelt und 2 h später mit 0 bzw. 6 Gy bestrahlt. Als Positivkontrolle wurde eine Probe für 18 h mit dem Apoptose-induzierenden Multikinaseinhibitor Staurosporin (1 μM) behandelt. Nachdem die Proben für 72, 48, 24 bzw. 18 h im Wärmeschrank inkubierten, wurde das Medium gesammelt, die Zellen trypsinisiert und mit dem gesammelten Medium resuspendiert. Nachdem die Zellen zentrifugiert (5 min, 300x g, RT) und der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet mit der Färbelösung (193 μl Medium mit 7 μl frisch angesetzten 30x *FLICA solution*) gemischt und für 1 h im Wärmeschrank inkubiert und einmal zwischendurch geschwenkt. In einem abgedunkelten Raum wurde anschließend direkt zu den Zellen 2 ml Waschlösung (1:10 mit *aqua dest* verdünnt) dazugegeben und zentrifugiert (5 min, 300x g, RT). Der Überstand wurde verworfen und erneut mit 1 ml Waschlösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 300x g, RT) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 400 μl Waschlösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit Gase filtriert und am Durchflusszytometer (BD FACScanCanto™, mit BD FACS Diva 6.1.2 Software) gemessen. Der Anteil an fluoreszierenden Caspase-positiven Zellen wurde mit der Software BD FACS Diva 6.1.2. ermittelt.

4.2.4 Nachweis von PARylierung

Die Detektion des PARylierungssignals diente der Analyse der Aktivität von Olaparib (PARP1 Inhibitor). Hierzu wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 25 cm^2 Kulturflaschen ausgelegt. Nach 24 h wurden die Zellen mit DMSO bzw. 10 μM Olaparib behandelt. Das Medium wurde nach 2 h gesammelt und die Zellen trypsinisiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml gesammelten Medium resuspendiert und in ein 15 ml Falcon überführt und auf Eis gelagert. Die entsprechenden Proben wurden mit 5 mM H_2O_2 versetzt und für 20 min im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und danach bei 4 °C und 300x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde langsam unter vortexen 4 ml 80 %iges eiskaltes Ethanol dazu getropft. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei -20 °C gelagert. Für die Poly(ADP-Ribose)-Färbung wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 300x g, RT), der Überstand verworfen und einmal mit 1x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 300x g, RT) wurden die Zellen für 15 min mit 1 ml Permeabilisierungslösung (1x PBS, 1 % BSA, 0,2 % Triton™ X-100) bei RT behandelt. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 300x g, RT) wurde für 1 h bei RT blockiert (1x PBS, 3 % BSA). Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 300x g, RT) und anschließend wurden 150 μl Primärantikörperlösung mit anti-Poly(ADP-Ribose) (Maus IgG, 1:250) in Waschlösung (1x PBS mit 0,5 % Tween® 20) zu den Zellen gegeben. Nach 1 h Inkubation (bei RT) wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 300x g, RT), einmal gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde mit 150 μl Sekundärantikörperlösung (anti-Maus, 1:500, Alexa Fluor®594, rot) für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurde die Zellsuspension in 500 μl Waschlösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit Gase filtriert und

am Durchflusszytometer (BD FACScanCanto™, mit BD FACS Diva 6.1.2 Software) gemessen. Die Quantifizierung des Poly(ADP-Ribose)-Signals erfolgte mit der Software BD FACS Diva 6.1.2.

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Nachweis von residuellen γ H2AX/53BP1 Reparaturkomplexen

Ionisierende Strahlung induziert DNA-DSB, welche durch Immunfluoreszenzfärbung visualisiert werden können. Für diesen Versuch wurden residuelle Reparaturkomplexe (Foci) unter *delayed plating*-Bedingungen untersucht. Hierzu wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt und 2 h später bestrahlt (0, 6 Gy). Nach 24 h wurden die Zellen trypsiniert und $1,5 \times 10^5$ Zellen in eine 12-well-Platte re-platiert. In diese 12-well-Platte wurde vorab pro well ein rundes Deckgläschen (\varnothing 15 mm) gelegt und mit 1 ml Medium überschichtet. Nach weiteren 24 h wurden die Deckgläschen mit den adhären Zellen mit 1x PBS gewaschen und 15 min bei RT mit 2 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min mit 1 ml Permeabilisierungslösung (1x PBS, 1 % BSA, 0,2 % Triton™ X-100) bei RT leicht schüttelnd behandelt. Im Folgenden wurde für 1 h bei RT und leicht schüttelnd blockiert (1x PBS, 3 % BSA). Nach dem Blockieren wurden 50 μ l Primärantikörperlösung mit anti- γ H2AX (Maus IgG, 1:250) und anti-53BP1 (Kaninchen IgG, 1:600) in Waschlösung (1x PBS mit 0,5 % Tween® 20) direkt auf die Zellen gegeben und für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Durch dreimaliges Waschen wurde die überschüssige Primärantikörperlösung entfernt. Anschließend wurde mit 50 μ l Sekundärantikörperlösung mit anti-Maus (1:1000, Alexa Fluor®594, rot), anti-Kaninchen (1:1000, Alexa Fluor®488, grün) und DAPI-Lösung (1:1000, DNA-Färbung, blau) für 1 h im Dunkeln bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach viermaligen Waschen wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Vectashield® Mounting Medium auf einen Objektträger eingebettet und mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die residuellen doppelpositiven γ H2AX/53BP1-Foci wurden mit einem konfokalem Fluoreszenzmikroskop (Axiovision Observer Z1, Zeiss) als mehrschichtige Bilder dokumentiert. Mittels der Software Axio-Vision Rel. 4.7 wurden pro Probe 100 intakte Zellkerne ausgewertet.

4.3.2 Herstellung von Ganzzelllysaten

4.3.2.1 SDS-Ganzzelllysate

Für die Analyse der Protein-Expression und Phosphorylierung der HNSCC-Zelllinien wurden SDS-Ganzzelllysate hergestellt. Hierbei wurden abhängig vom Wachstumsverhalten der Zelllinien verschiedene Zellzahlen (HSC4, UT-SCC 5, UT-SCC 60B $1,5 \times 10^5$ und SAS 1×10^5 Zellen) in 6-well-Platten mit 2 ml Medium ausgelegt und zwei Tage wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt und 2 h inkubiert. Die Proben wurden mit 6 Gy bestrahlt, für

15 min im Wärmeschrank inkubiert und anschließend geerntet. Die unbestrahlten Proben wurden direkt nach 2 h geerntet. Die Zellernte erfolgte auf Eis. Hierzu wurden die Proben mit 1x PBS gewaschen und mit 150 µl SDS-Lysepuffer lysiert. Die Proben wurden mittels Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA der Lyseproben wurde mit Ultraschall für 10 sek geschert und für 5-10 min bei 95 °C denaturiert. Die Zelllysate wurden anschließend direkt auf ein SDS-Gel (siehe Abschnitt 4.3.4) aufgetragen oder bei 4 °C gelagert.

4.3.2.2 Ganzzelllysate für *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array*

Zur Herstellung der Ganzzelllysate für den *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array* wurden 3×10^5 Zellen mit 10 ml Medium in einer Petrischale (Ø 10 cm) ausgelegt und die Zellen für 6 Tage zur Konfluenz wachsen gelassen. Die Tumorzellen wurden mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und im Folgenden mit 400 µl eiskaltem 1x Lysepuffer (Cell Signaling, #7949) für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wurde für 10 sek mit Ultraschall behandelt und für 10 min bei 14.000x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine BCA-Bestimmung (siehe Abschnitt 4.3.3) durchgeführt. Die Zelllysate wurden bei -20 °C gelagert.

4.3.2.3 Ganzzelllysate für *Tyrosine Kinase PamChip® Array*

Für die Herstellung von Ganzzelllysaten für den *Tyrosine Kinase PamChip® Array* wurden proliferierende Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und mit 100 µl pro 1×10^6 Zellen Lysepuffer (*M-PER Mammalian Extraction Buffer* mit 1:100 *Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail* und *Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA free*) für 15 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden vorsichtig mit dem Zellschaber abgelöst und die Zelllysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 min bei 16.000x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in mindestens fünf neue Reaktionsgefäße überführt, wobei ein Aliquot für eine BCA-Bestimmung genutzt (siehe Abschnitt 4.3.3) und die restlichen Aliquots bei -80 °C gelagert wurden.

4.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem *bicinchoninic acid* (BCA) Assay analysiert. Die Proteinbestimmung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Hierzu wurden 5 µl Probe mit 45 µl *aqua dest* verdünnt. Anschließend wurde 1 ml BCA-Gemisch (50:1) aus BCA-Lösung (Reagenz A) und Kupfer(II)-sulfat-Lösung (Reagenz B) dazugegeben, gevortext und 30 min im 37 °C Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde innerhalb von 10 min unter Berücksichtigung der Verdünnung die

Extinktion bei 562 nm mit einem Photometer analysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Doppelbestimmung.

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Durch die Bindung von SDS-Molekülen an die Proteine werden nicht-kovalente Bindungen aufgehoben. Die Proteine werden negativ geladen und können dann nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Für die Auftrennung der Proteine wurden Criterion-Gradientengele (4-15 % Tris-HCl) verwendet. Zu Beginn wurden die Geltaschen mit vollentsalztem Wasser gespült, in die Elektrophoresekammern eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die bei 4 °C gelagerten Proben wurden für 5-10 min bei 95 °C erhitzt, gevortext und kurz anzentrifugiert. Ein Probenvolumen von 20 µl wurde pro Geltasche aufgetragen. Als Größenstandard wurde neben 4 µl *SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard* auch 2,5 µl *MagicMark™ XP Western Protein Standard* verwendet. Die Gelelektrophorese wurde zunächst für 10 min bei 120 V und anschließend für 60 min bei 190 V auf Eis durchgeführt. Der Nachweis der Proteine in den Ganzzelllysaten erfolgte mit Hilfe der Western Blot Methode (siehe Abschnitt 4.3.5).

4.3.5 Western Blot

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgt durch den Transfer aller Proteine von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Diese wurde zunächst mit vollentsalztem Wasser aktiviert und für 15 min mit Transferpuffer (10 % 10x TG-Puffer, 20 % Methanol) äquilibriert. Der Aufbau der Criterion Blotter erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Zumeist erfolgte der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran über Nacht bei 4 °C für 4 h bei 50 V und die restliche Zeit bei 20 V. Nach dem Transfer wurde die Membran für mindestens 1 h mit 10 % BSA schwenkend blockiert. Der Primärantikörper (gelöst in 5 % BSA, 0,2 % 1x TBS-T) wurde mindestens 1 h oder über Nacht bei 4 °C schwenkend auf der Membran inkubiert. Nach dreimaligen 10-minütigen Waschen mit 0,2 % 1x TBS-T wurde für 1 h der Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper (gelöst in 5 % BSA, 0,2 % 1x TBS-T) im Dunkeln schwenkend inkubiert. Nach dreimaligen 10-minütigen Waschen mit 0,2 % 1x TBS-T wurden die Fluoreszenz-markierten Proteine mit dem *LI-COR Odyssey CLx Infrarot Imaging System* detektiert. Dieses System ermöglicht die Detektion von zwei verschiedenen Fluoreszenz-Signalen (rotes Signal bei 700 nm und grün Signal bei 800 nm), weshalb Sekundärantikörper mit roter (Sekundärantikörper *IRDye® 680RD*) bzw. grüner (Sekundärantikörper *IRDye® 800CW*) Fluoreszenz verwendet wurden. Dies ermöglicht eine zeitgleiche Detektion von Gesamtprotein und entsprechenden Phosphoproteinen, sofern unterschiedliche Spezies der Primärantikörper benutzt werden.

4.3.6 Analyse von Phosphoproteinen mittels *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array*

Mit Hilfe des *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array* kann die Phosphorylierung bestimmter Signalmoleküle untersucht werden. Hierbei kann die Regulation der Phosphorylierung der Proteine durch (Multikinase-) Inhibitoren Hinweise auf die Aktivität einzelner Signalwege liefern. Mit dem hier verwendeten *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array* wurden 28 Rezeptortyrosinkinasen und elf prominente Signalwege untersucht. Hierzu wurden die im Abschnitt 4.3.2 hergestellten Ganzzelllysate für die Durchführung des *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array* verwendet und gemäß den Herstellerangaben (Schematische Darstellung Abbildung 4.1., Cell Signaling, #7949) verarbeitet. Dabei wurden die *wells* des Antikörper-Arrays mit jeweils 150 µl Array-Blockierungspuffer für 15 min bei RT auf einen Schüttler inkubiert. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurde der Antikörper-Array mit einer Schutzfolie versiegelt. Nach Verwerfen des Blockierungspuffers wurden 150 µl Probe in das jeweilige *well* gegeben. Dabei sollte die Proteinkonzentration innerhalb eines Bereichs von 0,2 bis 1 mg/ml liegen. Gegebenenfalls sollte die Proteinkonzentration mittels Array-Verdünnungspuffer verdünnt werden um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C auf einen Schüttler inkubiert. Die ungebundene Probe wurde verworfen und der Antikörper-Array weitere dreimal für 5 min auf einem Schüttler mit 200 µl 1x Array-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde jedes *well* mit 150 µl 1x *Detection Antibody Cocktail* (biotinyliert) für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

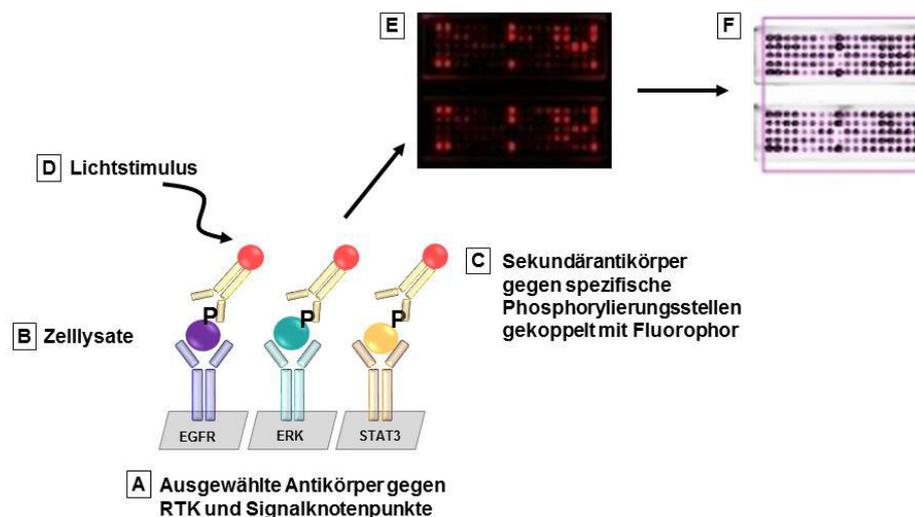


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array*.

Dieser Antikörper-Array basiert auf einem Sandwich-Immunoassay Prinzip. Dabei sind auf einem Objektträger Antikörper gegen 28 Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und elf Proteine prominenter Signalwege immobilisiert (A). Nach Zugabe der Zelllysate binden die entsprechenden Proteine an den immobilisierten Antikörpern (B). Durch spezifische biotinylierte Phosphoantikörper werden ausgewählte Phosphorylierungsstellen der Proteine gebunden und durch ein Streptavidin-markiertes Fluorophor markiert (C). Die Detektion und die Quantifizierung der Fluoreszenz-Signale erfolgte mittels *LI-COR Image Studio 2.1* des *LI-COR Odyssey CLx Infrarot Imaging Systems* (D-F). Diese Abbildung wurde erstellt nach den Vorgaben des *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody* (Cell Signaling, #7949).

Überschüssige Antikörper wurden durch viermaliges Waschen für 5 min auf dem Schüttler entfernt. Anschließend wurden 150 µl 1x *DyLight 680®-linked Streptavidin* in die *wells* gegeben und 30 min bei RT im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Nach erneutem viermaligen 5-minütigen Waschen wurde der Antikörper-Array aus seiner Apparatur entfernt und für 10 sek mit 10 ml vollentsalztem Wasser gespült. Anschließend wurde der Antikörper-Array vollständig getrocknet. Die Detektion der Fluoreszenz-markierten Proteine erfolgte bei 700 nm mit dem *LI-COR Odyssey CLx Infrarot Imaging System*. Die Quantifizierung der Fluoreszenz-Signale erfolgte unter Verwendung eines Array-Musters mit der Software *LI-COR Image Studio 2.1* des *LI-COR Odyssey CLx Infrarot Imaging System* (Abbildung 4.1 F).

4.3.7 Analyse der Tyrosinkinaseaktivität mittels *Tyrosine Kinase PamChip®Array*

Mit Hilfe des *Tyrosine Kinase PamChip®Arrays* kann in einem explorativen Ansatz die Aktivität eines Großteils der humanen Tyrosinkinasen gemessen werden. Grundlage hierfür ist die Phosphorylierung von 144 spezifischen Peptidsequenzen auf dem Array. Für die Versuche wurden proliferierende Zellen geerntet wie es in Abschnitt 4.3.2 beschrieben wurde. Die Durchführung des *Tyrosine Kinase PamChip®Arrays* erfolgte gemäß dem *kinase activity profiling protocol* an der *PamStation®12* (PamGene International B.V.). Die Zusammensetzung des verwendeten Master-Mixes für die Analyse des *Tyrosine Kinase PamChip®Array* an der *PamStation®12* ist in Tabelle 4.1 und das Versuchsprotokoll der *PamStation®12* in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Nach Vorbereitung der *PamStation®12* wurde jeder Array mit 30 µl 2 % BSA inkubiert. Während der Blockierungszyklen wurden die Proben für die Messung wie in Tabelle 4.1 vorbereitet. Vorab wurde die Antikörper-Lösung (PY20-FITC) für 5 min bei 16.000x g und 4 °C zentrifugiert um Fluoreszenz-Aggregate zu entfernen. Nach den Blockierungszyklen wurden je 40 µl Proben-Mix auf den *Tyrosine Kinase PamChip®Array* hinzupipettiert und die Messung gestartet (siehe Tabelle 4.2).

Die Datenanalyse, Identifizierung der veränderten *upstream*-Kinasen und bioinformatischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms *Bionavigator2* in Zusammenarbeit mit PamGene, PD Dr. Malte Kriegs (Gruppenleiter der AG *Signal Transduction & Molecular Targeting*, Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie) und Dr. Lara Bußmann (Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde & AG *Signal Transduction & Molecular Targeting*, Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie).

Tabelle 4.1 Zusammensetzung des Master-Mixes für die Analyse des Tyrosine Kinase PamChip®Array an der PamStation®12.

Lösungen	Volumen [μ l]
Wasser	15,8
10x PK-Puffer	4
1 M DTT-Lösung	0,4
10x PTK additive	4
100x BSA-Lösung	0,4
Antikörper-Lösung (PY20-FITC)	0,6
Probenlysat (5 μ g)	10
4 mM ATP-Lösung	4
0,5 mM Sorafenib/ DMSO	0,8
Gesamtvolumen	40

Tabelle 4.2 Versuchsprotokoll für die Analyse des Tyrosine Kinase PamChip®Array an der PamStation®12. Versuchsablauf für die Analyse des Proteintyrosinkinase-Assays durch das *Evolve*-Protokoll an der PamStation®12 der Firma PamGene.

File Name: 1200PTKlysv03.PS12Protocol

Load Disposable 30 °C

Pump 30 cycles 30 sec

Quick Aspirate 5 sec PumpUp 15 sec

Prime Fluid2

Quick Wash (Dispense fluid2 30 μ l Quick Wasch/Pump 1 cycles 30 sec Quick Wash/Quick Aspiarte 5 sec PumpUp 15 sec)

Quick Wash (Dispense fluid2 30 μ l Quick Wasch/Pump 1 cycles 30 sec Quick Wash/Quick Aspiarte 5 sec PumpUp 15 sec)

Quick Wash (Dispense fluid2 30 μ l Quick Wasch/Pump 2 cycles 30 sec Quick Wash/Quick Aspiarte 5 sec PumpUp 15 sec)

Manual Dispense

Pump 2 cycles 60 sec

Read MultEx FITC: 10 mSec FITC: 50 msec FITC: 200 msec

Read Kinetic MultEx/Read by cycles MultEx every 5 cycles, FITC: 10 msec FITC:50 msec FITC: 200 msec

Read Kinetic MultEx/Pump 60 cycles 60 sec

Quick Aspirate 5 sec PumpUp 60 sec

Prime fluid2

Quick Wash(Dispense fluid2 30 μ l Quick Wash/Pump 1 cycle 60 sec Quick Wash/Quick Aspirate 5 sec PumpUp 60 sec)

PumpUp fluid2 30 μ l

Pump 2 cycles 60 sec

Read MultEx FITC: 10 msec FITC: 20 msec FITC: 50 msec FITC: 100 msec FITC: 200 msec

Unload Disposable

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Analyse von Chromosomen-Aberrationen

4.4.1.1 Analyse von Chromosomen mittels Metaphasen

Die Reparaturfähigkeit von strahlungsinduzierten DNA-DSB in Tumorzellen kann mittels Analyse der Chromosomen beurteilt werden. Hierzu wurden proliferierende Tumorzellen mit dem Spindelfasergift Colcemid in der Metaphase arretiert und fehlerreparierte DNA-DSB in Form von Chromosomen-Aberrationen sichtbar gemacht. Für diesen Versuch wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt. Nach 2 h wurden die Zellen bestrahlt (0, 2, 6 Gy) und 30 min im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden 0,2 μ g/ml Colcemid den Zellen zugeführt und für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium gesammelt, die Zellen trypsiniert und mit dem gesammelten Medium resuspendiert. Während der Chromosomen-Isolation wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Die Chromosomen-Präparation wurde wie in Abschnitt 4.4.1.3 beschrieben durchgeführt.

4.4.1.2 Analyse von Chromosomen mittels *Premature Chromosome Condensation*

Der Vorteil der *Premature Chromosome Condensation*-Methode gegenüber der Metaphasen-Präparation zeigt sich in der Kondensation der Chromosomen unabhängig von der Zellzyklusphase. Damit können nicht proliferierende Zellen hinsichtlich ihrer DNA-Reparaturfähigkeit untersucht werden. Für diesen Versuch wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt und nach 2 h bestrahlt (0, 2, 6 Gy). Nach 24 h Inkubation im Wärmeschrank wurden die Zellen mit 50 nM Calyculin A behandelt. Dabei führte Calyculin A neben der Chromosomen-Kondensation auch zum Abrunden der Zellen, wodurch diese einfach mit dem Medium resuspendiert werden konnten. Während der Chromosomen-Isolation wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 4.4.1.3 beschrieben.

4.4.1.3 Chromosomen-Präparation

Die in Abschnitt 4.4.1.1 und 4.4.1.2 generierte Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 300x g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 10 ml kaltem 1x PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 1 ml verworfen. Anschließend wurde das Pellet gevortext und tropfenweise 10 ml kaltes Kaliumchlorid zugeführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt. Im Weiteren wurde zweimal unter Vortexen tropfenweise kalte Fixierungslösung (frisches Methanol:Essigsäure Gemisch im Verhältnis 4:1) zu dem Pellet pipettiert und die Zellsuspension zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die bessere Verteilung der Metaphasen wurde eine Schicht

vollentsalztes Wasser auf dem Objektträger aufgetragen. Nach Zugabe von 30 µl Zellsuspension wurden die Metaphasen auf dem gesamten Objektträger ausgebreitet. Für die Färbung der Chromosomen wurde frische 4 %ige Giemsa-Lösung angesetzt und die luftgetrockneten Objektträger 15 min darin unter leichten schütteln angefärbt. Anschließend wurden die Objektträger mit Leitungswasser gespült. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und nach Zugabe von 1-2 Tropfen Entellan mit einem Deckglaschen eingedeckt. Die Analyse der Chromosomen erfolgte mit einem Durchlichtmikroskop (630x Vergrößerung) und der Software Axio-Vision SE64. Pro Probe wurden 25 Metaphasen analysiert.

4.4.2 Analyse der DNA-Reparaturkapazität mittels Gelelektrophorese

4.4.2.1 Konstant-Feld-Gelelektrophorese

Strahlungsinduzierte DNA-DSB führen zur Fragmentierung der DNA und können mit Hilfe der Konstant-Feld-Gelelektrophorese (engl. *constant field gel electrophoresis*, CFGE) untersucht werden. Eine Auftrennung der fragmentierten DNA mit Hilfe der CFGE wird erreicht, weil fragmentierte DNA-Moleküle, die kleiner als 8 Mbp sind, mittels elektrischer Spannung durch ein Agarose-Gel wandern können. Hingegen verbleiben DNA-Moleküle, die größer als 8 Mbp sind, in der Geltasche.

Für diese Versuche wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib für 2 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin geerntet und die Zellzahl bestimmt. Während dessen wurden die Proben auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 300x g, 4 °C) und das Pellet auf 5×10^5 Zellen/ml mit kaltem FKS-freiem DMEM eingestellt. Dabei enthielt das Medium im Vergleich zu den bisherigen Konzentrationen die doppelte Menge an Inhibitor (20 µM Sorafenib) bzw. DMSO. Anschließend wurde die Zellsuspension 1:1 mit 40 - 50 °C warmer Agarose (*Certified™PCR Low Melt Agarose*, Endkonzentration von 0,8 %) gemischt, wodurch eine Endkonzentration von 10 µM Sorafenib/ DMSO erreicht wurde. Direkt im Anschluss wurde das Gemisch in eine auf 4 °C gekühlte Form luftblasenfrei gespritzt und auf Eis aushärten lassen. Die Agaroseblöcke (Plugs) wurden mit einer Spritze aus der Gießform in 1,5 ml Reaktionsgefäße gepusht und mit 1 ml DMSO bzw. 10 µM Sorafenib-haltigem DMEM (4 °C, FKS-frei) überschichtet und auf Eis gekühlt. Für die Versuche der DNA-Schadensinduktion wurden unbehandelte Zellen mit 0, 2, 5, 10, 15, 20 bzw. 30 Gy auf Eis bestrahlt. Für die Versuche zur Reparatur wurden die Plugs auf Eis mit 0 bzw. 15 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in 37 °C Wasserbad inkubiert und nach entsprechenden Inkubationszeiten (0, 5, 15, 30, 60, 120 min) die Reparatur der Zellen auf Eis gestoppt. Im Anschluss wurde das Medium verworfen und die Zellen für 30 min mit 1 ml Lyselösung (0,4 M EDTA, 2 % NLS, 1 % RNase A, 1 mg/ml Proteinase K) auf Eis inkubiert und über Nacht für mindestens 16 h im Wärmeschrank lysiert. Nach der Inkubation wurden die Plugs auf Eis abgekühlt und dreimal mit TE-Puffer für 5 min gespült. Für die Gelelektrophorese wurde ein 0,8 %iges Agarose-Gel (*Pulse Field Certified Agarose*) mit 0,5x TBE-Puffer hergestellt. Nach Abkühlen des Agarose-Gels wurden die Plugs in Geltaschen-große Stückchen geschnitten und vorsichtig in die Geltaschen

eingesetzt. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer eingelegt und diese mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt. Die Gelelektrophorese wurde für 20 h bei 25 V (ca. 0,83 V/cm) bei RT durchgeführt. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das Agarose-Gel für 30 min mit Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml Konzentration) gefärbt und für 1 h mit vollentsalztem Wasser gewaschen. Mittels Detektiersystem (AlphaImager Mini System, Protein Simple) und der Software AlphaImager® Mini (Protein Simple) wurde das Agarose-Gel photographisch dokumentiert. Mit Hilfe der Software ImageJ (Wayne Rasband) wurde die ausgewanderte fragmentierte DNA quantifiziert und wie folgt berechnet:

$$\text{rel.FD} = F_{\text{DNA}} / (F_{\text{Plug}} + F_{\text{DNA}})$$

Hierbei stellt rel.FD die relative ausgewanderte fragmentierte DNA-Menge, F_{DNA} die ausgewanderte fragmentierte DNA und F_{Plug} die ungeschädigte DNA in dem Agaroseplug dar.

4.4.2.2 Puls-Feld-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Puls-Feld-Gelelektrophorese (engl. *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) können sehr große DNA-Fragmente anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Hierbei wird die Trägheit großer DNA-Moleküle ausgenutzt, die nach einem wechselnden Spannungsfeld (Puls-Feld) mehr Zeit benötigen, um sich neu zu orientieren. Dadurch wandern etwas kleinere DNA-Moleküle schneller im Agarose-Gel als große DNA-Moleküle.

In dieser Arbeit wurde die Reparaturfähigkeit der Tumorzellen nach Behandlung mit Sorafenib untersucht. Dabei wurde zunächst wie in Abschnitt 4.4.2.1 verfahren. Die Herstellung eines 0,8 %igen Agarose-Gels erfolgte dabei jedoch in einer PFGE-spezifischen Apparatur. Nach dem Einsetzen der Agaroseplugs wurde das Agarose-Gel anschließend in eine PFGE-spezifische Elektrophoresekammer gelegt und mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet. Diese Gelelektrophorese-Einrichtung ermöglicht über ein Pumpsystem die Zirkulation des Puffers und gewährleistet damit eine kontinuierliche Kühlung. Die Laufzeit der Gelelektrophorese lag bei 48 h mit einer Spannung von 1,5 V/cm, einem Puls-Winkel von 105°, einer Temperatur von 14 °C und einer Pulszeit von 500 – 5000 sek aufsteigend. Anschließend erfolgte die Färbung des Agarose-Gels und die Auswertung wie in Abschnitt 4.4.2.1 beschrieben.

4.5 Auswertung und Statistik

Die Datenanalyse und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPadPrism 5, Microsoft® Office 2013 Excel und PowerPoint.

Für die statistische Auswertung wurde der ungepaarte zweiseitige Studentsche t-Test verwendet. Die statistische Auswertung der CFGE und PFGE erfolgte mit dem gepaarten zweiseitigen Studentschen t-Test. Die angegebenen p-Werte lauten wie folgt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, I) die Wirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib allein und in Kombination mit Röntgenstrahlung auf HNSCC-Zellen zu untersuchen, II) die zugrundeliegenden Mechanismen einer möglichen Strahlensensibilisierung aufzudecken und III) die Wirkung von Sorafenib auf die zelluläre Signaltransduktion in HNSCC-Zellen zu analysieren. Für diese Fragestellung wurden vor allem strahlenresistente HNSCC-Zelllinien verwendet.

5.1 Wirkung von Sorafenib auf HNSCC-Zelllinien

Zunächst wurde die alleinige Wirkung von Sorafenib – ohne Röntgenbestrahlung – untersucht. Dabei wurden vier strahlenresistente HNSCC-Zelllinien (HSC4, SAS, UT-SCC 5, UT-SCC 60B) hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens (Proliferation) und einer möglichen Zellinaktivierung analysiert.

5.1.1 Proliferation

Um die Wirkung von Sorafenib auf die Proliferation der HNSCC-Zelllinien zu untersuchen, wurden UT-SCC 60B Zellen 24 h nach dem Aussäen mit einer klinisch relevanten Sorafenib-Konzentration behandelt (10 μM) und die Zellzahl täglich bestimmt. Hierbei wurde eine deutliche Inhibition des Zellwachstums beobachtet (Abbildung 5.1 A). Mit der Zeit wurde eine vollständige Stagnation der Proliferation durch Sorafenib erreicht. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden im Folgenden insgesamt vier HNSCC-Zelllinien (HSC4, SAS, UT-SCC 5, UT-SCC 60B) hinsichtlich ihres Wachstumsverhalten gegenüber unterschiedlichen Sorafenib-Konzentrationen untersucht. Hierzu wurde die Proliferation am Tag 3 nach kontinuierlicher Sorafenib-Behandlung bestimmt. In allen vier Zelllinien wurde bei geringen Sorafenib-Konzentrationen (1 μM) eine Wachstumsstimulation beobachtet (Abbildung 5.1 B). Mit ansteigender Sorafenib-Konzentration wurde eine Inhibition der Proliferation erzielt. Bei kontinuierlicher Sorafenib-Behandlung mit 10 μM zeigten alle Zelllinien ein ca. 10 % Wachstum im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen. Mit höheren Sorafenib-Konzentration wurde eine vollständige Inhibition des Wachstums erzielt.

Um jedoch die strahlensensibilisierende Wirkung von Sorafenib mittels Koloniebildungstest untersuchen zu können, dürfen die Tumorzellen ihre Proliferationsfähigkeit nicht verlieren. Deshalb wurde als nächstes das Wachstumsverhalten der vier HNSCC-Zelllinien nach 24-stündiger Sorafenib-Behandlung untersucht. Nachdem die Zellen für 24 h mit Sorafenib behandelt wurden, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei zeigte sich bei allen vier Zelllinien eine Verzögerung des Wachstums, die bei HSC4 und UT-SCC 60B stärker ausgeprägt war (ca. 2 Tage) als bei den UT-SCC 5 und SAS (ca. 1 Tag Wachstumsverzögerung; Abbildung 5.2). Nach dieser Wachstumsverzögerung zeigten die Sorafenib-behandelten Zellen erneut ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die

DMSO-behandelten Zellen (Kontrolle), weshalb für die folgenden Koloniebildungstests die Zellen für 24 h mit 10 μ M Sorafenib behandelt wurden.

Die Analyse der Proliferation zeigte deutlich, dass Sorafenib einen starken Effekt auf das Zellwachstum hat, der bei allen vier HNSCC-Zelllinien ähnlich stark ausgeprägt war. Zudem musste für nachfolgende Experimente eine Sorafenib-Behandlung auf 24 h begrenzt werden.

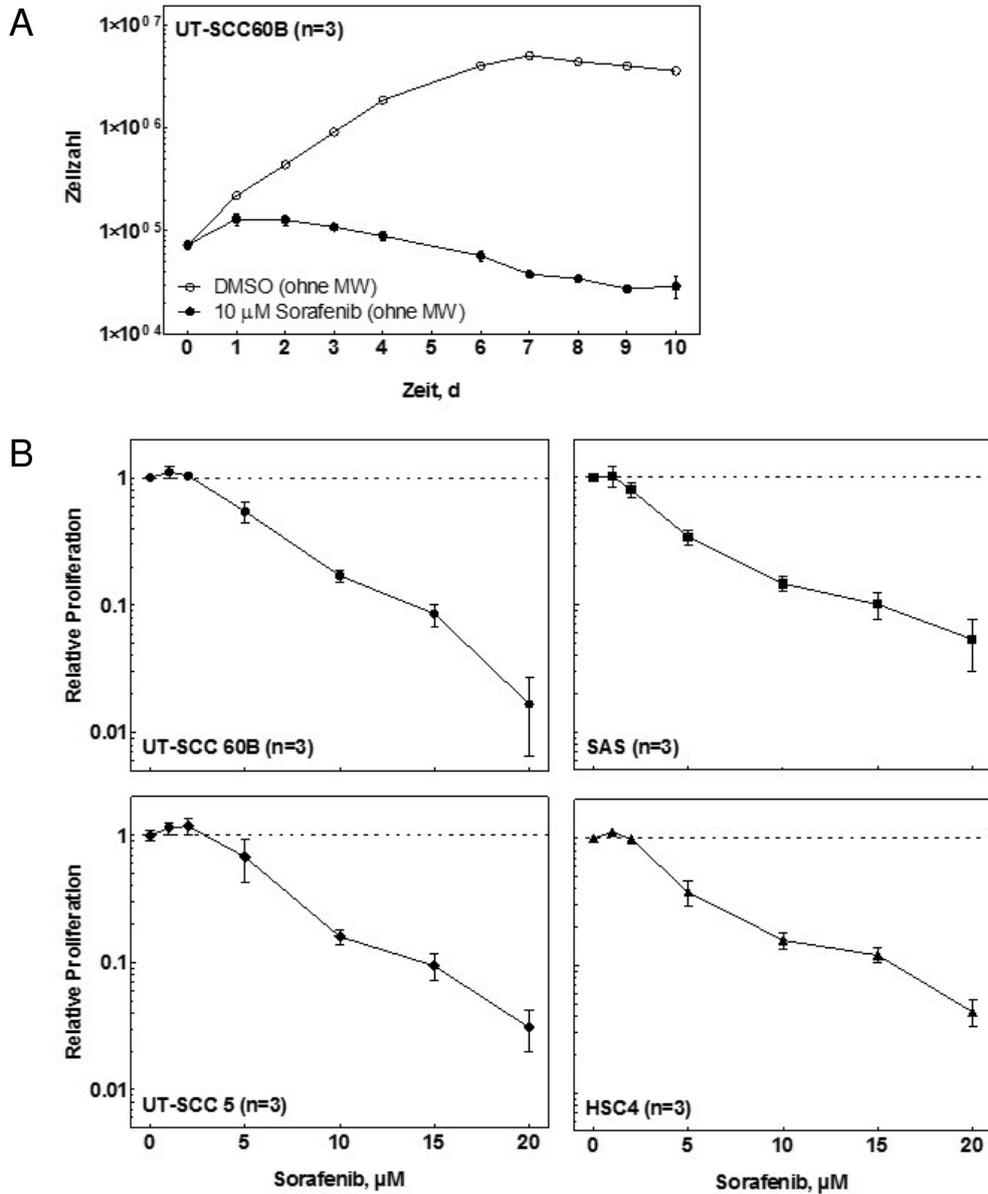


Abbildung 5.1 Einfluss einer kontinuierlichen Sorafenib-Behandlung auf die Proliferation von HNSCC-Zelllinien.

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden 1×10^5 Zellen ausgelegt und nach 24 h mit 10 μ M Sorafenib bzw. DMSO als Kontrolle behandelt (Tag 0). An den folgenden zehn Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. (A) Zellwachstum ohne Mediumwechsel (MW) von UT-SCC 60B Zellen. (B) Dosis-Effekt-Kurven erstellt nach drei Tagen mit verschiedenen Sorafenib-Konzentrationen. Dabei wurde die Zellzahl zunächst auf die jeweilige unbehandelte Probe am Tag 0 und anschließend auf die DMSO-behandelte Probe am Tag 3 normiert. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente mit dem Standardfehler (SEM).

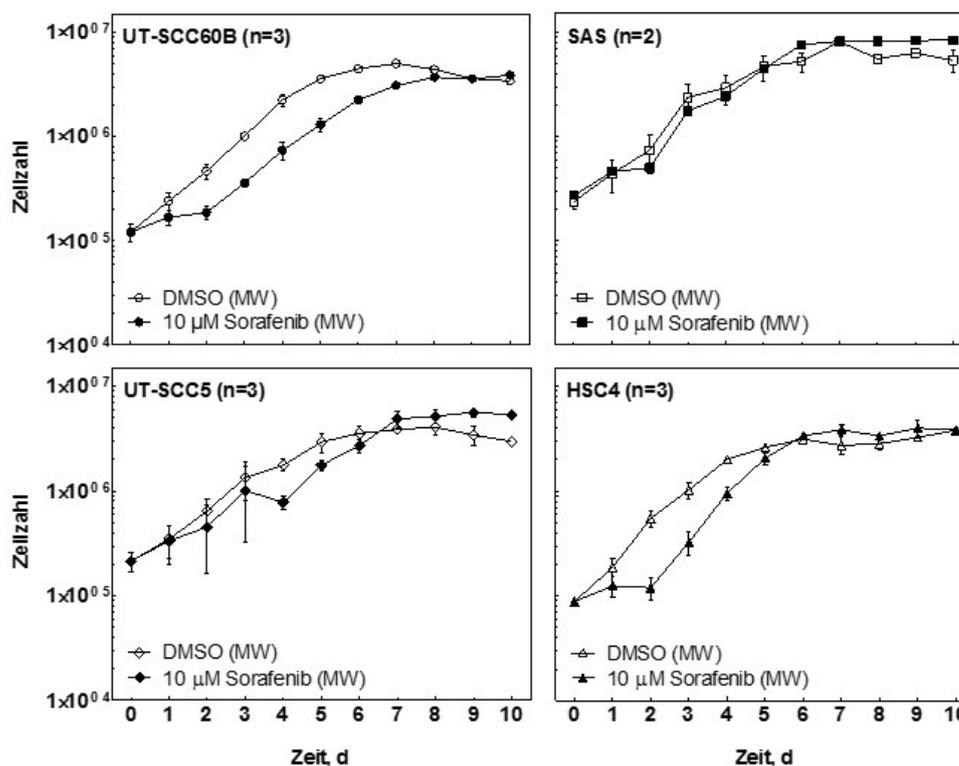


Abbildung 5.2 Einfluss einer 24-stündigen Sorafenib-Behandlung auf die Proliferation von HNSCC-Zelllinien.

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden 1×10^5 Zellen ausgelegt und nach 24 h mit 10 μM Sorafenib bzw. DMSO als Kontrolle behandelt (Tag 0). An den folgenden zehn Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Dargestellt sind mindestens zwei unabhängige Wachstumskurven aller vier HNSCC-Zelllinien nach einem Mediumwechsel 24 h nach Behandlung (Tag 1) inklusive SEM.

5.1.2 Zellinaktivierung

Der potentielle Einfluss von Sorafenib auf das Überleben der HNSCC-Zelllinien wurde mit Hilfe des Koloniebildungstests untersucht. Dabei liefert die Anwachsrate (*plating efficiency*; Abbildung 5.3 A) der Zelllinien – d.h. wie viele Zellen im Stande sind eine Kolonie zu bilden – eine Aussage über die Zytotoxizität von Sorafenib. Hierzu wurden die Tumorzelllinien unter *delayed plating*-Bedingungen untersucht, indem proliferierende Zellen mit 10 μM Sorafenib bzw. DMSO behandelt und nach 24 h re-platiert wurden. Die Auswertung der Koloniebildung erfolgte bei gleicher Koloniegröße, sodass aufgrund der Proliferationsinhibition Sorafenib-behandelte Zellen nachwachsen mussten. In Abbildung 5.3 B wurde für alle vier Zelllinien eine verminderte *plating efficiency* nach Sorafenib-Behandlung beobachtet. Dabei zeigten die UT-SCC 60B mit 44 % Abnahme und die HSC4 mit 46 % Abnahme den stärksten zytotoxischen Effekt durch Sorafenib. Die SAS und UT-SCC 5-Zellen hingegen wiesen einen geringeren zytotoxischen Effekt von Sorafenib auf, der bei 20 % bzw. 28 % Zellinaktivierung lag. Insgesamt verursacht Sorafenib in allen vier HNSCC-Zelllinien eine deutliche Zellinaktivierung.

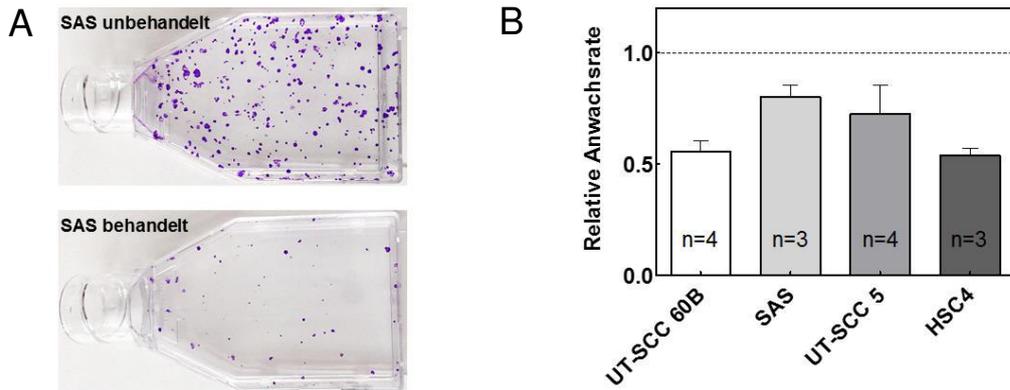


Abbildung 5.3 Zellinaktivierung von HNSCC-Zelllinien durch Sorafenib.

Mit Hilfe des Koloniebildungstests (*delayed plating*) wurde die zytotoxische Wirkung von Sorafenib ermittelt. (A) Exemplarische Darstellung der Koloniebildung von SAS-Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen (oben - unbehandelt; unten - behandelt). (B) Dargestellt wurden die Mittelwerte der Anwachsrate im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (gepunktete Linie). Es wurden mindestens drei unabhängige Fünffachbestimmungen durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem SEM.

5.2 Einfluss von Sorafenib auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass Sorafenib ohne Röntgenbestrahlung zu einer deutlichen Wachstumsinhibition sowie zu einer ausgeprägten Zellinaktivierung führt. Im Folgenden sollte die Wirkung von Sorafenib in Kombination mit Röntgenstrahlung näher untersucht werden. Hierfür wurde in gemeinschaftlicher Arbeit im Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie ein Kollektiv von 20 HNSCC-Zelllinien hinsichtlich der zellulären Strahlenempfindlichkeit sowie den Einfluss von Sorafenib auf diese Strahlenempfindlichkeit mittels Koloniebildungstest nach 0, 2, 4, 6 Gy bzw. 0, 3, 6 Gy untersucht (Abbildung 5.4). Um auszuschließen, dass reversible Zellzyklusarreste eine Strahlensensitivierung vortäuschen, wurden die Experimente unter *delayed plating*-Bedingungen durchgeführt [132, 133]. Aufgrund der Proliferationsinhibition wurde ein Nachwachsen von Sorafenib-behandelten Zellen, sowie von bestrahlten Zellen zugelassen, wodurch eine vergleichbare Koloniegröße und somit eine Auswertung des Zellüberlebens gewährleistet werden konnte. Die Analyse zeigte zunächst, dass die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der HNSCC-Zelllinien stark variiert (Abbildung 5.4 A), was bereits frühere Daten des Labors zeigten [134]. Anschließend wurden die Zelllinien in strahlenresistente bzw. strahlensensitive Linien unterteilt (Zellüberleben bei 6 Gy größer bzw. kleiner 10 %). Nach Sorafenib-Behandlung konnte eine Strahlensensitivierung in ca. ein Drittel der Zelllinien beobachtet werden (rote Markierung), sowohl bei strahlenresistenten als auch bei strahlenempfindlichen Zelllinien. Die strahlensensitivierbaren HNSCC-Zelllinien wurden im Folgenden als *Responder*-Zelllinien (rote Markierung, Abbildung 5.4 A) bzw. die nicht sensitivierbaren Zelllinien als *Non-Responder* (im Folgenden mit blauer Markierung) bezeichnet. Teile dieser Ergebnisse wurden bereits unter Laban *et al.* und Möckelmann *et al.* publiziert [135, 136].

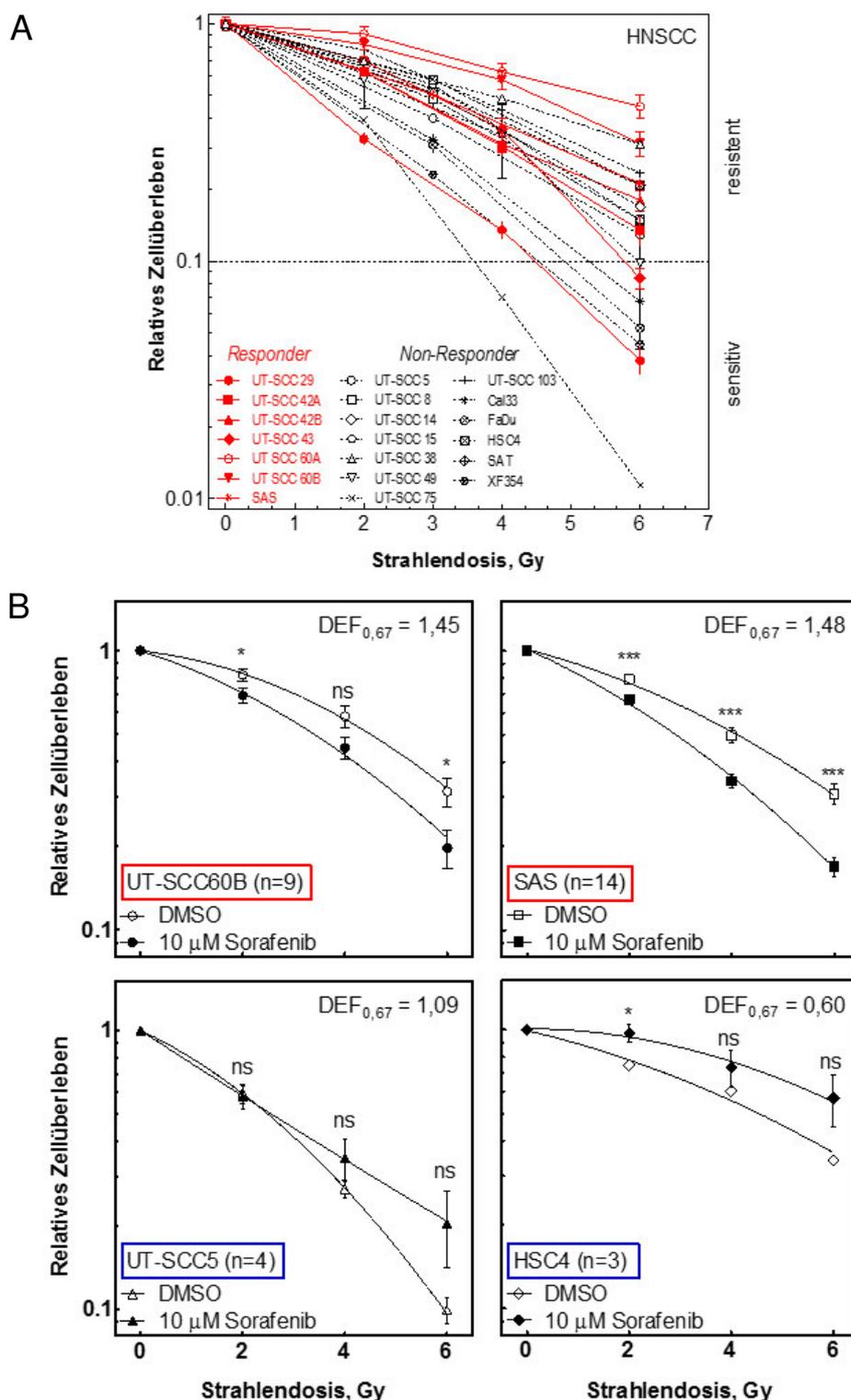


Abbildung 5.4 Einfluss von Sorafenib auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von HNSCC-Zelllinien. Mittels Koloniebildungstest wurde das Zellüberleben von proliferierenden Zellen nach Bestrahlung mit und ohne Sorafenib-Behandlung untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit 10 μM Sorafenib bzw. DMSO behandelt und nach 2 h mit 0, 2, 4 und 6 Gy bzw. 0, 3 und 6 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen neu ausplattiert (*delayed plating*) und die Koloniebildung nach 6 - 14 Tagen bestimmt. (A) Zelluläre Strahlenempfindlichkeit von einem Kollektiv von 20 HNSCC-Zelllinien. Rot markierte Zelllinien wurden durch Sorafenib strahlensensitiviert (*Responder*), schwarz markierte Zelllinien nicht (*Non-Responder*). (B) Relatives Zellüberleben zweier *Responder* (SAS, UT-SCC 60B) und zweier *Non-Responder* (HSC4, UT-SCC 5). Die Kurven wurden gefittet (nichtlineare Regression) und der *dose enhancement factor* (DEF_{0,67}) berechnet. Es wurden mindestens drei unabhängige Fünffachbestimmungen durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Statistische Signifikanz: * p < 0,05; *** p < 0,001; ns nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger Studentischer t-Test).

Für die weiteren Arbeiten wurden zwei strahlenresistente *Responder*-Linien (SAS, UT-SCC 60B) und zwei strahlenresistente *Non-Responder*-Linien (HSC4, UT-SCC 5) ausgewählt. In Abbildung 5.4 B ist der Einfluss von Sorafenib auf die Strahlenempfindlichkeit dieser vier Zelllinien und der entsprechende Dosis-Verstärkende-Effekt (engl. *dose enhancement factor*, DEF) von Sorafenib abgebildet. Der DEF dient im Wesentlichen als Beschreibung für die Wirkung von Sorafenib auf das zelluläre Überleben nach Bestrahlung. Hierbei wird die relative Strahlendosis betrachtet, die nötig ist um ein Drittel der Zellen zu inaktivieren (zelluläre Überleben von 67 %), wobei ein $DEF_{0,67} < 1$ eine Strahlenresistenz mit Sorafenib beschreibt, während $DEF_{0,67} > 1$ eine Strahlensensitivierung bedeutet. Beide *Responder*-Zelllinien SAS und UT-SCC 60B zeigten einen $DEF_{0,67} > 1$ ($DEF_{0,67}$ von 1,48 bzw. 1,45), was für eine deutliche Strahlensensitivierung durch Sorafenib bei 67 % Zellüberleben spricht. Darüber hinaus sind diese beiden *Responder*-Zelllinien unter den strahlenresistenten Zelllinien die mit dem größten DEF (Daten nicht gezeigt). Die *Non-Responder*-Zelllinie UT-SCC 5 zeigten zwar bei 67 % Zellüberleben einen DEF von 1,09, jedoch wurde im weiteren Verlauf eher eine Strahlenresistenz beobachtet (Abbildung 5.4 B). Die *Non-Responder*-Zelllinie HSC4 hat einen $DEF_{0,67}$ von 0,60, was einer Sorafenib-induzierten Strahlenresistenz entspricht.

Insgesamt zeigt die Untersuchung zur Wirkung von Sorafenib auf die Strahlenempfindlichkeit der HNSCC-Zelllinien, dass ein Drittel der HNSCC-Zelllinien durch Sorafenib strahlensensitivierbar sind. Dies schließt strahlenresistente Zelllinien mit ein. Da aber auch einige Zelllinien eine Sorafenib induzierte Strahlenresistenz zeigen, müssten für einen klinischen Einsatz prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf Sorafenib verfügbar sein. Aus diesem Grund sollen die Mechanismen für die Strahlensensitivierung am Beispiel der zwei *Responder*-Zelllinien SAS und UT-SCC 60B und den zwei *Non-Responder*-Zelllinien HSC4 und UT-SCC 5 untersucht werden.

5.3 Mechanismus der Sorafenib-induzierten Strahlensensibilisierung

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass nur ca. ein Drittel der Zelllinien durch Sorafenib strahlensensitiviert werden. Welche zugrundeliegenden Mechanismen zu einer Strahlensensitivierung führen, soll anhand zwei strahlenresistenter *Responder*-Zelllinien (SAS, UT-SCC 60B) und zwei strahlenresistenter *Non-Responder*-Zelllinien (HSC4, UT-SCC 5) entschlüsselt werden.

Mehrere biologische Prozesse können für die beobachtete Strahlensensibilisierung von HNSCC-Zelllinien durch Sorafenib verantwortlich sein, wie z.B. I) eine primäre Apoptose-Induktion, II) einen permanenten Zellzyklusarrest und III) eine Inhibition der DNA-DSB-Reparatur, welche alle im Folgenden untersucht werden.

5.3.1 Auswirkung von Sorafenib auf die Apoptoserate

In verschiedenen Tumorentitäten wurde eine anti-tumorigene Wirkung von Sorafenib beschrieben, die auf eine verstärkte Induktion der Apoptose zurückgeführt wurde [115]. Ob die beobachtete Strahlensensitivierung durch Sorafenib durch eine induzierte Apoptose hervorgerufen wird, wurde im Folgenden untersucht.

Apoptose ist ein biologischer Prozess von humanen Zellen, um kontrolliert abzusterben. Der programmierte Zelltod kann durch eine Kaskade von proteolytischen Enzymen, den sogenannten Caspasen (engl. *cysteiny-l-aspartate specific protease*), eingeleitet werden. Caspasen liegen als inaktive Pro-Caspasen in der Zelle vor und werden durch Autoproteolyse aktiviert. Aktive Caspasen spalten daraufhin zelleigene Proteine, die zum Abbau der Zelle und damit zum Zelltod führen können. Dies wurde sich zu Nutze gemacht und die Caspaseaktivität in den *Responder*-Zelllinien untersucht. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Staurosporin, ein Multikinaseinhibitor mit Apoptose-induzierender Wirkung, führte in UT-SCC 60B zu einem deutlichen Anstieg der Caspase-positiven Zellen (P2-Gate, Abbildung 5.5 A unten). Hingegen scheinen die SAS-Zellen aufgrund der niedrigen Apoptose-Induktion nach Staurosporin-Behandlung Apoptose resistent zu sein (Abbildung 5.5 B unten). Nach Sorafenib-Behandlung, Bestrahlung oder Doppelbehandlung wurde in

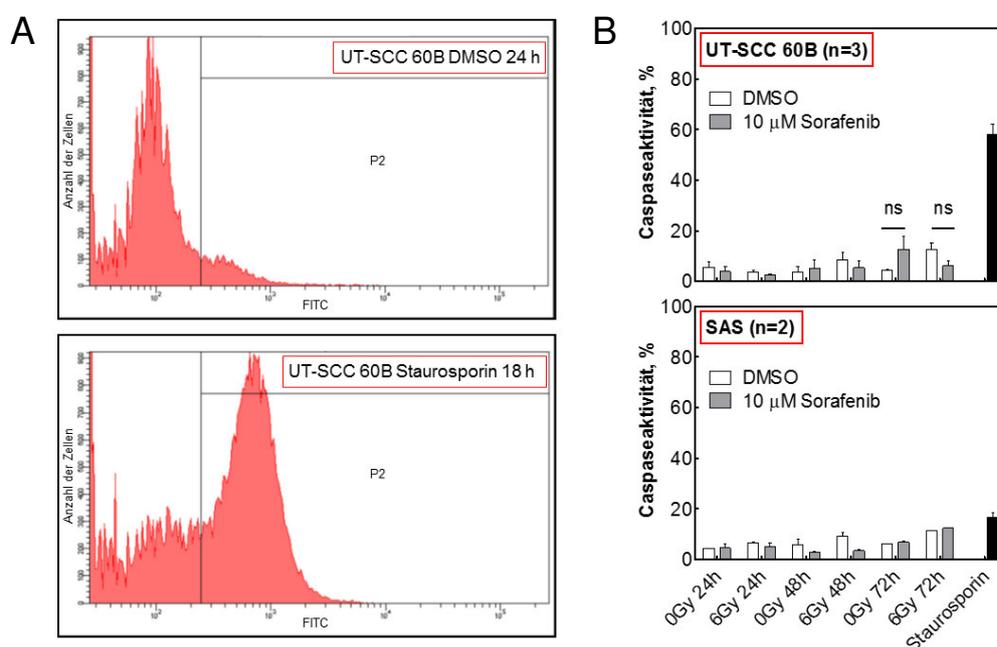


Abbildung 5.5 Einfluss von Sorafenib auf die Apoptose-Induktion.

Um die Apoptose in Tumorzellen zu untersuchen, wurde die Caspaseaktivität mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurden 1×10^5 Zellen ausgelegt, nach 24 h mit DMSO bzw. $10 \mu\text{M}$ Sorafenib behandelt und bestrahlt (0, 6 Gy). Die behandelten Zellen wurden nach 24, 48 bzw. 72 h geerntet und die aktiven Caspasen mittels *FAM-FLICA® in vitro Caspase Detection Kit* angefärbt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen 18 h mit Staurosporin behandelt. (A) Die Detektion des Fluoreszenzsignals (FITC) wurde anhand der UT-SCC 60B schematisch dargestellt. DMSO 24 h (oben) und Staurosporin (unten). Die apoptotischen Zellen befinden sich in dem P2-Gate und weisen eine erhöhte Fluoreszenz auf. (B) Caspaseaktivität der *Responder*-Zelllinien SAS und UT-SCC 60B. Es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem SEM. (ns nicht signifikant)

beiden *Responder*-Zelllinien nur geringe Caspaseaktivität bis einschließlich 72 h nach Behandlung gemessen.

Insgesamt waren die Apoptoseraten sehr gering (< 20 %) und tragen somit nicht maßgeblich zur Zellinaktivierung nach Bestrahlung und Sorafenib bei. Zudem ist fraglich, ob die Apoptose maßgeblich zur Reduktion der *plating efficiency* beiträgt.

5.3.2 Auswirkung von Sorafenib auf den Zellzyklus

Bisherige Arbeiten aus der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Zellzyklusarreste eine große Rolle bei der Strahlensensitivierung von Tumorzelllinien spielen können [132, 133]. Ob auch die beobachtete Strahlensensitivierung durch Sorafenib auf mögliche Zellzyklusarreste zurückzuführen ist, soll daher die Analyse des Zellzyklus in den *Responder*-Zelllinien liefern. Hierzu wurde zunächst die Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung mit und ohne Sorafenib mittels Durchflusszytometrie – ohne Mediumwechsel – untersucht (Abbildung 5.6 A/B).

Aus Abbildung 5.6 B geht hervor, dass proliferierende UT-SCC 60B Zellen eine Zellzyklusverteilung von ca. 50 %, 30 % und 20 % (G1-, S- und G2-Phase) haben. Die SAS-Zellen zeigten wiederum eine Zellzyklusverteilung von ca. 40 %, 45 % und 15 % (G1-, S- und G2-Phase). Mit Verlauf der Zeit zeigten beide DMSO-behandelten (0 Gy) Zelllinien eine Zunahme der G1-Phase-Zellen. Dieser Anstieg war bei den SAS deutlich stärker ausgeprägt als bei den UT-SCC 60B und ist zurückzuführen auf die Zell-Zell-Kontakte, die sich mit der Zeit (bis 96 h) ausbilden. Nach 6 Gy Bestrahlung zeigten beide DMSO-behandelten Zelllinien innerhalb der ersten 12 h eine starke Abnahme der G1-Phase-Zellen bei gleichzeitiger Zunahme der S- bzw. G2-Phase-Zellen. Diese normalisierte sich innerhalb der nächsten 12 bis 24 h, sodass bis einschließlich 96 h eine vergleichbare Zellzyklusverteilung wie zum Zeitpunkt 0 h detektiert wurde. Mit Sorafenib-Behandlung (0 Gy) zeigten beide Zelllinien einen leichten Anstieg der G1-Phase-Zellen innerhalb der ersten 24 h, jedoch sank dieser Zellanteil im weiteren Zeitverlauf wieder auf den Ausgangswert (0 h) ab. Mit Bestrahlung wurde bei beiden Sorafenib-behandelten Zelllinien eine deutlich Abnahme der G1-Phase-Zellen beobachtet, die mit einer ausgeprägten Akkumulation von G2-Phase-Zellen (bis einschließlich 96 h) einherging. Der Anteil der akkumulierten G2-Phase-Zellen war in den SAS stärker ausgeprägt als bei den UT-SCC 60B. In Abbildung 5.6 C ist der Einfluss von 6 Gy Bestrahlung für die DMSO- bzw. Sorafenib-behandelten Zellen deutlicher dargestellt. Während beide DMSO-behandelten und bestrahlten Zelllinien innerhalb der ersten 12 h in der S/G2-Phase akkumulierten und anschließend der Ausgangszustand wieder erreicht wurde, akkumulierten die Sorafenib-behandelten und bestrahlten Zellen über den gesamten Zeitraum in der S/G2-Phase.

Anhand der Zellzyklusverteilung wurde für beide *Responder*-Zelllinien deutlich, dass Sorafenib und Bestrahlung zu einer S/G2-Phase Akkumulation führte. Dieser Arrest kann transient sein, um den Zellen Zeit für die DSB-Reparatur zu geben oder permanent sein und zur Zellinaktivierung führen [36].

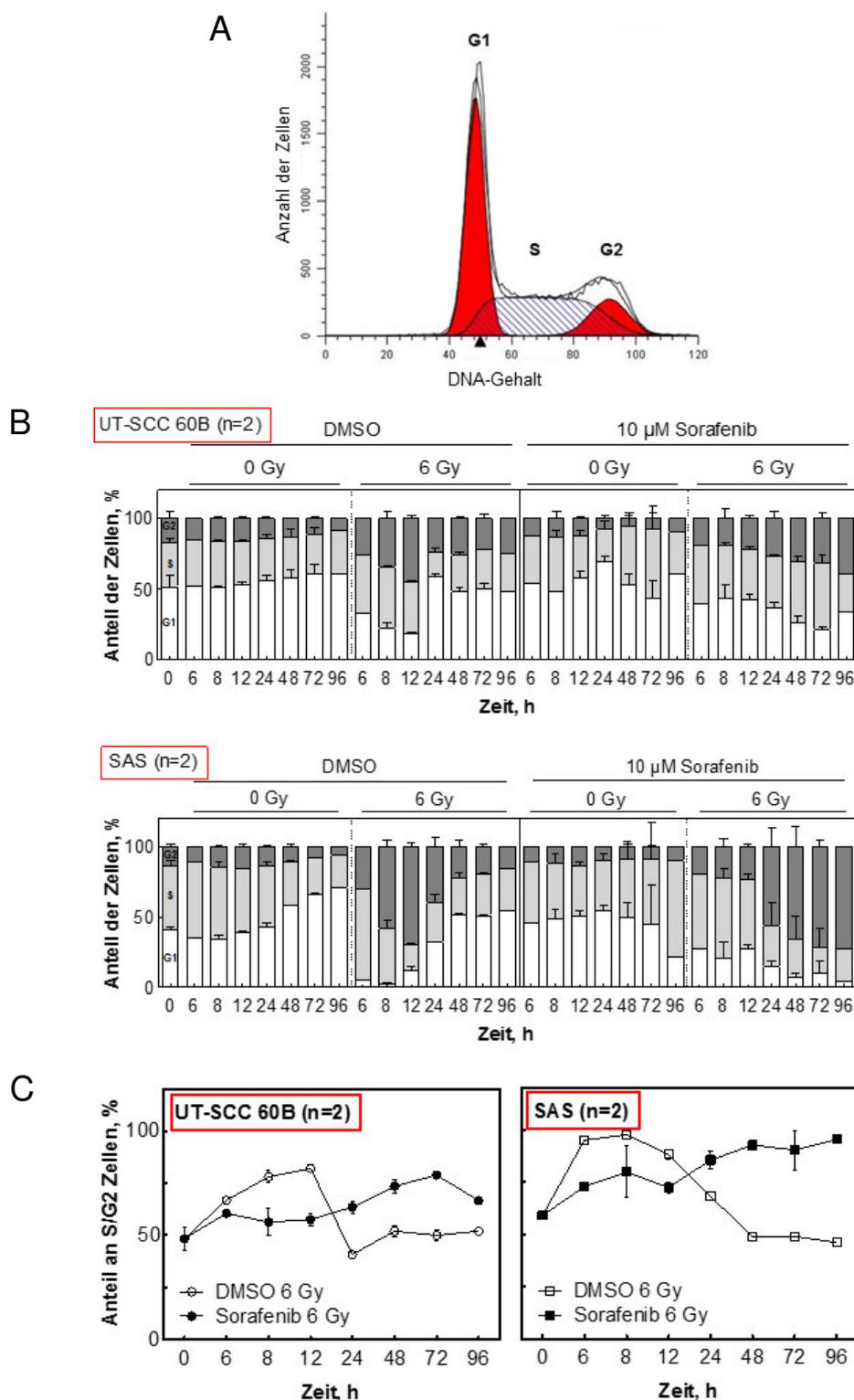


Abbildung 5.6 Einfluss von Sorafenib auf den Zellzyklus.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinien untersucht. Hierzu wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib behandelt und nach 2 h bestrahlt (0, 6 Gy). Die Proben wurden nach den entsprechenden Zeitpunkten fixiert, die DNA mittels PI-Lösung angefärbt und der DNA-Gehalt gemessen. (A) Schematische Darstellung der Zellzyklusverteilung. Einfacher DNA-Gehalt G1-Phase, doppelter DNA-Gehalt G2-Phase, der dazwischen liegende DNA-Gehalt wurde der S-Phase zugeordnet. Auswertung mit Software ModFit LT™. (B) Quantitative Analyse der Zellzyklusverteilung der *Responder*-Zelllinien (SAS, UT-SCC 60B) nach den jeweiligen Zeitpunkten (0, 6, 8, 12, 24, 48, 72 und 96 h). (C) Prozentualer Anteil der Zellen in S/G2-Phase von SAS und UT-SCC 60B nach Bestrahlung und den jeweiligen Zeitpunkten (0, 6, 8, 12, 24, 48, 72 und 96 h). Dargestellt wurden zwei unabhängige Experimente. Fehlerbalken entsprechen dem SEM.

Um zu untersuchen, ob diese S-/G2-Phase-Akkumulation ein transienter oder permanenter Arrest ist, wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. Sorafenib behandelt und bestrahlt und nach 24 h ohne Inhibitor wieder neu ausgelegt (*delayed plating*-Bedingungen). Mit der Zugabe des Basenanalogs EdU, das während der S-Phase in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird, wird die Unterscheidung von proliferierenden (EdU-positiven) Zellen und arretierten (EdU-negativen) Zellen ermöglicht.

Diese Unterteilung ermöglicht die Quantifizierung von proliferierenden (EdU-positiven) G1-Phase-Zellen im Quadranten Q1 sowie die proliferierenden (EdU-positiven) S/G2-Phase-Zellen in Q2, den arretierten (EdU-negativen) G1-Phase-Zellen in Q3 und letztendlich den arretierten (EdU-negativen) S/G2-Phase-Zellen in Q4 (Abbildung 5.7 A). Der Fokus in diesem Experiment lag auf der Untersuchung früher Zellzyklusarreste, also solche Zellzyklusarreste, die 24 h nach Bestrahlung der Zellen vorkommen. Daher wurde EdU nach dem Ausplattieren hinzugegeben und 24 bzw. 48 h nach Bestrahlung wurden die Proben fixiert (entspricht den Zeitpunkten 48 und 72 h) und die Zellzyklusverteilung der Zellen analysiert (Abbildung 5.7).

Beide *Responder*-Zelllinien (SAS, UT-SCC 60B) zeigten nach 48 und 72 h keine deutlichen G1- bzw. S/G2-Arreste (Abbildung 5.7 B/C). Einzig die UT-SCC 60B-Zellen zeigten nach Bestrahlung einen leichten G1- und S/G2-Phasearrest (weniger als 20 %), welcher durch Sorafenib jedoch nicht verstärkt

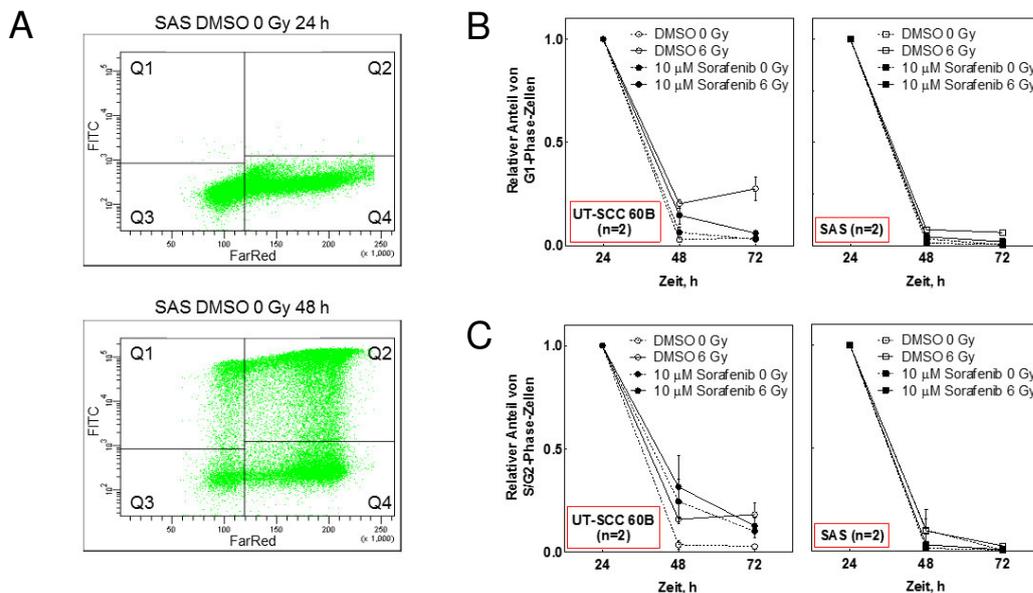


Abbildung 5.7 Einfluss von Sorafenib auf frühe permanente Zellzyklusarreste.

Die Analyse eines Zellzyklusarrests erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden proliferierende Zellen für 2 h mit 10 μ M Sorafenib bzw. DMSO behandelt, bestrahlt (0,6 Gy) und nach 24 h re-plattiert (24 h Probe; *delayed plating*). Nach 4-6 h wurde mit 10 μ M EdU behandelt und nach weiteren 24 bzw. 48 h wurden die Proben fixiert (48 bzw. 72 h Probe), gefärbt und gemessen. (A) Exemplarische Darstellung von DMSO-behandelte (0 Gy) SAS-Zellen nach 24 und 48 h. Aufgetragen ist die EdU-Färbung (FITC, grünes Fluoreszenzsignal) gegenüber dem DNA-Gehalt (FarRed, rotes Fluoreszenzsignal). Quadranten: Q1: EdU-positiv (proliferierende) Zellen mit einfachen DNA-Gehalt (G1-, frühe S-Phase); Q2: EdU-positiv (proliferierende) Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt (späte S/G2-Phase); Q3: EdU-negativ (arretierte) Zellen mit einfachen DNA-Gehalt (G1-Phase); Q4: EdU-negativ (arretierte) Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt (S/G2-Phase). (B) Quantifizierung der arretierten G1-Phase-Zellen 48 bzw. 72 h nach Behandlung der *Responder*-Zelllinien (SAS, UT-SCC 60B). (C) Quantifizierung der arretierten S/G2-Phase-Zellen 48 bzw. 72 h nach Behandlung der *Responder*-Zelllinien (SAS, UT-SCC 60B). Dargestellt wurden zwei unabhängige Experimente. Fehlerbalken entsprechen dem SEM.

wurde. Vielmehr führt Sorafenib zu einem langsamen Auslaufen der Zellen aus der G1- bzw. S/G2-Phase.

Obwohl bestrahlte UT-SCC 60B-Zellen einen leichten G1- bzw. S/G2-Phase-Arrest nach 48 bzw. 72 h zeigten, ergab die Untersuchung der *Responder*-Zelllinien keinen Hinweis auf einen permanenten Zellzyklusarrest durch Sorafenib-Behandlung. Daher ist die Induktion von frühen permanenten Zellzyklusarresten als Ursache für die beobachtete Strahlensensitivierung auszuschließen.

5.3.3 Auswirkung von Sorafenib auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Bisher konnte eine verstärkte Apoptose und die Induktion von frühen permanenten Zellzyklusarresten als Ursachen für die Strahlensensibilisierung durch Sorafenib nicht bestätigt werden. Transiente G2-Arreste deuten aber auf Defekte bei der DNA-Reparatur hin [137]. Deshalb wurden die Zellen als nächstes hinsichtlich ihrer Reparaturfähigkeit von strahlungsinduzierten DSB untersucht, die – bleiben diese erhalten – zur Inaktivierung der Tumorzellen führen können [36]. Zunächst wurde die DSB-Reparatur direkt durch die Analyse von Chromosomen-Aberrationen untersucht.

5.3.3.1 Chromosomen-Aberration

Das verminderte Zellüberleben nach Bestrahlung kann auf eine Fehlreparatur der strahlungsinduzierten DSB zurückgeführt werden. Aus diesen fehlreparierten DSB können chromosomale Aberrationen entstehen, die zu letalen Ereignissen und damit zur Zellinaktivierung führen können [138]. Die Art der Chromosomen-Veränderung kann dabei Rückschlüsse liefern, in welcher Zellzyklusphase die Fehlreparatur stattfand. So werden numerische Veränderungen durch fehlreparierte DSB in der G1-Phase hervorgerufen, wohingegen strukturelle Chromosomen-Veränderungen der späten S- bzw. G2-Phase zugeordnet werden [139]. Der Nachweis von Chromosomen-Aberrationen erfolgt direkt mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie.

Für die Analyse der Chromosomen-Aberrationen wurden die *Responder*-Zelllinien für zwei Stunden mit DMSO bzw. Sorafenib behandelt und anschließend bestrahlt. Nach weiteren 24 h wurden die Metaphasen isoliert. In Abbildung 5.8 A ist eine Metaphase der SAS-Zellen dargestellt, die sowohl eine numerische Aberration (1, G1-Schaden) als auch eine strukturelle Aberration (2, S/G2-Schaden) aufweist. Die häufig beschriebene Aneuploidie von Tumorzellen, konnte auch bei beiden *Responder*-Zelllinien beobachtet werden [140]. So zeigten die SAS-Zellen durchschnittlich 62 Chromosomen, während die UT-SCC 60B 43 Chromosomen aufwies (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Metaphasen-Chromosomen zeigte, dass bereits die Anzahl der Metaphasen in den Sorafenib-behandelten SAS und UT-SCC 60B-Zellen stark vermindert war (Daten nicht gezeigt). Diese verminderte Anzahl der Metaphasen ist auf den anti-proliferativen Effekt von Sorafenib zurückzuführen (siehe Abschnitt 5.1.1). Um jedoch Metaphasen überhaupt analysieren zu können, müssen die Zellen durch den Zellzyklus laufen und in die Mitose eintreten. Das dies wiederum mit 10 μ M Sorafenib nicht

möglich ist, zeigte die Akkumulation der Zellen in der S/G2-Phase nach Sorafenib-behandelten und bestrahlten SAS und UT-SCC 60B-Zellen (siehe Abschnitt 5.3.2). Um eine Proliferation zu ermöglichen wurde die Konzentration von Sorafenib auf 5 μM reduziert (siehe Abschnitt 5.1.1). Mit diesen 5 μM wurde bei beiden *Responder*-Zelllinien ebenfalls eine Strahlensensitivierung beobachtet, wie es in Abbildung 5.8 B für UT-SCC 60B gezeigt ist. Trotz der Reduktion der Sorafenib-Konzentration verhinderte der anti-proliferative Effekt von Sorafenib jedoch weiterhin eine akkurate Analyse der Metaphasen-Chromosomen, sodass eine Mitose-unabhängige Form der Chromosomen-Aberration angewendet wurde, die *Premature Chromosome Condensation*.

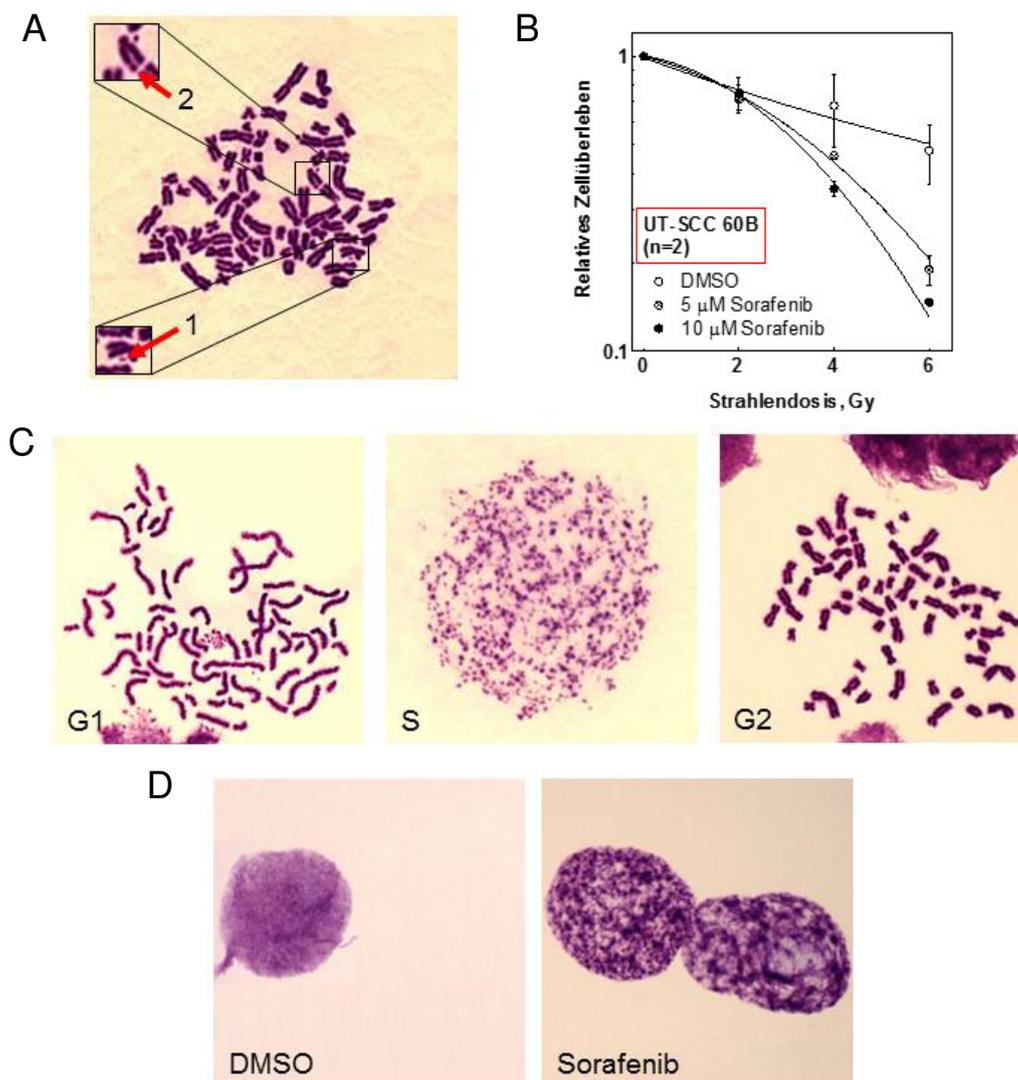


Abbildung 5.8 Analyse der DNA-DSB-Reparatur mittels Chromosomen-Aberration.

Die Detektion struktureller und numerischer Veränderungen von Chromosomen gibt Auskunft über die DNA-DSB-Reparatur. Hierzu wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. Sorafenib für 2 h behandelt und anschließend bestrahlt. (A) Exemplarische Darstellung von Metaphasen-Chromosomen von DMSO-behandelten und bestrahlten SAS-Zellen. 1 - azentrisches Chromosom (numerische Aberration; G1-Schaden); 2 - Bruchstelle innerhalb eines Schwesterchromatids (strukturelle Aberration; G2-Schaden). (B) Zelluläres Überleben nach Sorafenib-Behandlung. Proliferierende UT-SCC 60B wurden für 2 h mit DMSO bzw. 5 μM /10 μM Sorafenib behandelt und mit 0, 2, 4 und 6 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen re-platiert (*delayed plating*). Die Kurven wurden gefittet (nichtlineare Regression). Es wurden zwei unabhängige Fünffachbestimmungen durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem SEM. (C) Exemplarische Darstellung von Chromosomen mit der *Premature Chromosome Condensation* (PCC)-Methode von SAS-Zellen aus den entsprechenden Zellzyklusphasen (G1, S und G2). (D) Besonderheit der Zellkernstruktur von SAS-Zellen nach 10 μM Sorafenib-Behandlung (PCC-Methode).

5.3.3.2 *Premature Chromosome Condensation*

Mit Hilfe der *Premature Chromosome Condensation* (PCC)-Methode kann eine Kondensation der Chromosomen in jeder Zellzyklusphase erreicht werden (Abbildung 5.8 C) [141], wodurch auch die Analyse nicht-proliferierender Zellen ermöglicht wird. Die Chromosomen-Kondensation wird durch Calyculin A induziert. Die Analyse der Chromosomen nach Sorafenib-Behandlung und Bestrahlung ergab im Vergleich zur Metaphasen-Analyse eine bessere Ausbeute von kondensierten Chromosomen, jedoch blieb die Anzahl auswertbarer Zellkerne deutlich zu niedrig um eine vollständige Analyse durchzuführen. Dies lag an unvollständig kondensierten Zellkernstrukturen, die häufig nach Behandlung mit 10 μM Sorafenib beobachtet wurden (Abbildung 5.8 D). Deshalb wurde die Behandlungszeit mit Calyculin A auf 60 min verlängert, jedoch wurden die Chromosomen zum Teil so stark kondensiert, dass eine Analyse besonders der strukturellen Veränderungen nicht gegeben war.

Da sowohl die Analyse der Metaphasen-Chromosomen, als auch der PCC-Chromosomen nach Sorafenibgabe nicht durchführbar waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Analysemethode zur Untersuchung der DNA-DSB-Reparatur verwendet, die Analyse der residuellen Reparaturkomplexe.

5.3.3.3 Residuelle Reparaturkomplexe

Um eine Inhibition der DSB-Reparatur durch Sorafenib zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit residuelle doppel-positive $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ -Reparaturkomplexe analysiert. Ionisierende Strahlung führt zur Induktion von DSB, die durch verschiedene Mechanismen repariert werden können. Bleiben jedoch die DSB unrepariert, wird von residuellen DSB gesprochen, die wiederum ein Maß für die Strahlenempfindlichkeit sein können. Dabei stellt die Analyse von phosphorylierten bzw. rekrutierten Proteinen nach Schadensinduktion eine indirekte Untersuchungsmethode der DSB dar. In dieser Arbeit wurden proliferierende Zellen mit DMSO bzw. 10 μM Sorafenib behandelt und bestrahlt (0, 6 Gy) und nach 24 h re-platiert (*delayed plating*).

In Abbildung 5.9 A sind residuelle Reparaturkomplexe (Foci) von UT-SCC 60B 48 h nach Behandlung mit DMSO bzw. Sorafenib und 6 Gy Bestrahlung dargestellt. Deutlich zu sehen ist hierbei, dass Sorafenib eine höhere Anzahl residueller γH2AX (rote)-Foci, 53BP1 (grüne)-Foci und doppel-positive $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ (gelbe)-Foci aufweist als die DMSO-behandelten Zellen. Aus Abbildung 5.9 B wird ersichtlich, dass nach Sorafenib-Behandlung und Bestrahlung (6 Gy) sowohl bei den *Respondern* (SAS, UT-SCC 60B) als auch bei den *Non-Respondern* (HSC4, UT-SCC 5) deutlich mehr residuelle doppel-positive $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ -Foci pro Zelle beobachtet wurden. Diese zum Teil signifikanten Veränderungen nach Sorafenib-Behandlung deuten eine beeinträchtigte DNA-DSB-Reparatur, sowohl in *Respondern*, als auch in *Non-Respondern* an. Dieser Effekt korreliert allerdings nicht mit der Strahlensensibilisierung, da eine tatsächlich vorhandene schlechtere Reparatur unausweichlich zur Zellinaktivierung und damit zur Strahlensensitivierung führt. Es ist jedoch unmöglich, dass eine verminderte DSB-Reparatur zu einer Strahlenresistenz führt, wie sie bei den

Non-Respondern nach 6 Gy Bestrahlung vorliegt. Vergleichbare Diskrepanzen konnten bereits nach EGFR-Inhibition in HNSCC-Zelllinien beobachtet werden [132]. Obwohl die Analyse der residuellen Reparatur-Foci als Marker für die DNA-DSB-Reparatur in der strahlenbiologischen Forschung etabliert ist, verdeutlichen diese und die Daten aus Abbildung 5.9 B, dass die Detektion von residuellen Reparatur-Foci nicht der geeignete Marker für die Analyse der DNA-DSB-Reparatur nach molekularem *Targeting* ist. Aus diesem Grund und weil die Analyse der Reparatur-Foci eine indirekte Methode ist, erfolgte der Nachweis von DNA-Schäden mit einer weiteren direkten Analyseemethode, der Konstant-Feld-Gelelektrophorese.

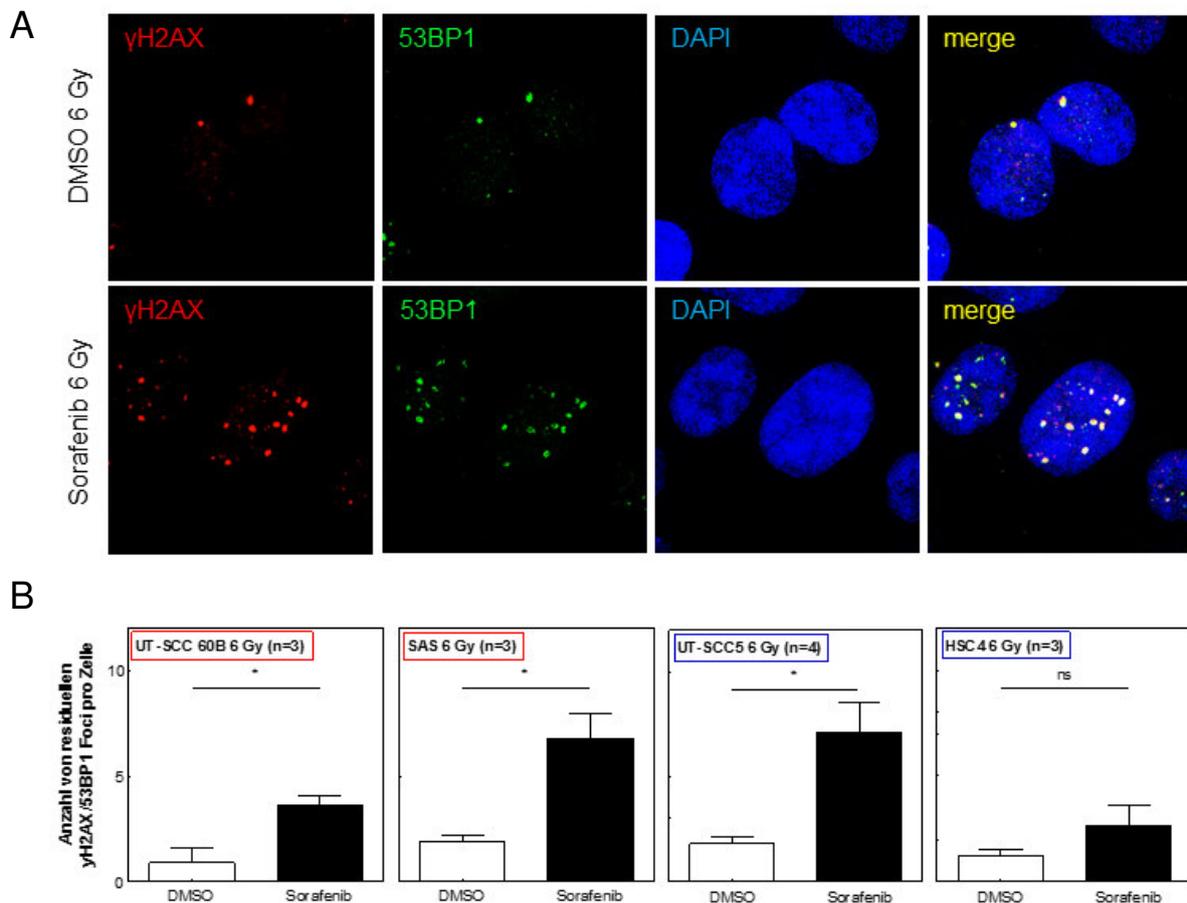


Abbildung 5.9 Einfluss von Sorafenib auf die DNA-DSB-Reparatur: Residuelle Reparatur-Foci. Die Analyse der residuellen DSB erfolgte 48 h nach Bestrahlung unter *delayed plating*-Bedingungen. (A) Optischer Vergleich der Reparatur-Foci von Sorafenib (10 μ M) bzw. DMSO behandelten UT-SCC 60B Zellen. Dargestellt wurden γ H2AX- (rot) und 53BP1-Foci (grün), die Überlappung (gelb, merge) und die Zellkerne (blau, DNA-Färbung mit DAPI). (B) Quantifizierung der residuellen doppel-positiven γ H2AX/53BP1-Foci 48 h nach Bestrahlung. Angegeben wurden die 6 Gy-bestrahlten Proben abzüglich der Anzahl der Foci von den entsprechenden unbestrahlten Proben. Mindestens drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt, wobei jeweils 100 intakte Zellkerne ausgezählt wurden. Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$; ns nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger Studentischer t-Test).

5.3.3.4 Konstant-Feld-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Konstant-Feld-Gelelektrophorese (CFGE) werden DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgetrennt und diese Fragmente anschließend quantifiziert. Da die Auftrennung der DNA-Moleküle durch eine konstant niedrige Spannung in gleicher Richtung erfolgt (Abbildung 5.10 A), wird eine einzige DNA-Bande mit unterschiedlich großen DNA-Fragmenten generiert [142, 143]. Ungeschädigte DNA-Moleküle bzw. geschädigte DNA-Fragmente größer als 8 Mbp bleiben in den Agarose-Taschen zurück (roter Rahmen, Nummer 1, Abbildung 5.10 B), während geschädigte DNA-Fragmente (kleiner als 8 Mbp bis 5×10^4 bp) durch das elektrische Feld wandern (roter Rahmen, Nummer 2).

Zunächst wurde die optimale Strahlendosis für die Induktion der DNA-Schäden für die einzelnen HNSCC-Zelllinien bestimmt (Abbildung 5.10 C). Es zeigte sich, dass unbestrahlte UT-SCC 60B-Zellen ein relativ hohes Hintergrundsignal von 0,2 (relative DNA-Schädigung) haben, was auf ein hohes Level an Basalschäden hinweist. Mit ansteigender Strahlendosis stieg die relative Menge an fragmentierter DNA auf ca. 0,45 (15 Gy). Mit höheren Strahlendosen (>15 Gy) wurde kein weiterer Anstieg der Intensität der unteren DNA-Bande beobachtet, stattdessen wurde ein Plateau erreicht. Eine ähnliche Schadensinduktion wurde ebenfalls bei den drei weiteren HNSCC-Zelllinien beobachtet. Jedoch zeigten diese ein z.T. deutlich höheres Hintergrundsignal (UT-SCC 5: 0,28; SAS: 0,33; HSC4: 0,35). Obwohl durch höhere Strahlendosen mehr DSB induziert werden können, kann diese Zunahme der DNA-Fragmente mit der CFGE nicht aufgelöst werden. Deshalb wurden weiteren Versuche zur DNA-DSB-Reparatur mit 15 Gy Strahlendosis durchgeführt.

Aus Abbildung 5.10 D wird deutlich, dass die Schadensinduktion nach 15 Gy für DMSO- bzw. Sorafenib-behandelte UT-SCC 60B-Zellen gleich ist (relative DNA-Schädigung von 0,27; nach Abzug des Hintergrundsignals). Innerhalb der ersten 15 Minuten wurde bei der Kontrollprobe eine Abnahme der DNA-Fragmente beobachtet (auf 0,18), was für eine erfolgte DSB-Reparatur spricht. Jedoch wurde mit anhaltender Reparaturzeit keine weitere Verminderung der DNA-Fragmente beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten die Sorafenib-behandelten Proben kaum DNA-Reparatur, da die Werte der relativen DNA-Schädigung um 0,25 schwankten. In Abbildung 5.10 E ist die Reparaturfähigkeit der ersten Stunde nach Schadensinduktion für UT-SCC 60B dargestellt (Messpunkte 5, 15, 30, 60 min nach Bestrahlung), die eine signifikante Beeinträchtigung der DSB-Reparatur nach Sorafenib-Behandlung zeigt.

Die Analyse der *Non-Responder*-Zelllinie UT-SCC 5 ergab sowohl nach DMSO- als auch nach Sorafenib-Behandlung eine Abnahme der relativen DNA-Schädigung, von 0,19 auf 0,08 bzw. 0,18 auf 0,08 (Abbildung 5.10 D/E). Die leicht angedeutete schnellere Reparatur von Sorafenib innerhalb der ersten 30 Minuten nach Schadensinduktion hat aufgrund des großen Standardfehlers keine signifikante Relevanz.

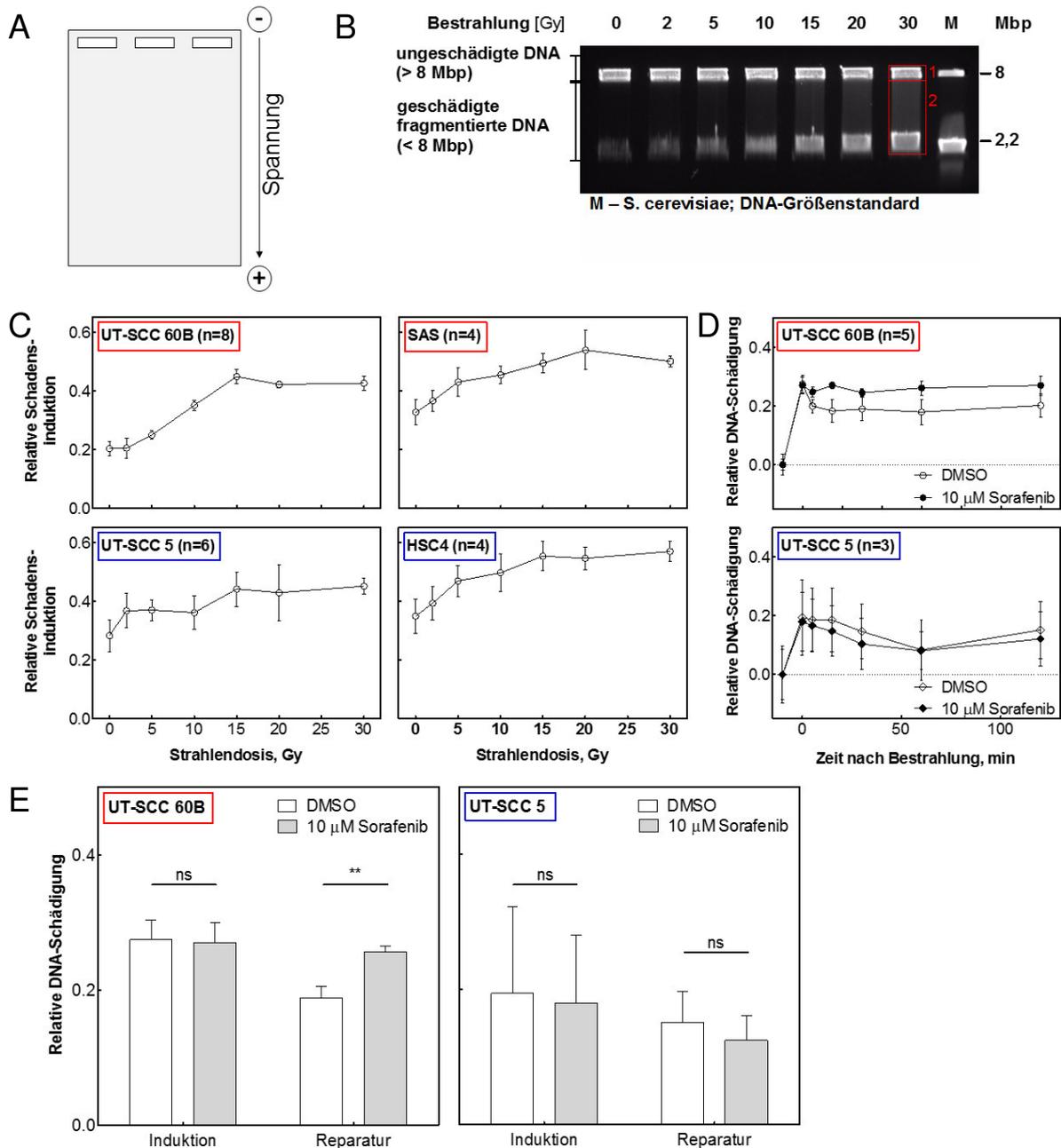


Abbildung 5.10 Einfluss von Sorafenib auf die DNA-DSB-Reparatur: Konstant-Feld-Gelelektrophorese. Der Nachweis der DNA-Reparatur erfolgte mittels Konstant-Feld-Gelelektrophorese (CFGE). Hierzu wurden proliferierende HNSCC-Zelllinien hinsichtlich ihrer Schadensinduktion bzw. Reparaturfähigkeit untersucht. (A) Schematische Darstellung der CFGE. (B) Exemplarische Darstellung eines Agarose-Gels nach Schadensinduktion mit ansteigenden Strahlendosen bei HSC4-Zellen. Obere Banden: ungeschädigte DNA (> 8 Mbp); untere Banden: geschädigte fragmentierte DNA (< 8 Mbp); M: DNA-Größenstandard, Chromosomen von *Saccharomyces cerevisiae*. Der relative DNA-Schaden ergibt sich aus dem Verhältnis geschädigter DNA (2) zur DNA-Gesamtmenge (1+2). (C) Dargestellt ist die Quantifizierung der fragmentierten DNA nach Schadensinduktion mit unterschiedlichen Strahlendosen von den *Respondern* (SAS, UT-SCC 60B) und *Non-Respondern* (HSC4, UT-SCC 5). (D) Dargestellt ist die Quantifizierung der DNA-DSB-Reparatur von UT-SCC 5 und UT-SCC 60B. Die Zellen wurden mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib behandelt und mit 15 Gy bestrahlt. Gezeigt ist die relative DNA-Schädigung abzüglich des Hintergrundsignals (geschädigte DNA nach 0 Gy). (E) Zusammengefasst ist die DNA-DSB-Reparatur der Zeitpunkte 5, 15, 30, 60 min nach Bestrahlung (Reparatur, aus (D)) gegenüber der Schadensinduktion (15 Gy, Induktion) von DMSO- und Sorafenib-behandelten UT-SCC 5 und UT-SCC 60B-Zellen. Dargestellt ist die relative DNA-Schädigung abzüglich des Hintergrundsignals (geschädigte DNA nach 0 Gy). Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit dem entsprechenden SEM dargestellt. Statistische Signifikanz: ** p < 0,01; ns nicht signifikant (gepaarter zweiseitiger Studentischer t-Test).

Obwohl die Daten der CFGE deutlich zeigen, dass die strahlensensitivierbaren UT-SCC 60B eine verminderte DNA-DSB-Reparatur nach Sorafenib-Behandlung zeigten, ließen die Daten der UT-SCC 5-Zelllinie keine Aussage über die DSB-Reparaturfähigkeit zu. Zudem wurden zwei Limitierungen der CFGE deutlich. Zum einen wurde ein zum Teil sehr hohes Hintergrundsignal bei allen vier Zelllinien beobachtet (Abbildung 5.10 B/C). Zum anderen kann durch die kontinuierliche elektrische Spannung der CFGE die fragmentierte DNA zwar nach ihrer Molekülgröße (< 8 Mbp) aufgetrennt werden, jedoch ist eine Abtrennung von degradiertem DNA, die während der Versuchsdurchführung oder durch Nuklease-Verdau entstehen kann, von der strahlungsabhängigen fragmentierten DNA nicht möglich [144]. Deshalb sollte im Folgenden die DNA-DSB-Reparatur mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese untersucht werden.

5.3.3.5 Puls-Feld-Gelelektrophorese

Durch zwei alternierende Spannungsfelder können bei der Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) sehr große DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Molekülgröße aufgetrennt und eine Separation von degradiertem DNA gegenüber strahlungsabhängiger fragmentierter DNA erreicht werden (Abbildung 5.11 A). Bei einer DNA-Gesamtlänge von ca. 3,2 Gbp ergibt sich eine durchschnittliche Chromosomengröße von 140 Mbp. Mit einer Strahlendosis von 15 Gy können ca. 600 DSB generiert werden (40 pro Gy), wodurch von einer mittleren DNA-Fragmentgröße – unter Voraussetzung einer gleichmäßigen DSB-Verteilung – von ca. 5,3 Mbp ausgegangen werden kann. Diese durchschnittliche DNA-Fragmentgröße ist kleiner als 8 Mbp und kann entsprechend durch die Poren des Agarose-Gels entsprechend wandern. Aufgrund einer ungleichmäßigeren Verteilung der DSB, werden unterschiedlich große DNA-Fragmente generiert und der Größe nach aufgetrennt (2. Laufspur; 15 Gy, 0 min nach Bestrahlung; Abbildung 5.11 B). Aus Abbildung 5.11 B wird zudem ersichtlich, dass kaum Hintergrundsignal detektiert werden kann (1. Laufspur; 0 Gy) und zudem die degradierte DNA anhand ihrer kleineren Molekülgröße (deutlich kleiner als 1,5 Mbp) bei der Quantifizierung von der fragmentierten DNA abzutrennen ist (7. Laufspur; 120 min nach 15 Gy Bestrahlung).

Die Untersuchung der DSB-Reparatur von UT-SCC 60B zeigte eine deutliche Schadensinduktion nach 15 Gy, wobei die Kontroll- und Sorafenib-behandelten Proben annähernd gleich waren (DMSO: 0,47; 10 μ M Sorafenib: 0,45 relative DNA-Schädigung; Abbildung 5.11 C). Ausgehend von dieser DNA-Schädigung verringerte sich die Menge der DNA-Fragmente bei der Kontroll-Probe innerhalb der ersten 60 Minuten um ca. 21 % auf 0,37 (Zeitpunkte 5, 15, 30, 60 min nach Bestrahlung zusammengefasst). Obwohl die Sorafenib-behandelte Zellen DNA-DSB-Reparatur aufwies, war diese deutlich geringer als in der Kontrolle. Die geschädigte DNA verringerte sich hierbei von 0,45 auf 0,42 innerhalb der ersten 60 Minuten, was einer Verminderung der DNA-Fragmentmenge um nur ca. 7 % entspricht. Somit bewirkte Sorafenib gegenüber der Kontrolle eine signifikante Verminderung der DNA-DSB-Reparatur in UT-SCC 60B. Auch die *Responder*-Zelllinie SAS wies eine signifikant verminderte DNA-DSB-Reparatur auf. Dies zeigte sich in der verbliebenen DNA-Schädigung der

Sorafenib-behandelten Zellen, die sich nur um 15 % nach Schadensinduktion verringerte (relative DNA-Schädigung von 0,39 auf 0,33, Abbildung 5.11 C). Die Kontrolle hingegen zeigte mit 23 % eine deutlich bessere DNA-DSB-Reparatur (relative DNA-Schädigung: Induktion: 0,39; Reparatur: 0,3). Die Analyse der DNA-DSB-Reparatur der UT-SCC 5-Zellen machte deutlich, dass bereits eine signifikant niedrigere Schadensinduktion nach Sorafenib-Behandlung beobachtet wurde (DMSO: 0,43; 10 µM Sorafenib: 0,35; Abbildung 5.11 C). Diese signifikante Verminderung blieb nach der DSB-Reparatur erhalten. So verringerte sich die relative DNA-Schädigung nach Sorafenib-Behandlung von 0,35 (Induktion) auf 0,23 (Reparatur), wohingegen die relative DNA-Schädigung der DMSO-behandelten Zellen von 0,43 (Induktion) auf 0,31 (Reparatur) sank.

Die zweite *Non-Responder*-Zelllinie HSC4 zeigte ebenfalls nach Sorafenib-Behandlung eine etwas niedrigere DNA-Schadensinduktion nach 15 Gy Strahlendosis als die Kontrolle (DMSO: 0,41; 10 µM Sorafenib: 0,37; Abbildung 5.11 C). Sowohl die Kontrolle als auch die Sorafenib-Behandlung zeigten eine Abnahme der relativen DNA-Schädigung (Reparatur: 0,31). Obwohl sich die DNA-Fragmentmenge bei der Kontrolle stärker als bei den Sorafenib-behandelten Zellen verringerte (DMSO: 24 %; 10 µM Sorafenib: 16 %), wurde kein signifikanter Unterschied in der Reparatur zwischen DMSO- und Sorafenib-behandelten Proben festgestellt.

Insgesamt konnte mit Hilfe der PFGE die Inhibition der DSB-Reparatur in den *Respondern* bestätigt werden. In den *Non-Respondern* konnte zudem eindeutig gezeigt werden, dass Sorafenib die DNA-DSB-Reparatur nicht beeinträchtigt.

Die Daten zur DNA-DSB-Reparatur zeigten insgesamt, dass die Wahl des Analysesystems entscheidend ist. Des Weiteren kann Sorafenib die DNA-DSB-Reparatur von HNSCC-*Respondern* inhibieren.

Ob diese beeinträchtigte DNA-DSB-Reparatur tatsächlich der Grund für die Strahlensensitivierung ist, ist mit den erhobenen Daten noch nicht eindeutig geklärt. Zudem bleibt die Frage offen, welcher DNA-DSB-Reparaturweg durch Sorafenib beeinflusst wird. So kann neben der Homologen Rekombination auch die Nicht-homologe Endverknüpfung bzw. die Alternative Endverknüpfung strahlungsinduzierte DSB reparieren. Welcher DSB-Reparaturweg letztendlich durch Sorafenib beeinträchtigt wird, soll im folgenden Abschnitt ermittelt werden.

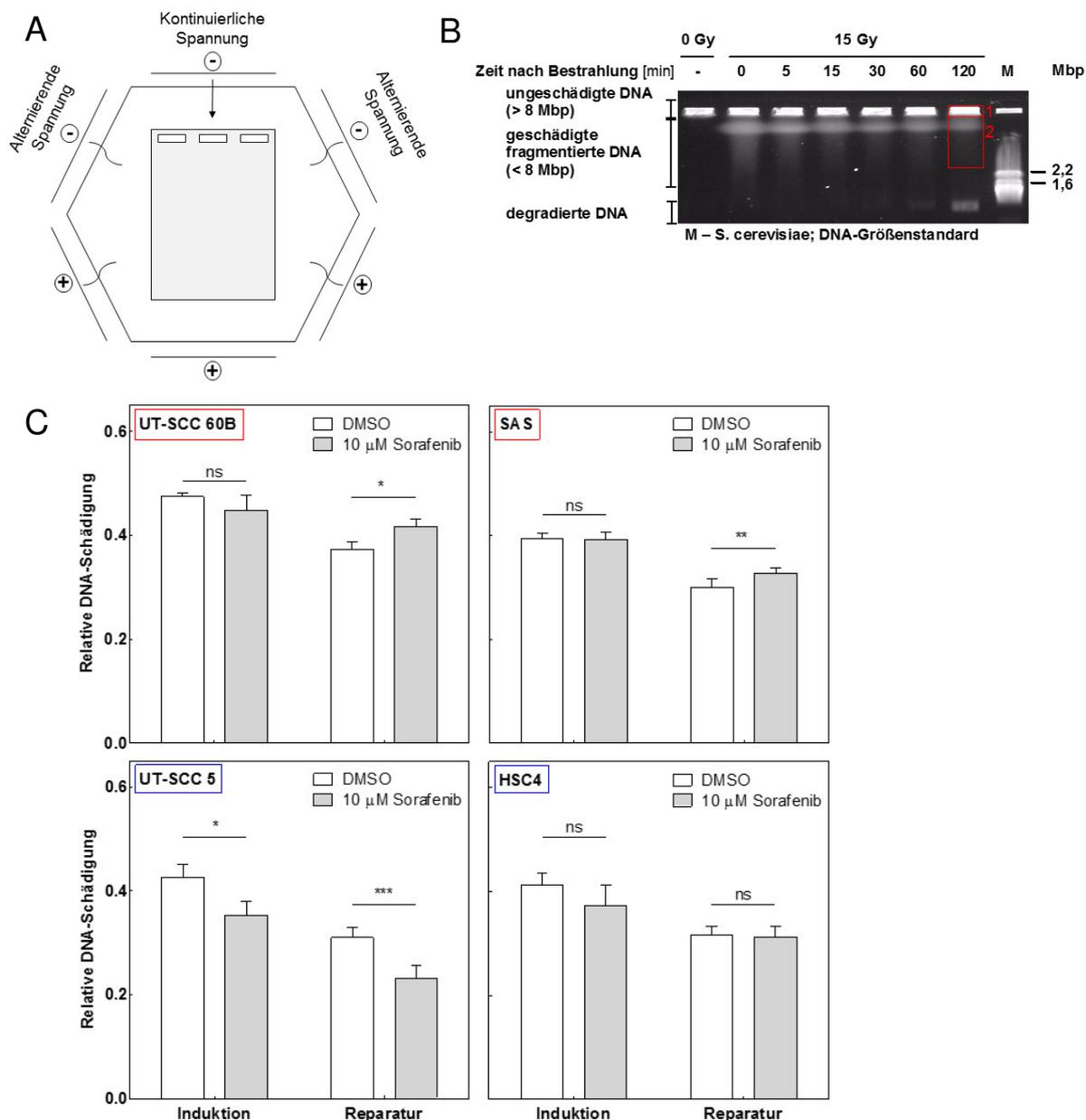


Abbildung 5.11 Einfluss von Sorafenib auf die DNA-DSB-Reparatur: Puls-Feld-Gelelektrophorese.

Mit Hilfe der Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) wurde die DNA-DSB-Reparatur proliferierender HNSCC-Zelllinien untersucht. Dabei wurde nach DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib-Behandlung die Reparatur der DSB anhand der DNA-Fragmente quantifiziert. (A) Schematische Darstellung der PFGE mit einer kontinuierlichen und zwei alternierenden Spannungsquellen. (B) Exemplanische Darstellung der PFGE von einer DNA-DSB-Reparaturkinetik von DMSO-behandelten UT-SCC 60B Zellen. Obere Banden: ungeschädigte DNA (> 8 Mbp); mittlere Banden: geschädigte DNA (< 8 Mbp, > 2,2 Mbp); untere Banden: degradierte DNA (< Marker-Banden); M: DNA-Größenstandard, Chromosomen von *Saccharomyces cerevisiae*. Der relative DNA-Schaden ergibt sich aus dem Verhältnis geschädigter DNA (2) zur DNA-Gesamtmenge (1+2). (C) Analyse der DNA-DSB-Reparatur nach DMSO bzw. Sorafenib-Behandlung von Respondern (SAS, UT-SCC 60B) und Non-Respondern (HSC4, UT-SCC 5). Zusammengefasst ist die DNA-DSB-Reparatur der Zeitpunkte 5, 15, 30, 60 Minuten nach Schadensinduktion (15 Gy) abzüglich des Hintergrundsignals (fragmentierte DNA nach 0 Gy). Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit dem entsprechenden SEM dargestellt. Statistische Signifikanz: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns nicht signifikant (gepaarter zweiseitiger Studentischer t-Test).

5.3.4 Analyse der DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturwege

In Abschnitt 5.3.3 konnte gezeigt werden, dass Sorafenib die DNA-DSB-Reparatur in den *Responder*-Zelllinien inhibiert. Jedoch ist ungeklärt, ob die Inhibition der DNA-DSB-Reparatur der Grund für die Strahlensensibilisierung ist und welcher DSB-Reparaturweg durch Sorafenib gehemmt wird. Dies wurde durch die gezielte Inhibition der drei Hauptreparaturwege in Tumoren, HR, Alt-EJ und NHEJ, untersucht.

5.3.4.1 Homologe Rekombination

Zunächst wurde untersucht, ob Sorafenib die HR inhibiert, und zwar durch eine gezielte Inhibition des Schlüsselproteins Rad51 durch den Inhibitor RI-1. Dieser verhindert die Interaktion der Rad51-Proteine und damit die Rad51-Nukleofilamentbildung an der ssDNA, die für die HR unerlässlich ist. Aus Abbildung 5.12 A wird ersichtlich, dass RI-1 allein keine Zellenaktivierung der SAS-Zellen bewirkt. Zudem wurde durch RI-1 in den SAS-Zellen keine Strahlensensitivierung beobachtet, obwohl proliferierende und damit auch S/G2-Phase-Zellen untersucht wurden (Abbildung 5.12 B). Darüber hinaus wurde sogar eine Aufhebung der Sorafenib-vermittelten Strahlensensitivierung beobachtet. In Rücksprache mit Dr. Thorsten Rieckmann (Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie) ist die Effektivität von RI-1 bezüglich der Inhibition der HR-Reparatureffizienz von transient integrierten Reparaturkonstrukten in SAS-Zellen nur sehr gering (Daten nicht gezeigt). Diese Daten lassen vermuten, dass entweder der RI-1-Inhibitor nicht effizient genug ist, um die HR in

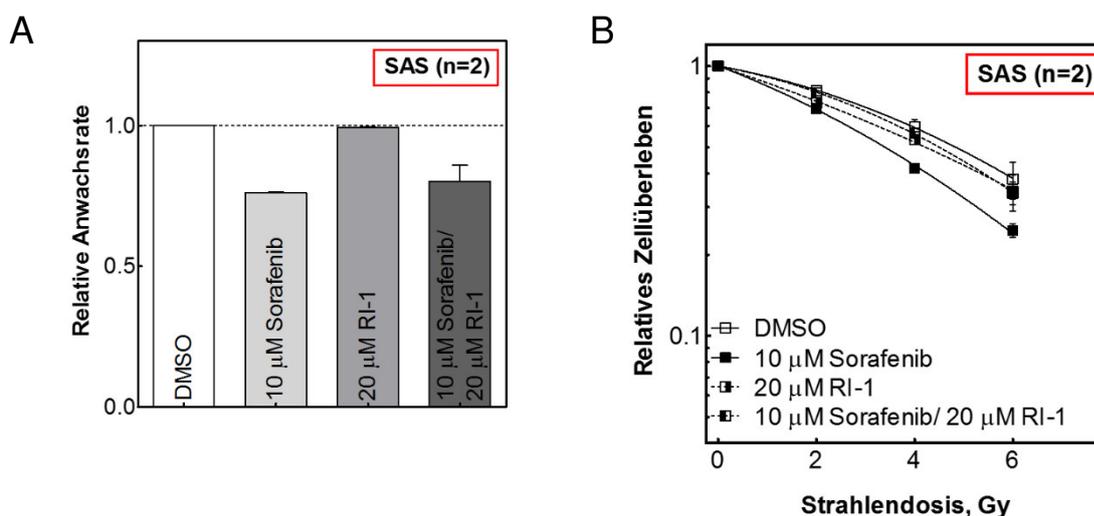


Abbildung 5.12 Einfluss von Sorafenib auf die Homologe Rekombination.

Mittels Koloniebildungstest wurde der inhibitorische Effekt von Sorafenib auf die HR untersucht. Hierzu wurden proliferierende Zellen für 2 h mit DMSO und 10 µM Sorafenib bzw. 6 h mit 20 µM RI-1 behandelt und mit 2, 4 und 6 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen re-platiert (*delayed plating*). Das Zellüberleben wurde nach 6 - 8 Tagen bestimmt. (A) Zellenaktivierende Wirkung von RI-1 auch in Kombination mit Sorafenib. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Anwachsrate im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (gepunktete Linie). (B) Relatives Zellüberleben nach RI-1, auch in Kombination mit Sorafenib und Bestrahlung. Es wurden zwei unabhängige Fünffachbestimmungen durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Die Kurven wurden gefittet (nichtlineare Regression).

SAS-Zellen effektiv zu inhibieren oder die HR in diesem Zusammenhang in den SAS keine entscheidende Rolle spielt.

5.3.4.2 Alternative Endverknüpfung

Die Analyse des Alt-EJ erfolgte durch die Inhibition des Schlüsselproteins PARP1 durch den spezifischen Inhibitor Olaparib. Durch die Inhibition von PARP1 werden entsprechende Substratproteine nicht PARyliert, wodurch deren Aktivität unterbunden wird. In Abbildung 5.13 A wurde die Reduktion der PARylierung nach H₂O₂-Induktion durch Olaparib mittels Durchflusszytometrie bestätigt. Olaparib hat zudem keine zytotoxische Wirkung auf die SAS-Zellen (Abbildung 5.13 B). Im Koloniebildungstest zeigte Olaparib die gleiche strahlensensitivierende Wirkung in den SAS-Zellen wie nach Sorafenib-Behandlung (Sorafenib *survival fraction* bei 6 Gy (SF_{6Gy}): 16 %; Olaparib SF_{6Gy}: 18 %; Abbildung 5.13 C). Die Kombinationsbehandlung aus Sorafenib und Olaparib zeigte einen zusätzlichen strahlensensitivierenden Effekt (Sorafenib/Olaparib SF_{6Gy}: 8 %).

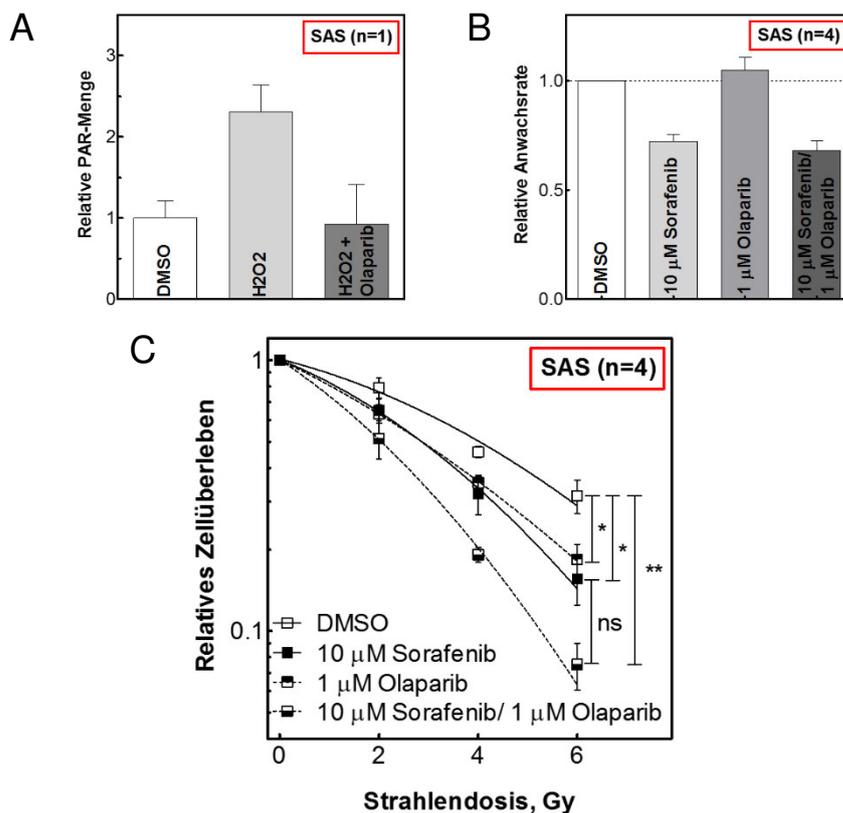


Abbildung 5.13 Einfluss von Sorafenib auf das alternative end-joining.

Mittels Koloniebildungstest wurde der inhibitorische Effekt von Sorafenib auf das Alt-EJ untersucht. Hierzu wurden proliferierende Zellen für 2 h mit DMSO, 10 μM Sorafenib und 1 μM Olaparib behandelt und mit 2, 4 und 6 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 h wurden die SAS-Zellen re-platiert (*delayed plating*). Das Zellüberleben wurde nach 6 - 8 Tagen bestimmt. (A) Nachweis der inhibitorischen Wirkung von Olaparib. Detektion des PARylierungssignals nach H₂O₂-Induktion und Inhibition durch Olaparib mittels Durchflusszytometrie. (B) Zellinaktivierende Wirkung von Olaparib auch in Kombination mit Sorafenib. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Anwachsrate im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (gepunktete Linie). (C) Relatives Zellüberleben nach Inhibition des Alt-EJ durch Olaparib, auch in Kombination mit Sorafenib und Bestrahlung. Es wurden vier unabhängige Fünffachbestimmungen durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Die Kurven wurden gefittet (nichtlineare Regression). Statistische Signifikanz: * p < 0,05; ** p < 0,01; ns nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger Studentischer t-Test).

Obwohl dieser zusätzliche Effekt nicht signifikant war (Sorafenib gegenüber Sorafenib/Olaparib $p=0,0577$), kann eher von einer additiven Wirkung beider Inhibitoren ausgegangen werden. Dies wiederum würde bedeuten, dass Sorafenib und Olaparib zwei verschiedene Reparaturwege inhibieren und dadurch die Summe beider inhibitorischer Effekte in der Kombinationsbehandlung beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass Sorafenib die DSB-Reparatur nicht durch das Alt-EJ inhibiert.

5.3.4.3 Nicht-homologe Endverknüpfung

Um zu untersuchen, ob Sorafenib das NHEJ inhibiert, wurde die Aktivität des Schlüsselproteins DNA-PKcs durch Nu7026 inhibiert. Die Proteinkinase DNA-PKcs reguliert durch Autophosphorylierung das NHEJ. Aus Abbildung 5.14 A wird deutlich, dass in den SAS-Zellen Nu7026 die Phosphorylierung von DNA-PKcs an T2609 gezielt inhibieren kann. Weiterhin ist gezeigt, dass Nu7026 zu keiner Zellinaktivierung der SAS-Zellen führt (Abbildung 5.14 B). Um die Wirkung von

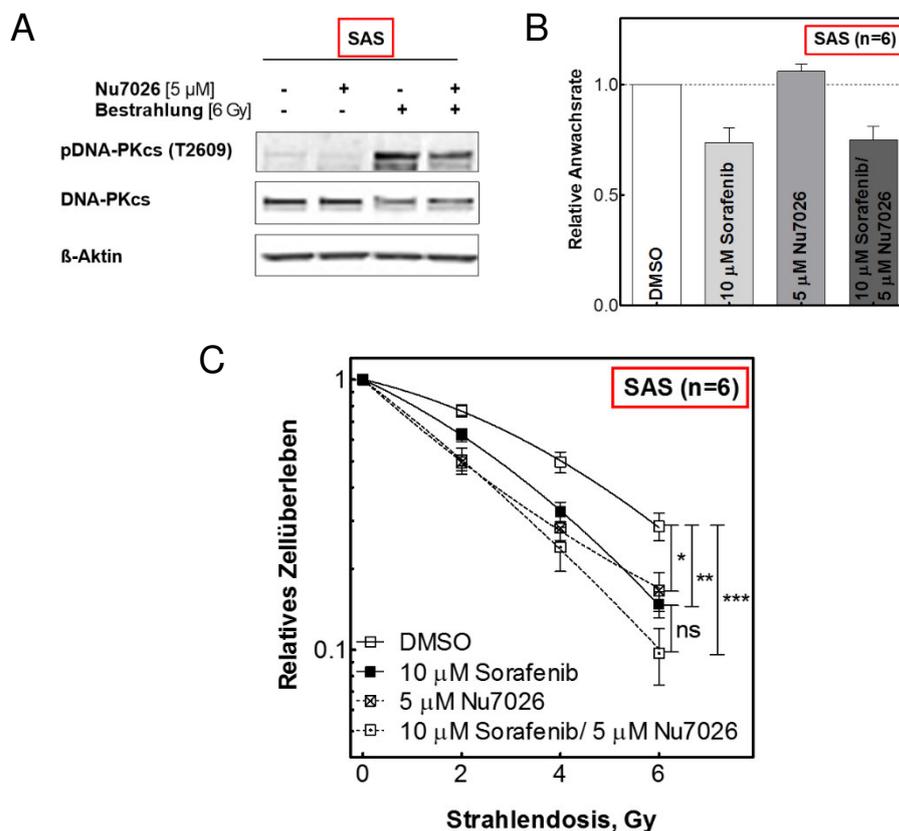


Abbildung 5.14 Einfluss von Sorafenib auf die Nicht-homologe Endverknüpfung.

Mittels Koloniebildungstest wurde der inhibitorische Effekt von Sorafenib auf das NHEJ untersucht. Hierzu wurden proliferierende Zellen für 2 h mit DMSO, 10 μM Sorafenib bzw. 5 μM Nu7026 behandelt und mit 2, 4 und 6 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 h wurden die SAS-Zellen re-platiert (*delayed plating*). Das Zellüberleben wurde nach 6 - 8 Tagen bestimmt. (A) Nachweis der inhibitorischen Wirkung von Nu7026. Detektion der Phosphorylierungsstelle DNA-PKcs (T2609) nach Nu7026-Inhibition und 6 Gy Bestrahlung mittels Western Blot. (B) Zellinaktivierende Wirkung von Nu7026 auch in Kombination mit Sorafenib und Bestrahlung. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Anwachsrate im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (gepunktete Linie). (C) Relatives Zellüberleben nach Inhibition des NHEJ durch Nu7026, auch in Kombination mit Sorafenib. Es wurden sechs unabhängige Fünffachbestimmungen durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Die Kurven wurden gefittet (nichtlineare Regression). Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger Studentischer t-Test).

Sorafenib auf das NHEJ zu untersuchen, wurde die Strahlensensitivierung von Sorafenib im Koloniebildungstest mit dem von Nu7026 verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition des NHEJ mit Nu7026 mit ansteigenden Dosen einen ungewöhnlichen Verlauf nimmt (Abbildung 5.14 C). Während mit 2 Gy eine etwas stärkere Strahlensensitivierung bei Nu7026 im Vergleich zu Sorafenib beobachtet wurde, gleicht sich das zelluläre Überleben bei 4 Gy dem von Sorafenib an und zeigte bei 6 Gy eine ähnliche Strahlensensitivierung (Sorafenib SF_{6Gy}: 15 %; Nu7026 SF_{6Gy}: 17 %). Die Kombinationsbehandlung zeigte erst bei höheren Dosen ein geringfügiges zusätzliches vermindertes Zellüberleben, dass im Vergleich zu den Einzelbehandlungen nicht signifikant war (Sorafenib/Nu7026 SF_{6Gy}: 10 %, p=0,1089). Bei niedrigeren Dosen lag die Zellinaktivierung der Kombinationsbehandlung bei der von Nu7026, dies ist ein Hinweis dafür, dass die Inhibition durch Sorafenib sowie die Inhibition durch Nu7026 über einen gemeinsamen Signalweg verläuft und Sorafenib somit möglicherweise direkt, über die Inhibition von DNA-PKcs, oder indirekt, über *upstream*-Kinasen, das NHEJ inhibiert.

Zusammenfassend lässt sich von den Daten ableiten, dass die Sorafenib-vermittelte Strahlensensitivierung durch die Inhibition des NHEJ ausgelöst wird. Wie Sorafenib das NHEJ beeinflusst, soll durch Analyse der Expression bzw. der Phosphorylierung von zentralen Reparaturproteinen des NHEJ mittels Western Blot untersucht werden.

Um zu untersuchen, wie Sorafenib das NHEJ beeinflusst, wurde zunächst von proliferierenden SAS-Zellen die Expression bzw. die Phosphorylierung der zentralen Reparaturproteine des NHEJ analysiert. Es zeigte sich, dass die Expression der einzelnen Reparaturproteine nach allen Behandlungen identisch war (Abbildung 5.15 A). Wie zuvor (Abbildung 5.14 A) wurde ein eindeutiger Anstieg der Phosphorylierung von DNA-PKcs (T2609) nach 6 Gy Bestrahlung beobachtet (Abbildung 5.15 A), was auch bei einer zweiten Phosphorylierungsstelle von DNA-PKcs (S2056) beobachtet wurde. Hierbei steht die S2056 Phosphorylierungsstelle für eine Autophosphorylierung der DNA-PKcs, während T2609 eine ATM/ATR-abhängige Phosphorylierungsstelle von DNA-PKcs ist (ATR- *ataxia telangiectasia and Rad3 related*) [145-147]. Nach Sorafenib-Behandlung konnte eine Reduktion der Phosphorylierung an beiden Positionen beobachtet werden.

Aufgrund der Reduktion der beiden Phosphorylierungsstellen von DNA-PKcs in SAS-Zellen wurden auch die weiteren *Responder*- und *Non-Responder*-Zelllinien hinsichtlich des Phosphorylierungsstatus der DNA-PKcs nach Sorafenib untersucht. Es zeigte sich für die basale Phosphorylierung von DNA-PKcs an S2056 und T2609, dass für beide Positionen sehr schwache Signale detektiert wurden (Abbildung 5.15 A/B). Während die Phosphorylierungsstelle S2056 in den vier HNSCC-Zelllinien nach Sorafenib-Behandlung sehr heterogen war, führte Sorafenib in der Tendenz zu einer Inhibition der Phosphorylierung an Position T2609 (Abbildung 5.15 C). Nach Bestrahlung zeigten einzig die SAS-Zellen eine verminderte DNA-PKcs-Phosphorylierung an Position S2056 (Abbildung 5.15 D oben). Jedoch inhibierte Sorafenib die strahlungsinduzierte Phosphorylierung an Position T2609 in beiden *Responder*-Zelllinien (Abbildung 5.15 D unten). Während für die *Non-Responder*-Zelllinie

HSC4 aufgrund der großen Fehlerbalken keine Aussage über die Phosphorylierung von DNA-PKcs T2609 möglich ist, zeigte Sorafenib in den UT-SCC 5 keine Veränderung der Phosphorylierung an Position T2609 nach Bestrahlung.

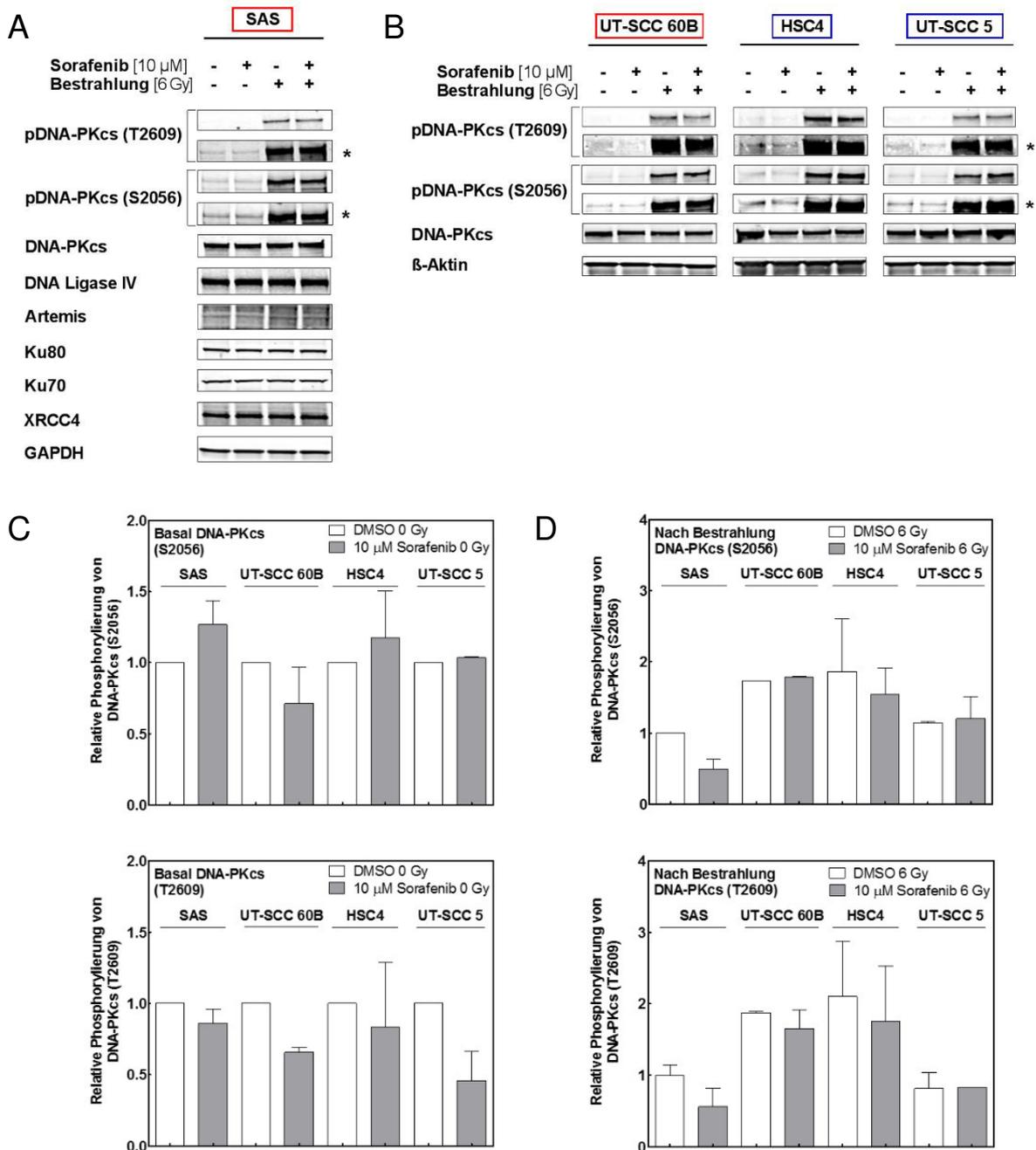


Abbildung 5.15 Einfluss von Sorafenib auf die zentralen Reparaturproteine des NHEJ.

Proliferierende Zellen wurden für 2 h mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib behandelt, mit 6 Gy bestrahlt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben lysiert und mittels Western Blot analysiert. (A) Dargestellt wurde die Expression und Phosphorylierung der Reparaturproteine des NHEJ von SAS-Zellen. Als Ladekontrolle diente GAPDH. * längere Belichtungszeit (B) Nachweis von Phospho-DNA-PKcs an T2609 und S2056 für HSC4, UT-SCC 5 und UT-SCC 60B mittels Western Blot. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. * längere Belichtungszeit (C-D) Quantifiziert wurden die Phosphorylierungsstellen von DNA-PKcs S2056 und T2609 von den *Respondern* (SAS, UT-SCC 60B) und *Non-Respondern* (HSC4, UT-SCC 5). (C) Basale Phosphorylierung nach DMSO/Sorafenib (D) Phosphorylierung nach DMSO/Sorafenib und Bestrahlung. Hierzu wurde zunächst das Phosphorylierungssignal auf die Expression des Gesamtproteins DNA-PKcs normiert, um anschließend das Verhältnis der Behandlungen zu den normierten Kontrollwerten (DMSO 0 Gy, in C bzw. DMSO 6 Gy, in D) zu bilden. Fehlerbalken entsprechen dem SEM.

Insgesamt deutet sich an, dass Sorafenib die strahlungsinduzierte Phosphorylierung von DNA-PKcs an Position T2609 in den *Responder*-Zelllinien inhibiert.

Der Fokus der vorangegangenen Abschnitte lag auf der Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus der beobachteten Strahlensensitivierung durch Sorafenib in den HNSCC-Zelllinien. Hierbei kann sowohl eine verstärkte primäre Apoptose sowie ein früher permanenter Zellzyklusarrest als Ursache für die Strahlensensitivierung ausgeschlossen werden. Vielmehr konnte eine verminderte DNA-DSB-Reparatur als Grund für die beobachtete Strahlensensitivierung bestimmt werden. Es deutet sich zudem an, dass Sorafenib die Phosphorylierung von DNA-PKcs an Position T2609 in den *Responder*-Zelllinien inhibiert. Wie Sorafenib die Inhibition der DNA-PKcs-Phosphorylierung und damit des NHEJ bewirkt, ist jedoch noch ungeklärt. Einerseits ist es möglich, dass Sorafenib direkt mit DNA-PKcs interagiert, jedoch ist es wahrscheinlicher, dass Sorafenib über *upstream*-Kinasen das NHEJ steuert, weshalb im Folgenden die Wirkung von Sorafenib auf die zelluläre Signaltransduktion untersucht wurde.

5.4 Identifizierung der Zielkinasen von Sorafenib in HNSCC-Zelllinien

Sorafenib ist ein Multikinaseinhibitor und kann neben Tyrosinkinase auch Serin-/Threoninkinasen inhibieren. Dadurch besteht die Möglichkeit weitreichend biologische Prozesse in den Tumorzellen zu beeinflussen, wie zum Beispiel Proliferation, Zellüberleben, Angiogenese oder Metastasierung. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Sorafenib anti-proliferierende und zellinaktivierende Wirkung besitzt und unabhängig davon in einigen HNSCC-Zelllinien zur Strahlensensitivierung führt. Um diese verschiedenen Effekte hervorzurufen, sind vermutlich verschiedene Signalwege und damit auch unterschiedliche Kinasen verantwortlich. Zudem wird die aus Abschnitt 1.2 beschriebene Heterogenität der HNSCC-Zellen hinsichtlich der zellulären Signaltransduktion ein entscheidender Aspekt für die Effektivität von Sorafenib sein. Eine Hypothese könnte deshalb sein, dass die Strahlensensitivierung auf die Inhibition einzelner oder nur eines einzigen Signalwegs zurückzuführen ist, da nur ein Drittel der HNSCC-Zelllinien durch Sorafenib strahlensensitiviert werden. Das würde auch bedeuten, dass der anti-proliferierende Effekt und die Zytotoxizität von Sorafenib durch verschiedene Signalwege abgeleitet werden kann. Diese zelluläre Signaltransduktion der HNSCC-Zelllinien wurde im Folgenden hinsichtlich des Einflusses von Sorafenib untersucht.

5.4.1 Untersuchung bekannter Zielkinasen von Sorafenib

In diesem Abschnitt liegt der Fokus auf der Untersuchung bekannter Zielkinasen von Sorafenib. Sorafenib ist als potenter Raf-1-Inhibitor entwickelt worden und kann zudem weitere Kinasen effektiv inhibieren [111].

Um den Einfluss von Sorafenib auf die Aktivität von Raf-1 zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung der *downstream*-Kinasen, ERK1/2 (siehe Abbildung 1.2), mittels Western Blot überprüft. Dabei wurde

deutlich, dass Sorafenib die ERK1/2-Phosphorylierung, auch nach Bestrahlung, einzig in den SAS-Zellen inhibiert, nicht jedoch in den UT-SCC 60B oder den *Non-Respondern* HSC4 und UT-SCC 5 (Abbildung 5.16 A).

Wilhelm *et al.* zeigten zudem, dass Sorafenib die Rezeptortyrosinkinasen PDGFR- β , VEGFR-2 und Flt-3 effektiv inhibieren kann [111]. Es stellte sich heraus, dass die Rezeptortyrosinkinasen PDGFR- β , VEGFR-2 und Flt-3 in den untersuchten HNSCC-Zelllinien nicht exprimiert wurden, was am Beispiel des PDGFR- β in Abbildung 5.16 B gezeigt wurde.

Weiterhin wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben, dass Sorafenib die Aktivität von Src und STAT3 blockieren kann [148, 149]. Aus Abbildung 5.16 C wird deutlich, dass sowohl die Kinase Src als auch der Transkriptionsfaktor STAT3 in allen vier HNSCC-Zelllinien exprimiert wurde, Sorafenib jedoch keine Veränderung der Phosphorylierung von Src (Y416) bzw. STAT3 (Y705) bewirkte.

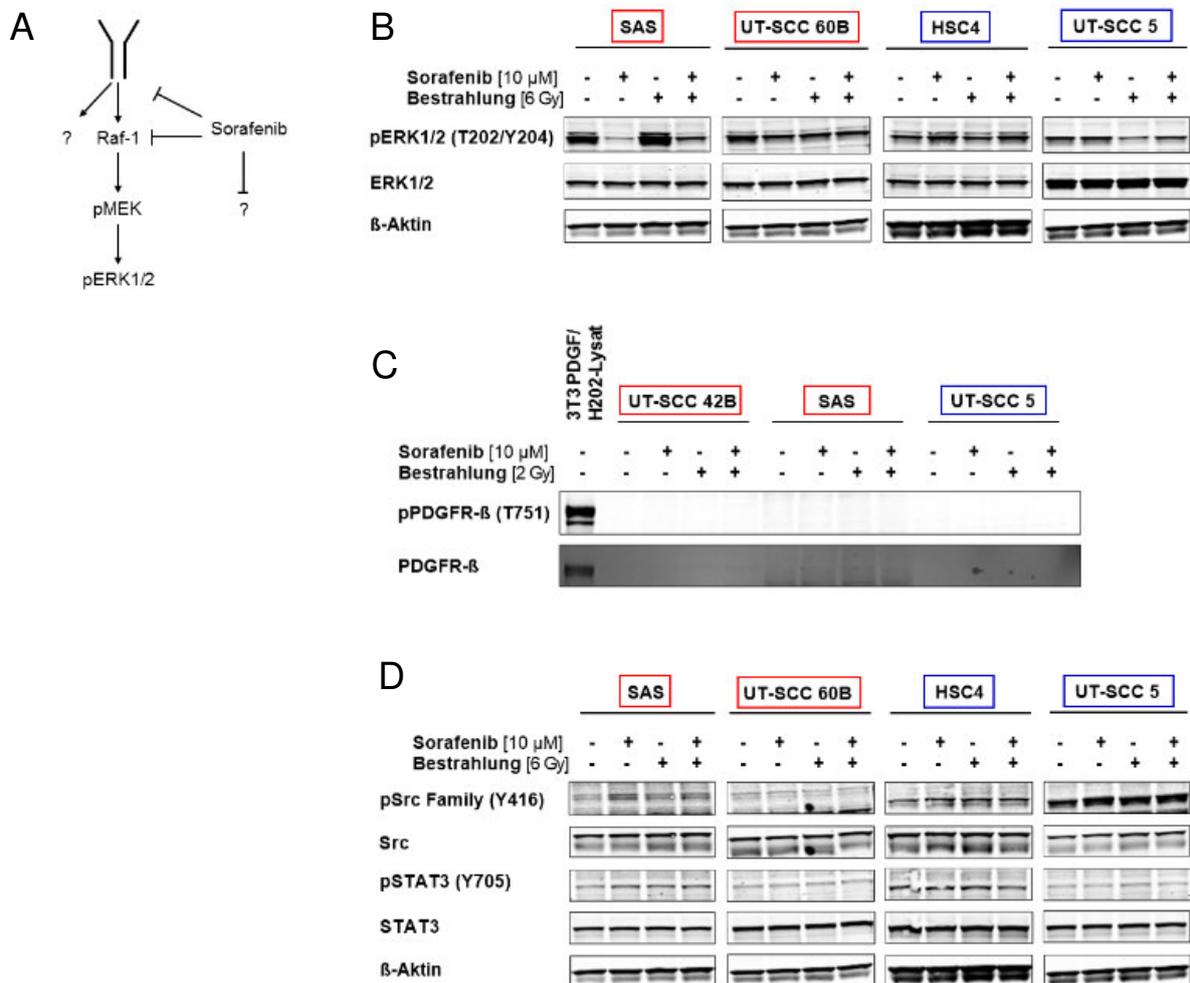


Abbildung 5.16 Analyse bekannter Zielkinasen von Sorafenib in HNSCC-Zelllinien.

HNSCC-Zellen wurden für 2 h mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt und bestrahlt. Die Proben wurden für 15 min bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert, anschließend lysiert und mittels Western Blot Analysen untersucht. (A) Schematische Übersicht über mögliche inhibitorische Wirkung von Sorafenib auf die Signaltransduktion. (B) Nachweis der ERK1/2-Expression bzw. Phosphorylierung (T202/Y204) von proliferierenden *Responder*- (SAS, UT-SCC 60B) und *Non-Responder*-Zelllinien (HSC4, UT-SCC 5). (C) Detektion der Expression und Phosphorylierung (T751) von PDGFR- β von SAS und UT-SCC 42B (*Responder*) bzw. den UT-SCC 5 (*Non-Responder*). Ein 3T3 PDGF/H202-Lysat (Cell signaling #21100S) diente hierbei als PDGFR- β Positivkontrolle. (D) Analyse von *Responder* (SAS, UT-SCC 60B) bzw. *Non-Responder*-Zelllinien (HSC4, UT-SCC 5) hinsichtlich der Expression und Phosphorylierung von Src (Y416) und STAT3 (Y705).

Bei der Untersuchung der wichtigsten beschriebenen *Targets* von Sorafenib konnte keine Regulation bei den HNSCC-Zelllinien entdeckt werden, da entweder die Kinasen nicht exprimiert oder deren Aktivität nicht beeinflusst wird. Eine Ausnahme stellen die SAS-Zellen dar, die eine deutliche Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung zeigten.

Um zu überprüfen, ob der MAPK-Signalweg die Strahlensensitivierung in SAS-Zellen beeinflusst, wurde im Folgenden das zelluläre Überleben nach gezielter MEK-Inhibition untersucht (Abbildung 5.17 A). Vorab wurde die Effizienz des MEK-Inhibitors, PD98059, überprüft, welcher zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK1/2 führt (Abbildung 5.17 B). Diese Verminderung von Phospho-ERK1/2 wurde auch in Kombination mit 6 Gy Bestrahlung beobachtet. Die Analyse der Anwachsrate machte deutlich, dass der MEK-Inhibitor SAS-Zellen inaktivieren kann, wenngleich der Effekt geringer ausfällt als nach Sorafenib-Behandlung (Abbildung 5.17 C). Beide Inhibitoren kombiniert zeigten eine vergleichbare Anwachsrate wie nach alleiniger Sorafenib-Behandlung. Bei der Untersuchung des zellulären Überlebens wurde deutlich, dass der MEK-Inhibitor zu keiner Strahlenempfindlichkeit führt (Abbildung 5.17 D). Die Kombinationsbehandlung hingegen zeigte einzig die strahlensensitivierende Wirkung von Sorafenib allein.

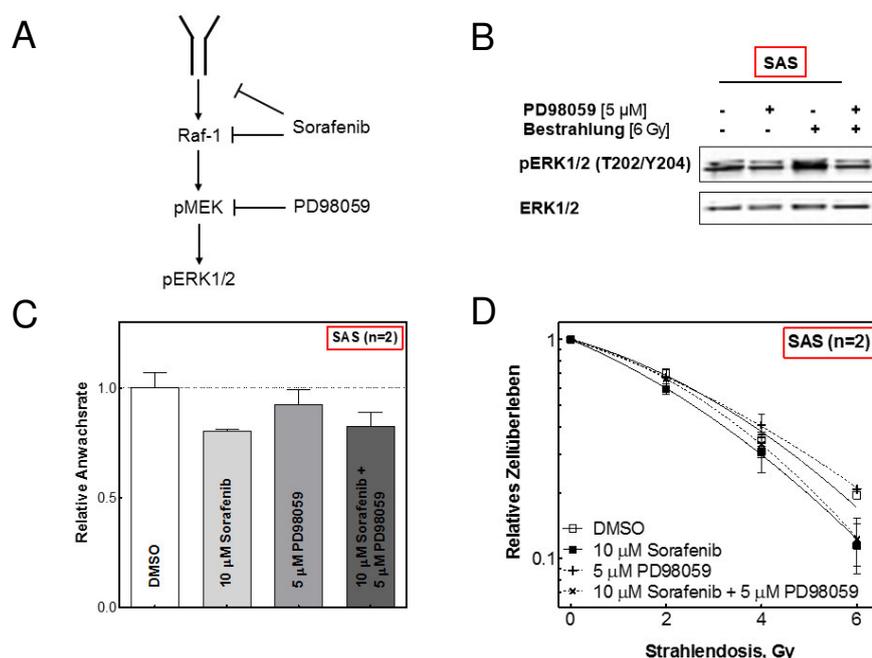


Abbildung 5.17 Einfluss des MAPK-Signalwegs auf die Strahlenempfindlichkeit von SAS-Zellen.

(A) Schematische Übersicht über die relevanten Kinasen des MAPK-Signalwegs. (B) Die Effizienz des MEK-Inhibitors PD98059 wurde anhand der Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Hierzu wurden SAS-Zellen für 2 h mit DMSO bzw. 5 µM PD98058 behandelt und bestrahlt (0, 6 Gy). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert, anschließend lysiert und mittels Western Blot Analyse untersucht. (C) Zelinaktivierende Wirkung des MEK-Inhibitors PD98059 in Kombination mit Sorafenib. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Anwachsrate im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (gepunktete Linie). (D) Dargestellt ist das relative Zellüberleben nach Inhibition von MEK durch PD98059, auch in Kombination mit Sorafenib und Bestrahlung. Es wurden zwei unabhängige Fünffachbestimmungen durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Die Kurven wurden gefittet (nichtlineare Regression).

Anhand dieser Ergebnisse kann die beobachtete Strahlensensitivierung der SAS-Zellen nicht auf die Inhibition des MAPK-Signalwegs zurückgeführt werden. Es deutet sich aber an, dass zumindest die zytotoxische Wirkung von Sorafenib teilweise über das MAPK-Signaling reguliert wird, da kein zusätzlicher Effekt in der Kombinationsbehandlung, Sorafenib mit PD98059, beobachtet wurde. Dennoch müssen auch andere Kinasen für den anti-proliferativen, zellinaktivierenden und strahlensensitivierenden Effekt in den HNSCC-Zelllinien verantwortlich sein, sodass im Folgenden mittels verschiedener explorativer Ansätze nach weiteren Kinasen gesucht wurde.

5.4.2 Identifizierung potentieller Sorafenib-Targets

Multikinaseninhibitoren wie Sorafenib erschweren die Suche nach potentiellen Zielkinasen, sodass explorative Ansätze für die Suche nach möglichen Zielkinasen eine sinnvolle Alternative gegenüber dem Einzelnachweis darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Analysemethoden ausgewählt, mit denen der Nachweis der Proteinaktivität durch Analyse des Phosphorylierungsprofils möglich ist. Im Folgenden wird genauer auf diese zwei Methoden, *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Arrays* und *Tyrosine Kinase PamChip®Array*, eingegangen.

5.4.2.1 *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array*

Die Verwendung des *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Arrays* erlaubt die Analyse von Phosphorylierungsstellen 28 verschiedener Rezeptortyrosinkinasen bzw. elf Proteine zentraler Signalknotenpunkte.

Ob Sorafenib einen Einfluss auf die Phosphorylierung dieser 39 Proteine hat, wurde anhand der *Responder*-Zelllinie UT-SCC 42B untersucht [135]. Auch die bereits bekannten Kinasen wurden in den UT-SCC 42B-Zellen entweder nicht exprimiert, wie es für die PDGFR- β -Expression gezeigt wurde (siehe Abbildung 5.16 B), oder die Aktivität durch Sorafenib nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Auch die Raf-1-Kinase und damit der MAPK-Signalweg konnte durch Sorafenib nicht inhibiert werden [135]. Der *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array* beruht auf einem Sandwich-Immunoassay-Prinzip (siehe Abschnitt 4.3.6), bei dem durch Phosphoantikörper definierte Phosphorylierung zentraler Kinasen detektiert werden können. Hierzu wurden konfluent-wachsende UT-SCC 42B-Zellen mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt (ohne Röntgenstrahlung) und die Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen bzw. Signalproteine detektiert.

Aus Abbildung 5.18 A wird ersichtlich, dass der größte Anteil an Kinasen keine bzw. nur eine geringe Veränderung des Phosphorylierungsmusters nach Sorafenib-Behandlung zeigten. Einzig vier Kinasen, ausschließlich Rezeptortyrosinkinasen (c-Met, EGFR, EphB4 und IRS-1), zeigten eine ausgeprägte Inhibition der Phosphorylierung, die mehr als die Hälfte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vermindert war. Die Serin-/Threoninkinase Akt zeigte hingegen eine deutlich erhöhte Phosphorylierung nach Sorafenib-Behandlung. Der Nachweis der Phosphorylierung von EGFR und Akt mittels Western Blot

konnte die Ergebnisse nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der c-Met-Phosphorylierung ergab, dass Sorafenib zu einer deutlichen Inhibition der Phosphorylierung in den UT-SCC 42B führte und die Daten des Antikörper-Arrays damit bestätigten (Abbildung 5.18 B). Obwohl nach Bestrahlung die Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors im Vergleich zur unbestrahlten Probe abnahm, verringerte sich die Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors nach Sorafenib-Behandlung weiter.

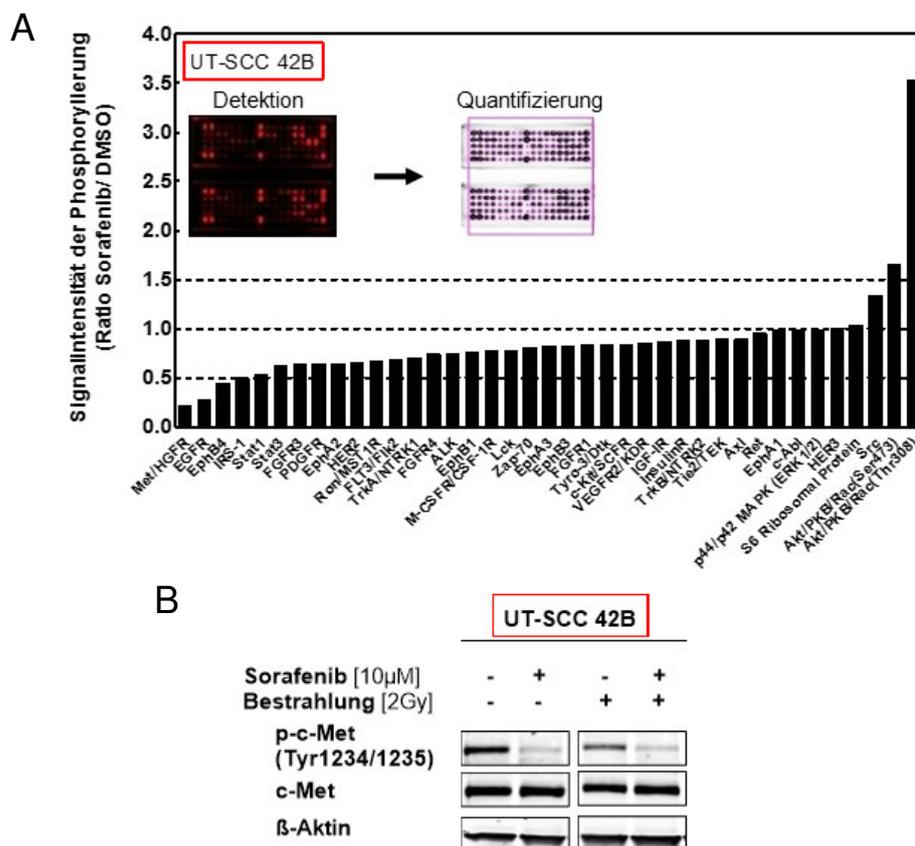


Abbildung 5.18 Suche nach potentiellen Sorafenib-Targets mittels *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array*.

Mit Hilfe des Antikörper-Arrays wurde der Effekt von Sorafenib auf 28 Rezeptortyrosinkinasen und elf Proteine zentraler Signalknotenpunkte untersucht. Hierzu wurden UT-SCC 42B-Zellen für 2 h mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib behandelt und anschließend lysiert. Mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden definierte Phosphorylierungsstellen der jeweiligen Kinasen auf dem Antikörper-Array visualisiert. (A) Dargestellt wurde das Verhältnis der Signalintensität der Phosphorylierung von Sorafenib zu DMSO. Der Schwellenwert wurde auf 1,5 (Hochregulierung) bzw. 0,5 (Herabregulierung) festgelegt. Die Detektion und Quantifizierung der Fluoreszenz-Signale erfolgte mittels *LI-COR Image Studio 2.1* des *LI-COR Odyssey CLx Infrarot Imaging Systems* (Inlay). (B) Verifizierung der c-Met-Expression und Phosphorylierung (Tyr1234/1235) anhand der *Responder*-Zelllinie UT-SCC 42B. Hierzu wurden die Zellen für 2 h mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib behandelt und bestrahlt (0, 2 Gy). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert, anschließend lysiert und mittels Western Blot Analyse untersucht. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Diese Bestätigung impliziert, dass c-Met ein neues *Target* von Sorafenib sein kann. Ob c-Met in HNSCC-Zelllinien relevant ist, sollte durch die Analyse der Expression und basalen Aktivität des c-Met-Rezeptors anhand verschiedener *Responder* und *Non-Responder*-Zelllinien (vgl.: Abbildung 5.4 A) untersucht werden. Diese Analyse zeigte eine sehr starke Heterogenität in den beiden Gruppen, sowohl bezüglich der c-Met-Expression, als auch der Phosphorylierung

(Abbildung 5.19 A). Wie in Abbildung 5.19 B gezeigt, führt Sorafenib tatsächlich zu einer Reduktion der c-Met-Phosphorylierung in Zellen mit starker Basalaktivität (SAS). Eine Bestrahlung hat darauf keinen Einfluss. Ebenso führt eine Röntgenbestrahlung nicht zu einem Anstieg der c-Met-Phosphorylierung in Zellen mit geringem Phospho-c-Met-Basallevel (UT-SCC 5).

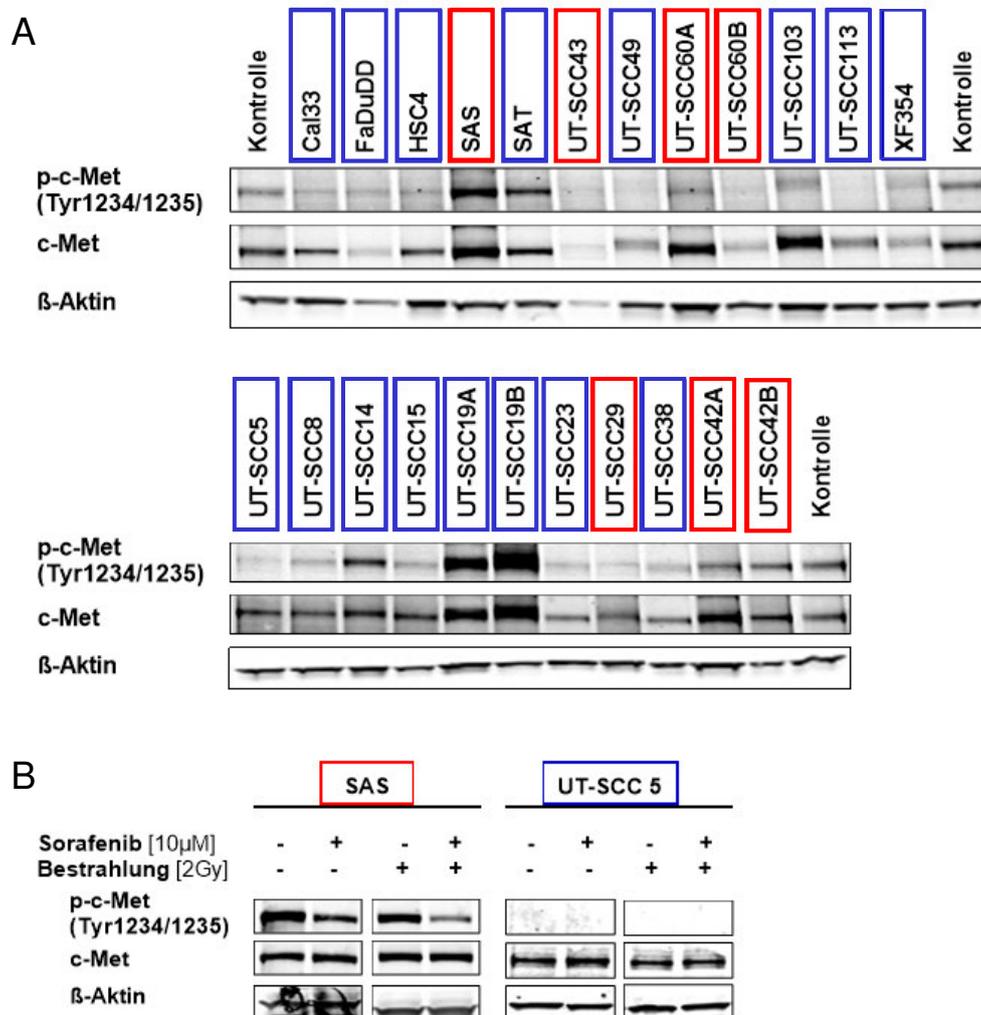


Abbildung 5.19 Einfluss von Sorafenib auf die c-Met-Rezeptoraktivität.

(A) Dargestellt ist die Expression des c-Met-Rezeptors von einem HNSCC-Kollektiv. Die Lyse der HNSCC-Zelllinien erfolgte 24 h nach dem Auslegen von $2,5 \times 10^5$ Zellen in 6-well-Platten. UT-SCC 42A dienten als Vergleichszellen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. (B) Der Nachweis der Expression bzw. der Phosphorylierung (Tyr1234/1235) des c-Met-Rezeptors nach Sorafenib-Behandlung erfolgte am Beispiel der *Responder*-Zelllinie SAS und der *Non-Responder*-Zelllinie UT-SCC 5. Hierzu wurden die Zellen für 2 h mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt und bestrahlt (0, 2 Gy). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert, anschließend lysiert und mittels Western Blot Analyse untersucht. B-Aktin diente als Ladekontrolle.

Aufgrund der starken Heterogenität auch innerhalb der Gruppe der *Responder* – z.B. zeigen UT-SCC 60B und UT-SCC 29 fast keine Basalaktivität von c-Met – ist davon auszugehen, dass der c-Met-Rezeptor keine besondere Bedeutung bezüglich der beobachteten Strahlensensitivierung hat. Dennoch zeigen diese Arbeiten, dass c-Met ein neues potentiell *Target* von Sorafenib ist. Der genaue Einfluss von Sorafenib auf den c-Met-Rezeptor und die damit verbundenen Konsequenzen für die Zellen werden in einer separaten experimentellen medizinischen Doktorarbeit untersucht (Kaweh Beizaei). Im

Rahmen dieser Arbeit soll im Folgenden mit einem weitreichenderen explorativen Ansatz die Aktivität eines größeren Panels an Kinasen hinsichtlich einer potentiellen Sorafenib-Inhibition untersucht werden.

5.4.2.2 Tyrosine Kinase PamChip®Array

Mit Hilfe der PamGene®Technologie kann die Kinaseaktivität von Tyrosinkinase in einem Zelllysate untersucht und ein Kinaseaktivitätsprofil erstellt werden. Die Analyse erfolgt auf einem PamChip®, der aus vier Mikroarrays besteht. Jeder Mikroarray besitzt auf einer porösen Keramikmembran jeweils 144 Spots mit immobilisierten Peptidsequenzen, die spezifische Phosphorylierungsstellen besitzen. Aufgrund der Spezifität von Kinasen gegenüber bestimmten Peptidsequenzen kann das detektierte Phosphorylierungsmuster auf die jeweilige verantwortliche Kinase zurückgeführt werden. Eine Besonderheit der PamGene®Technologie ist, dass die Inhibition der Kinasen und dem damit verbundenen Phosphorylierungspotentials in Echtzeit unmittelbar auf dem *Tyrosine Kinase PamChip®Array* erfolgt. Um die Kinaseaktivität der HNSCC-Zelllinien zu untersuchen, wurden Zelllysate von proliferierenden Zellen hergestellt. Die Proben wurden direkt auf dem *Tyrosine Kinase PamChip®Array* mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt und die Kinaseaktivität in technischen Triplikaten gemessen.

In Abbildung 5.20 A ist die Signalintensität der entsprechenden Phosphorylierungsstellen anhand einer *heat map*-Übersicht dargestellt. Jede Zeile in der *heat map* entspricht einer spezifischen Peptidsequenz, wobei eine rote Markierung für eine starke Phosphorylierung bzw. eine blaue Markierung für eine schwache Phosphorylierung steht. Die Übersicht verdeutlicht, dass für alle sechs HNSCC-Zelllinien eine Verminderung der Phosphorylierung nach Sorafenib-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet wurde (Farbverschiebung zu blau). Zudem scheint Sorafenib in allen sechs Zelllinien eine vergleichbare inhibitorische Wirkung zu haben, welche unabhängig von der Zugehörigkeit, *Responder* und *Non-Responder*, ist. Die *upstream*-Kinasen in Abbildung 5.20 B wurden durch bioinformatische Berechnungen ermittelt und am Beispiel der SAS-Zellen dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass acht Kinasen durch Sorafenib signifikant inhibiert wurden (rote Balken mit negativen normalisierten Werten, Abbildung 5.20 B). Weitere sieben Kinasen (weiße bis hellgraue Balken, siehe Abbildung 5.20 B) wurden ebenfalls durch Sorafenib inhibiert, wenngleich die Wahrscheinlichkeit für eine reduzierte Kinaseaktivität geringer ist. Eine Übersicht der durch Sorafenib-inhibierten *upstream*-Kinasen aller untersuchten HNSCC-Zelllinien liefert die Tabelle 5.1. Diese Auflistung verdeutlicht zum einen, dass die Anzahl der Sorafenib-inhibierten Kinasen innerhalb der *Responder* bzw. der *Non-Responder*-Zelllinien merklich variiert (SAS: 15 Kinasen; UT-SCC 60B: 7; UT-SCC 29: 12; HSC4: 10; UT-SCC 5: 9; Cal33: 13). Zum anderen wurde innerhalb der jeweiligen Subpopulationen eine deutliche Heterogenität nach Sorafenib-Behandlung beobachtet, die bereits in den vorangegangenen Experimenten des MAPK-Signalwegs bzw. des c-Met-Rezeptors deutlich wurde (Abbildung 5.16 und Abbildung 5.19). Obwohl die starke Heterogenität eine Vereinheitlichung der

Sorafenib-Targets für die Gesamtheit der HNSCC-Responder nahezu unmöglich macht, stachen anhand der *upstream*-Analyse zumindest zwei Tyrosinkinasen hervor.

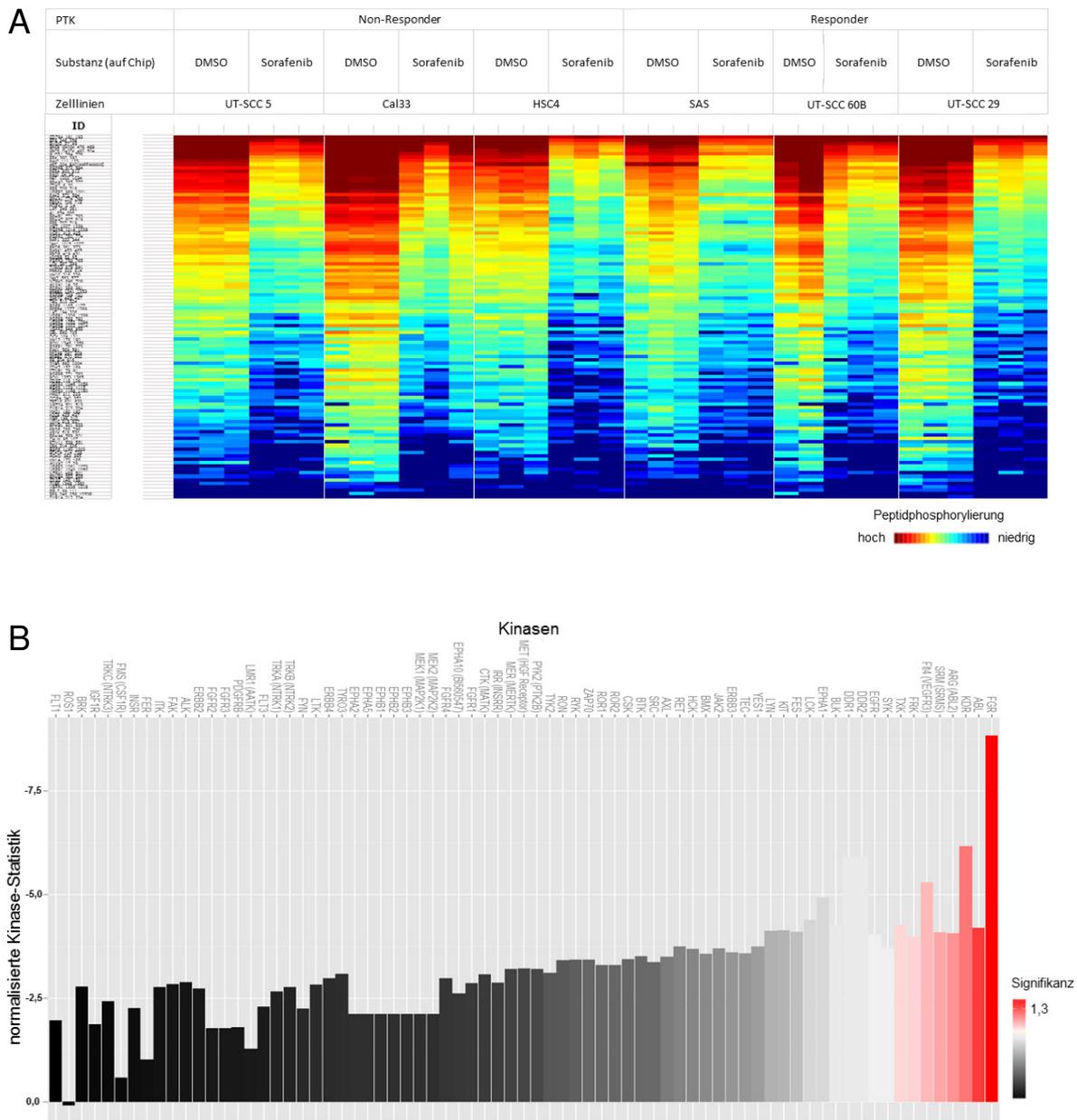


Abbildung 5.20 Analyse der Tyrosinkinaseaktivität nach Sorafenib-Behandlung auf dem *Tyrosine Kinase PamChip®* Array.

Der *Tyrosine Kinase PamChip®* Array ermöglicht mit dem Protein-Tyrosinkinase-Assay die Analyse von 144 Peptidsequenzen. Hierzu wurden proliferierende Zellen geerntet. Die Zelllysate wurden *in vitro* mit DMSO bzw. 10 μ M Sorafenib behandelt. Die Analyse der Proteinkinaseaktivität erfolgte durch Detektion der Phosphorylierung der immobilisierten Peptidsequenzen mit Fluoreszenz-markierten anti-Phosphoantikörpern. (A) Visualisierung der Peptidphosphorylierung mittels einer *heat map*-Übersicht anhand von drei *Respondern* (SAS, UT-SCC 29, UT-SCC 60B) und drei *Non-Respondern* (Cal33, HSC4, UT-SCC 5) nach DMSO/Sorafenib-Behandlung. Eine Zeile entspricht einer Peptidsequenz, rote Markierung stellt eine hohe und blaue eine niedrige Peptidphosphorylierung dar. Dargestellt wurden technische Triplikate. (B) Exemplarische Darstellung der bioinformatischen Auswertung zur Identifizierung der *upstream*-Kinasen anhand der SAS-Zelllinie. Negative Werte der normalisierten Kinase-Statistik stellen eine inhibierte Kinaseaktivität durch Sorafenib, positive Werte eine erhöhte Kinaseaktivität dar. Die Zahlenwerte spiegeln ein Vielfaches der veränderten Kinaseaktivität nach Sorafenib-Behandlung wider. Die roten Balken signalisieren hierbei eine signifikante Veränderung der Kinaseaktivität durch Sorafenib, schwarze Balken keine signifikante Veränderung.

So inhibierte Sorafenib die Aktivität von KDR/VEGFR-2 in allen drei *Responder*-Zelllinien und nur in einer *Non-Responder*-Zelllinie (HSC4; hervorgehoben, siehe Tabelle 5.1). Des Weiteren wurde EphA1 in zwei von drei *Respondern* (SAS, UT-SCC 29) und in keiner *Non-Responder*-Zelllinie inhibiert. Diese Tyrosinkinase könnten somit *Targets* von Sorafenib sein, welche die *Responder*-Zelllinien charakterisieren.

Tabelle 5.1 Übersicht der identifizierten *upstream*-Kinasen nach Sorafenib-Inhibition

Auswertung der Datenanalyse, bioinformatische Berechnungen und die Identifizierung der veränderten *upstream*-Kinasen erfolgte mit dem Programm Bionavigator2 der Firma PamGene. Aufgelistet sind *upstream*-Kinasen mit einer signifikant verminderten Aktivität (rot hinterlegt) bzw. eine sehr wahrscheinlichen reduzierten Aktivität nach Sorafenib-Behandlung (grau hinterlegt). Fett hervorgehoben sind potentielle Sorafenib-*Targets*.

<i>Responder</i>			<i>Non-Responder</i>		
SAS	UT-SCC 60B	UT-SCC 29	HSC4	UT-SCC 5	Cal33
FGR	KDR/VEGFR-2	EGFR	KDR/VEGFR-2	TEC	FAK
ABL	AXL	FGR	FRK	MER (MERTK)	ALK
KDR/VEGFR-2	FES	ERBB4	FFR2		ERBB3
ARG (ABL2)		ERBB2	DDR1		
SRM (SRMS)		RON	SRM (SRMS)		
Flt4 (VEGFR3)		TRKB (NTRK2)			
FRK		EPHA1			
TXK		TRKC (NTRK3)			
SYK	FRK	YES1	FGR	RET	MEK2 (MAP2K2)
EGFR	TYRO3	SRG	Flt4 (VEGFR3)	TYRO3	MEK1 (MAP2K1)
DDR2	MER (MERTK)	KDR/VEGFR-2	JAK2	FGR	EPHB2
DDR1	FGR	LYN	EGFR	ARG (ABL2)	EPHB1
BLK			Ron	LCK	EPHA2
EPHA1				LYN	EPHA10
LCK				EGFR	CSK
					CTK (MATK)
					FRK
					FER

Da, wie unter Abschnitt 5.4.1 erwähnt, der Nachweis der Expression von KDR/VEGFR-2 für diese Zelllinien via Western Blot nicht möglich war (Daten nicht gezeigt), wurde im Folgenden die Expression und Phosphorylierung von EphA1 mittels Western Blot untersucht. Die Expression von EphA1 ist in allen sechs Zelllinien – trotz ausgeprägter Nebenbanden – deutlich zu sehen (Abbildung 5.21, Pfeil). Die Detektion von Phospho-EphA1 (Y605) war allgemein schwach ausgeprägt. Dennoch zeigte sich nach Sorafenib-Behandlung eine Reduktion von Phospho-EphA1 bei den *Respondern* UT-SCC 29 und UT-SCC 60B und bei den *Non-Responder*-Zelllinien HSC4 und UT-SCC 5. Mit Ausnahme der HSC4 wurde auch nach Sorafenib und Bestrahlung eine verminderte Phosphorylierung von EphA1 in diesen Zelllinien beobachtet. Der *Non-Responder* Cal33 zeigte eine leicht erhöhte Phosphorylierung von EphA1 nach Sorafenib-Behandlung, aber keine Veränderung mit Sorafenib und Bestrahlung. Die

SAS-Zellen zeigten keine Veränderung der Phosphorylierung von EphA1 nach Sorafenib-Behandlung. Somit konnte die veränderte Kinaseaktivität von EphA1 von dem *Tyrosine Kinase PamChip®Array* einzig für die UT-SCC 29 auf Ebene der Phosphorylierung bestätigt werden (Tabelle 5.1). Dennoch scheint Sorafenib die Phosphorylierung auch in der *Responder*-Zelllinie UT-SCC 60B und den *Non-Responder*-Zelllinien HSC4 und UT-SCC 5 zu inhibieren.

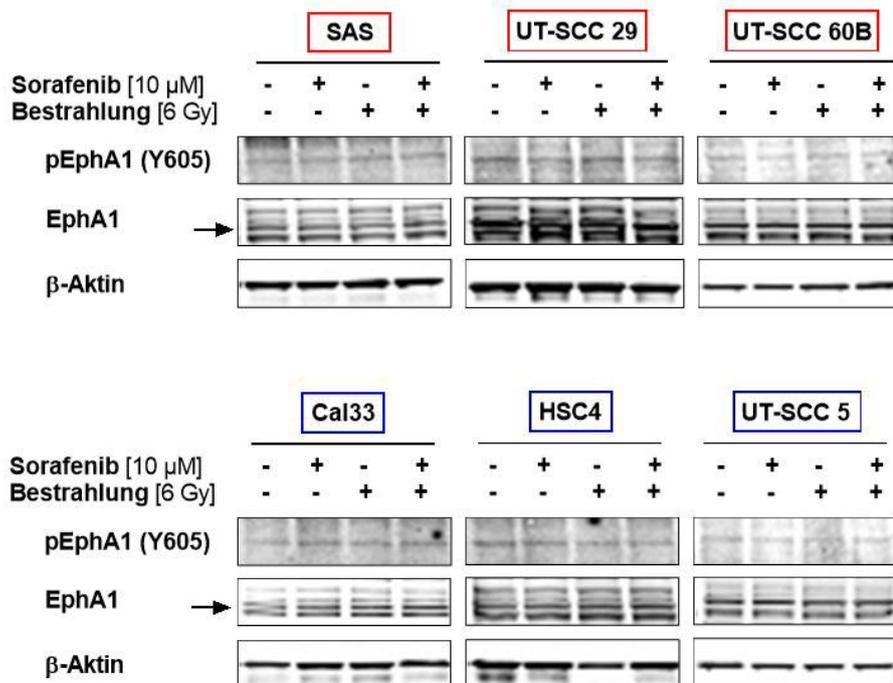


Abbildung 5.21 Expression und Phosphorylierung von EphA1 in HNSCC-Zelllinien.

Der Nachweis der EphA1 Expression (Pfeil) und Phosphorylierung an Tyrosin 605 erfolgte anhand von drei *Responder*- (SAS, UT-SCC 29, UT-SCC 60B) und drei *Non-Responder*-Zelllinien (Cal33, HSC4, UT-SCC 5). Hierzu wurden proliferierende Zellen für 2 h mit DMSO bzw. 10 µM Sorafenib behandelt und bestrahlt (0, 6 Gy). Anschließend wurden die Proben lysiert und mittels Western Blot analysiert. Dargestellt ist ein Experiment (n=1).

Die Analyse der Kinaseaktivität mit Hilfe der PamStation® lieferte keine eindeutigen Ergebnisse über eine mögliche Kinase, die in den drei *Responder*-Linien, nicht jedoch in den *Non-Responder*-Linien, durch Sorafenib inhibiert wird. Ein Grund hierfür könnte sein, dass möglicherweise nicht einzelne Kinasen sondern vielmehr Kinase-Subfamilien für die Strahlensensitivierung verantwortlich sind. Deshalb wurden die identifizierten *upstream*-Kinasen der PamStation®Experimente in einem phylogenetischen Baum visualisiert. Dieser phylogenetische Baum beschreibt die Kinase-Klassifikation primär durch den Vergleich der Sequenz der katalytischen Domäne und unter Berücksichtigung der Sequenzähnlichkeit und die Domänenstruktur außerhalb der katalytischen Domäne [150]. In Abbildung 5.23 ist ein vollständiger phylogenetischer Baum mit den sieben beschriebenen Kinasen, deren Gruppen-Hierarchie, sowie deren Familien und Subfamilien von Manning *et al.* dargestellt [150]. Hierbei entsprechen die Kreise den ermittelten Wahrscheinlichkeiten der Sorafenib-inhibierten *upstream*-Tyrosinkinasen aus Abbildung 5.20 B, wobei eine Verkleinerung des Kreisdurchmessers für

eine Abnahme der inhibitorischen Wirkung von Sorafenib steht. Der phylogenetische Baum der SAS-Zellen zeigt zum Beispiel, dass die Src-Familie mit den Mitgliedern Fgr, Srm, Frk, Blk, Lck, Lyn, Yes1, Src, Brk, Hck und Fyn zum Teil deutlich durch Sorafenib inhibiert wurden (Abbildung 5.22 und Abbildung 5.23; oben links).

Der optische Vergleich der phylogenetischen Bäume in Abbildung 5.23 zeigte, dass tendenziell mehrere Mitglieder einer Kinase-Subfamilie durch Sorafenib inhibiert werden. So ist die ErbB-Familie in UT-SCC 29 mit dem EGFR, ErbB2 und ErbB4 inhibiert. UT-SCC 60B zeigte eine verminderte Aktivität der Kinase-Subfamilie mit Ax1, Tyro3 und Mer. Jedoch wurde innerhalb der *Responder*-Linien keine gemeinsame Sorafenib-inhibierte Kinase-Subfamilie beobachtet. Auch der Vergleich zwischen *Responder* und *Non-Responder*-Linien zeigte aufgrund der ausgeprägten Heterogenität nach Sorafenib-Behandlung keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich einer Sorafenib-inhibierten Kinase-Subfamilie.

Auch wenn offenbar keine Kinase-Subfamilie für die Sorafenib-induzierte Strahlensensitivierung in den drei Sorafenib-*Respondern* im Vergleich zu den *Non-Respondern* identifiziert wurde, so könnte sich möglicherweise ein Zusammenhang aus der Anzahl inhibierter Kinasen und der Wirkung von Sorafenib auf die HNSCC-Zelllinien erschließen. Aus diesem Grund wurde in Tabelle 5.2 eine mögliche Korrelation zwischen der Anzahl inhibierter Kinasen und der Inhibition der Proliferation, des zellulären Überlebens bzw. des DEF_{0,67} aufgeführt. Es zeigte sich, dass mit der PamStation® 8 Kinasen in SAS, 5 Kinasen in HSC4, 3 Kinasen in UT-SCC 60B und 2 Kinasen in UT-SCC 5 signifikant inhibiert sind (siehe auch Tabelle 5.1). Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert) von Sorafenib hinsichtlich der Proliferation zeigte, dass SAS ca. 3,6 µM, HSC4 ca. 4,1 µM, UT-SCC 60B ca. 5,5 µM und UT-SCC 5 ca. 6 µM Sorafenib benötigen um die Proliferation um 50 % zu reduzieren. Somit nimmt die Anzahl der inhibierten Kinasen ab und gleichzeitig steigt die IC₅₀-Konzentration von Sorafenib von SAS über HSC4, UT-SCC 60B und UT-SCC 5 an und könnte damit einen Zusammenhang zwischen der Menge an Sorafenib-*Targets* und der Proliferationsinhibition darstellen. Keinen Zusammenhang zeigte sich hingegen zwischen dem zellulären Überleben aus Abbildung 5.3 und der Anzahl inhibierter Kinasen (Tabelle 5.2). Auch der DEF_{0,67} aus Abbildung 5.4 korreliert scheinbar nicht mit der Anzahl inhibierter Kinasen (Tabelle 5.2).

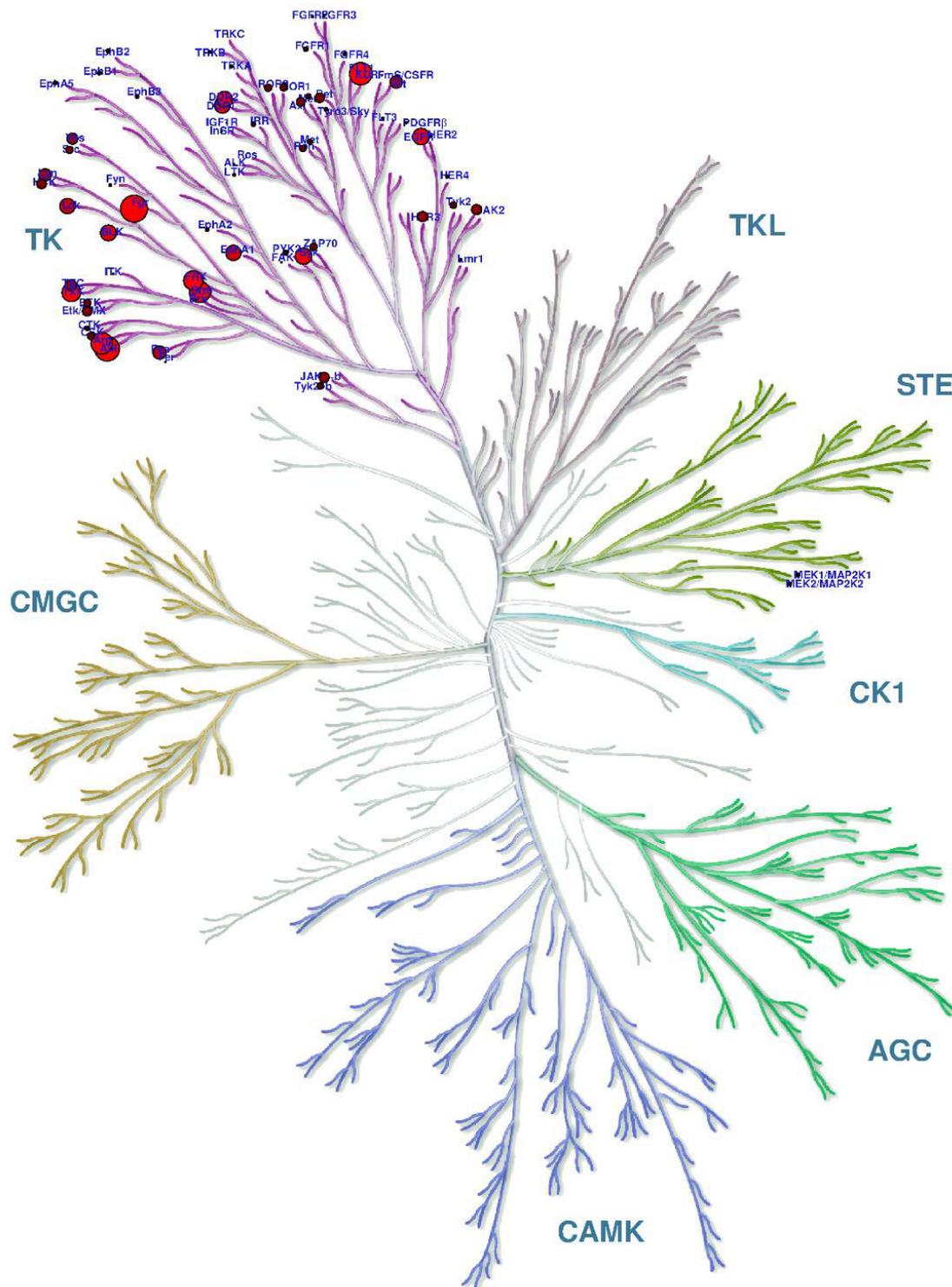


Abbildung 5.22 Darstellung der Tyrosinkinase als phylogenetischer Baum.

Kinom-Bäume veranschaulichen die Zugehörigkeit der verschiedenen humanen Kinasen. Hierbei gibt es sieben Kinasegruppen nach Manning *et al.*: Tyrosinkinase (TK), Tyrosinkinase-ähnliche Kinasen (engl. *tyrosine kinase-like* TKL); Gruppierung der Hefe assoziierten Steril-7/-11/-20-ähnlichen Kinasen (STE); Caseinkinase 1 (CK1); Gruppierung der Proteinkinasen A, G und C (AGC); Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CAMK); Gruppierung der Cyclin-abhängigen Kinasen, Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen, Glycogensynthase-Kinase 3-ähnlichen Kinasen, und CDK-ähnliche Kinasen, (CMGC) [150]. Hier dargestellt ist die Sorafenib-vermittelte Inhibition der *upstream*-Kinasen aus der PamChip®-Analyse (siehe Abschnitt 5.4.2) am Beispiel der SAS-Zellen. Die Größe der Blätter spiegelt die Wahrscheinlichkeit für eine Inhibition der Kinaseaktivität nach Sorafenib-Behandlung wider (siehe Abbildung 5.20 B). Erstellung des phylogenetischen Baums durch *Najmanovich Research Group* und mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com).

Tabelle 5.2 Gegenüberstellung der Sorafenib-induzierten Kinaseinhibition, Proliferation und zelluläres Überleben nach Sorafenib-Behandlung

Gegenüberstellung der Anzahl signifikant inhibierter Kinasen (siehe Tabelle 5.1), Proliferationsinhibition (IC_{50} , siehe Abbildung 5.1 B), zelluläres Überleben (siehe Abbildung 5.3) und $DEF_{0,67}$ (siehe Abbildung 5.4 B) nach Sorafenib-Behandlung.

	Anzahl der signifikant inhibierten Kinasen nach 10 μ M Sorafenib	Proliferation IC_{50}	zelluläre Überleben bei 10 μ M Sorafenib	$DEF_{0,67}$
SAS	8	3,6 μ M	80 %	1,48
HSC4	5	4,1 μ M	54 %	0,60
UT-SCC 60B	3	5,5 μ M	56 %	1,45
UT-SCC 5	2	6 μ M	72 %	1,09

Insgesamt konnten mit Hilfe der PamStation® Experimente mehrere potentielle Zielkinasen von Sorafenib identifiziert werden. Dabei deutet sich in ersten Validierungsexperimenten an, dass zumindest in einem Teil der Zellen die Rezeptortyrosinkinase EphA1 ein *Target* von Sorafenib ist. Ob die Inhibition von EphA1 eine Rolle für die Strahlensensitivierung bzw. die anderen biologischen Effekte von Sorafenib spielt, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Experimente zur Signaltransduktion zwar keine eindeutige Assoziation einer bestimmten Kinase mit denen durch Sorafenib induzierten biologischen Effekten zulassen, die Arbeiten haben aber mit c-Met und EphA1 mindestens zwei neue potentielle Zielkinasen identifiziert. Weiterhin scheint bei Multikinaseinhibitoren auch die Anzahl der inhibierten Kinasen für etwaige inhibitorische Effekte wichtig zu sein. Zudem unterstreichen die Arbeiten die Bedeutung der grundlegenden molekularen Analyse von *Targeting*-Ansätzen und zeigen die Notwendigkeit zur Individualisierung dieser Therapieform.

6 Diskussion

Kopf-Hals-Tumoren stellen die sechsthäufigste maligne Tumorentität der Welt dar. Die Aggressivität spiegelt sich besonders in dem schlechten 5-Jahresüberleben von ca. 50 % wider. Trotz zahlreicher Optimierungen gerade im Falle der Standardtherapie konnte in den letzten Jahrzehnten keine deutliche Verbesserung des Patientenüberlebens erreicht werden. Dieser eingeschränkte Therapieerfolg zeigt deutlich, dass neue Ansatzpunkte für eine verbesserte Tumorthherapie benötigt werden. Hierbei rückt besonders das molekulare *Targeting* in den Fokus der heutigen Tumorforschung. Im Gegensatz zum Normalgewebe zeichnen sich Tumorzellen häufig durch hyperaktive Kinasen aus. Mit Hilfe des molekularen *Targetings* sollen gezielt diese veränderten Kinasen bzw. Kinase-abhängigen Signalwege inhibiert werden, im besten Falle ohne dass sich dies negativ auf das Normalgewebe auswirkt. Aufgrund der großen Heterogenität der HNSCC tritt zudem die Suche nach prädiktiven Biomarkern in den Vordergrund, die eine Vorhersage für ein mögliches Therapieansprechen liefern und dadurch eine personalisierte Tumorthherapie ermöglichen sollen.

In Hinblick auf die zukunftsorientierte personalisierte Therapie sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wirksamkeit eines vielversprechenden *small molecule* Inhibitors, des Multikinaseinhibitors Sorafenib, auf HNSCC-Zelllinien untersucht werden. Hierbei wurde explizit die Wirkung von Sorafenib allein und in Kombination mit einer Röntgenbestrahlung untersucht. Zudem sollte der zugrundeliegende Mechanismus einer möglichen Strahlensensitivierung von Sorafenib identifiziert werden. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit fokussierte sich auf den Einfluss von Sorafenib auf das Kinom der HNSCC-Zelllinien und die Identifizierung möglicher Zielkinasen.

Es zeigte sich, dass Sorafenib in HNSCC-Zelllinien zu einer Inhibition der Proliferation und zu einer deutlichen Zellinaktivierung führt. Weiterhin wurden ein Drittel der untersuchten HNSCC-Zelllinien durch Sorafenib strahlensensitiviert. Der Grund für die Strahlensensitivierung ist dabei nicht auf eine verstärkte Apoptose oder frühen permanenten Zellzyklusarrest zurückzuführen, sondern auf eine beeinträchtigte DNA-DSB-Reparatur. In weiterführenden Analysen wurde deutlich, dass dies auf die Inhibition des NHEJ zurückgeht. Die Analysen des Kinoms in den HNSCC-Zelllinien in Abhängigkeit zur Sorafenib-Behandlung zeigten ein sehr heterogenes Bild. Dennoch konnten zwei Rezeptortyrosinkinasen, c-Met und EphA1, als neue potentielle *Targets* von Sorafenib identifiziert werden. Welchen Einfluss die Inhibition dieser Kinasen auf das zelluläre Überleben hat, muss in nachfolgenden Studien geklärt werden.

6.1 Wirkung von Sorafenib auf HNSCC-Zelllinien

Der Multikinaseinhibitor Sorafenib wurde von *Bayer Pharmaceuticals* entwickelt, um Tumorzellen gezielt zu inaktivieren. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Sorafenib in der Einzelbehandlung eine anti-proliferative und zytotoxische Wirkung in verschiedenen Tumorentitäten hat [111]. Deshalb sollte die alleinige Wirkung klinisch relevanter Sorafenib-Konzentration in HNSCC-Zelllinien überprüft werden. In dieser Arbeit zeigten alle getesteten HNSCC-Zelllinien eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation bei kontinuierlicher Sorafenib-Behandlung bzw. eine Wachstumsverzögerung bei kurzzeitiger Sorafenib-Behandlung (24 h). Dieser anti-proliferative Effekt von Sorafenib wird durch zahlreiche Studien in anderen Tumorentitäten unterstützt [112, 131, 135, 151, 152]. In Hinblick auf die klinische Anwendung ist für die kurative Therapie jedoch weniger der anti-proliferative Effekt von Bedeutung, sondern vielmehr die vollständige Inaktivierung aller Tumorzellen. In diesem Sinne zeigten die Analysen der HNSCC-Zelllinien eine deutliche Zellinaktivierung nach Sorafenib-Behandlung, die ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen in anderen Tumorentitäten beobachtet wurden [126, 131, 153, 154].

Insgesamt konnte daher gezeigt werden, dass Sorafenib – wie in anderen Tumorentitäten auch – bei HNSCC-Zelllinien anti-tumorigene Eigenschaften besitzt. Jedoch zeigte in bisherigen klinischen Studien die Behandlung von HNSCC-Patienten mit Sorafenib als Monotherapie keine Vorteile gegenüber vergleichbaren molekularen *Targeting*-Vertretern [121, 122]. Aufgrund verschiedener Studien ist aber anzunehmen, dass eine Kombinationsbehandlung von Sorafenib mit einer Strahlentherapie oder Radiochemotherapie zu einer Verbesserung des Therapieansprechens führen könnte.

6.2 Strahlensensibilisierung durch Sorafenib

HNSCC-Patienten, insbesondere mit fortgeschrittenen Tumorstadien, erfahren derzeit eine kombinierte Therapie aus Operation, Chemotherapie und Röntgenstrahlung. Das Ziel der kurativen Strahlentherapie ist die Zellinaktivierung aller Tumorzellen. Jedoch kommt es im Verlauf der Therapie bei HNSCC-Patienten häufig zur Rezidivbildung, die insbesondere auf strahlenresistente Tumorzellen zurückzuführen ist. Eine Möglichkeit ein besseres Therapieansprechen zu erlangen, ist eine Strahlensensitivierung der Tumorzellen. Studien der Arbeitsgruppe sowie eigene Daten konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von HNSCC-Zelllinien eine ausgeprägte Heterogenität mit strahlensensiblen aber auch sehr strahlenresistenten Zelllinien aufweist (siehe Abschnitt 5.2) [134-136]. Da eine Strahlensensitivierung aber vor allem für die resistenten

Tumoren notwendig ist, ist es sinnvoll, Ansätze zum molekularen *Targeting* an strahlenresistenten Zelllinien zu testen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Wirkung von Sorafenib bezüglich einer strahlensensitivierenden Wirkung vor allem an strahlenresistenten HNSCC-Zelllinien untersucht. Insgesamt zeigte sich, dass Sorafenib strahlenresistente HNSCC-Zelllinien sensitivieren kann (siehe Abbildung 5.4 B). Die für den weiteren Verlauf dieser Arbeit ausgewählten strahlensensitivierbaren *Responder*-Zelllinien, SAS und UT-SCC 60B, wiesen einen $DEF_{0,67}$ von ungefähr 1,5 auf. Das bedeutet, dass 2 Gy Bestrahlung mit Sorafenib wie 3 Gy Bestrahlung ohne Sorafenib wirken und damit die Strahlenwirkung deutlich verstärkt wird. Dabei stehen diese Ergebnisse im Einklang mit den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die auch in anderen Tumorentitäten eine strahlensensitivierende Wirkung von Sorafenib zeigen konnten [125-127, 131]. Dass die Strahlensensitivierung durch Sorafenib kein generelles Phänomen ist, verdeutlicht die Tatsache, dass nur ein Drittel der getesteten HNSCC-Zelllinien sensitiviert wurde (siehe Abbildung 5.4) und Sorafenib in einigen Tumorentitäten, wie z.B. Kolorektalkarzinom, Kolonkarzinom und Glioblastom, zu keiner Strahlensensitivierung führt [128, 129, 152].

Auf zellulärer Ebene scheint die Strahlensensitivierung durch Sorafenib z.B. gegenüber dem EGFR-*Targeting* überlegen zu sein. So konnten zwar strahlenresistente HNSCC-Linien nach EGFR-Inhibition sensitiviert werden, jedoch beruht diese Strahlensensitivierung auf reversible Zellzyklusarreste, welche nach Re-Stimulierung der Tumorzellen aufgehoben werden können [132]. Diese reversible Sensitivierung nach EGFR-Inhibition wurde auch für andere Tumorentitäten beschrieben [133, 155]. Im Gegensatz dazu induziert Sorafenib eine nicht reversible Sensitivierung, die auch unter *delayed plating*-Bedingungen, also nach einer Re-Stimulierung der Zellen, zu beobachten ist (siehe Abbildung 5.4 B).

Im Gegensatz zu Tumorzellen konnte keine Strahlensensitivierung nach Sorafenib-Behandlung von Normalgewebsfibroblasten beobachtet werden [136]. Dass sich die strahlensensitivierende Wirkung von Sorafenib anscheinend nur in Tumorzellen zeigt, ist für eine eventuelle klinische Anwendung von großer Bedeutung, da somit keine zusätzliche Strahlenschädigung des Normalgewebes zu erwarten ist. Darüber hinaus scheint Sorafenib in HNSCC-Patienten relativ gut verträglich zu sein [121, 122].

Von klinischer Bedeutung ist auch die Wechselwirkung von Sorafenib mit Cisplatin, da Patienten mit fortgeschrittenen HNSCC derzeit eine Radiochemotherapie erhalten. Diesbezüglich konnten Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen, dass Sorafenib mit Cisplatin und Bestrahlung zu einer massiven Zellinaktivierung von HNSCC-*Respondern*, insbesondere der in dieser Arbeit untersuchten SAS und UT-SCC 60B, führt [136]. Im Falle der Normalzellen konnte jedoch sogar eine Resistenz der Zellen gegenüber Cisplatin nach Sorafenib-Behandlung beobachtet werden [136].

Aufgrund der strahlensensitivierenden Wirkung von Sorafenib auf HNSCC-Zellen, der zusätzlichen Zellinaktivierung in Kombination mit einer Cisplatin-Behandlung und des geringen Einflusses auf Normalzellen, scheint sich Sorafenib somit ideal für eine Kombinationsbehandlung von

HNSCC-Patienten anzubieten. Jedoch wurden in den vorliegenden Versuchen nicht alle HNSCC-Linien durch Sorafenib strahlensensitiviert, weshalb auch nicht davon auszugehen ist, dass alle HNSCC-Patienten von einer Behandlung mit Sorafenib profitieren würden. Um jedoch die Patienten zu identifizieren, die von dieser Therapie profitieren, müssen die zugrundeliegenden Mechanismen der Strahlensensitivierung durch Sorafenib entschlüsselt und prädiktive Biomarker identifiziert werden.

Zunächst wurden innerhalb der Arbeit eine verstärkte Apoptose-Induktion und frühe permanente Zellzyklusarreste als Ursache für die Strahlensensibilisierung untersucht. In den getesteten *Responder*-Zelllinien konnte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Apoptose-Induktion nach Sorafenib-Behandlung und Bestrahlung beobachtet werden, sodass eine Sorafenib-vermittelte Apoptose wahrscheinlich nicht die Ursache für die Strahlensensitivierung der HNSCC-Zelllinien ist (siehe Abschnitt 5.3.1). Aufgrund der geringen Anzahl an Zellen, die in G1- bzw. S/G2-Phase arretiert sind, wird die Sorafenib-induzierte Strahlensensitivierung auch nicht durch frühe permanente Zellzyklusarreste verursacht (siehe Abschnitt 5.3.2). Einen Beitrag zur Strahlensensitivierung könnten auch sekundäre permanente Zellzyklusarreste leisten. Da diese aber das Ergebnis einer fehlerhaften DNA-Reparatur sind, wurden diese Arreste nicht weiter untersucht, sondern direkt die DNA-Reparatur analysiert.

6.3 Inhibition der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur als Ursache für die Strahlensensibilisierung durch Sorafenib

DNA-DSB sind die Hauptursache für das Absterben von Zellen solider Tumoren nach Röntgenbestrahlung. Dem gegenüber steht die DSB-Reparatur, die es den Zellen ermöglicht auch die Induktion einer relativ hohen Anzahl an DSB zu überleben [36, 156]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sorafenib zu einer signifikanten Inhibition der DNA-DSB-Reparatur in den *Responder*-Zelllinien führt. Die Daten legen nahe, dass dies wahrscheinlich durch die Inhibition des NHEJ ausgelöst wird, vermutlich über die Beeinflussung des Schlüsselproteins des NHEJ, der Proteinkinase DNA-PKcs. Letztlich konnte gezeigt werden, dass diese Inhibition des NHEJ die Ursache für die strahlensensitivierende Wirkung von Sorafenib ist.

Im Zuge der Analyse der DNA-DSB-Reparatur konnten mit Hilfe der Konstant-Feld-Gelelektrophorese (CFGE) strahlungsinduzierte DSB quantifiziert werden, indem geschädigte DNA-Fragmente durch ein elektrisches Feld aufgetrennt wurden. Die Menge an geschädigter DNA liefert hierbei Rückschlüsse über die DNA-DSB-Reparaturkapazität. Nach Behandlung mit Sorafenib zeigte die *Responder*-Zelllinie UT-SCC 60B eine gleichbleibend hohe Menge an geschädigter DNA, was auf eine verminderte DNA-DSB-Reparatur zurückzuführen ist (siehe Abbildung 5.10 E). Die DMSO-behandelten Zellen hingegen zeigten über die Zeit eine Abnahme der geschädigten DNA-Menge, sodass eindeutig eine DNA-DSB-Reparatur stattfand. Im Gegensatz dazu zeigte die untersuchte *Non-Responder*-Zelllinie UT-SCC 5 eine vergleichbare DSB-Reparatur nach Sorafenib wie die Kontrollzellen. Die CFGE wies

dabei zwei deutliche Limitierungen auf, sowohl ein sehr starkes Hintergrundsignal, als auch ein möglicherweise falsch-positives Signal, durch die fehlende Größenauftrennung der DNA-Moleküle in fragmentierte und degradierte DNA-Moleküle. Aus diesem Grund wurde die DNA-DSB-Reparatur mit der Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) überprüft. Es konnte mit der PFGE eine reduzierte DNA-DSB-Reparatur nach Sorafenib-Behandlung in dem *Responder* UT-SCC 60B bestätigt werden. Zudem führte Sorafenib in den SAS-Zellen ebenfalls zu einer verminderten DNA-DSB-Reparatur, während die beiden *Non-Responder*-Zelllinien, HSC4 und UT-SCC 5, keine beeinträchtigte DNA-DSB-Reparatur nach Sorafenib-Behandlung zeigten. Obwohl die Unterschiede in der DNA-DSB-Reparatur nach Inhibition mit Sorafenib nur sehr gering sind (siehe Abbildung 5.11 C), kann davon ausgegangen werden, dass daraus die Strahlensensitivierung resultiert, da bereits geringe Unterschiede in der DSB-Reparatur starke Auswirkungen auf das Überleben der Zellen haben [157]. Letztendlich beruht diese reduzierte DNA-DSB-Reparatur nach Sorafenib-Behandlung vermutlich auf einer Inhibition des NHEJ und nicht auf einer verminderten HR oder Alt-EJ (siehe Abschnitt 5.3.4).

Diese Schlussfolgerung basiert auf der Beobachtung, dass selbst die Inhibition der HR durch RI-1 zu keiner Strahlensensitivierung der *Responder*-Zelllinie SAS führte und die Kombinationsbehandlung mit Sorafenib und RI-1 eher eine Aufhebung des strahlensensitivierenden Effekts von Sorafenib bewirkte (siehe Abbildung 5.12 B). Somit scheint zumindest Sorafenib keinen inhibitorischen Einfluss auf die HR zu haben. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass Möckelmann *et al.* ebenfalls zeigen konnten, dass die Kombination aus Cisplatin- und Sorafenib-Behandlung zu keiner Verstärkung der Strahlensensitivierung in HNSCC-Linien führte, obwohl die Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Crosslinks durch die HR erfolgt [136, 158].

Auch zeigt die Analyse des Alt-EJ in den SAS-Zellen, dass Sorafenib nicht zu einer Inhibition des Alt-EJ führt, da die Kombination beider Inhibitoren additive Effekte zeigten (siehe Abbildung 5.13 C).

Das klonogene Überleben der SAS-Zellen nach Inhibition des NHEJ durch Nu7026 legt hingegen nahe, dass die Inhibition der NHEJ-Reparatur durch Sorafenib die Ursache für die Strahlensensitivierung ist, da besonders die Kombinationsbehandlung mit Sorafenib und Nu7026 eine vergleichbare Strahlensensitivierung wie die beiden Einzelbehandlungen zeigte (siehe Abbildung 5.14 C). Daraus ergibt sich die Frage, was die Ursache für die verminderte NHEJ-Reparatur ist, weshalb die Expression der wichtigsten NHEJ-Reparaturproteine und die Phosphorylierung der DNA-PKcs überprüft wurden. Ein Einfluss von Sorafenib auf die Expression der wichtigsten Proteine des NHEJ konnte nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 5.15 A). Im Falle der Phosphorylierung der DNA-PKcs konnte zwar kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, jedoch deuten die Resultate darauf hin, dass Sorafenib die T2609-Phosphorylierung von DNA-PKcs in den *Respondern* stärker beeinflusst als in den *Non-Respondern*. Diese spezielle Phosphorylierungsstelle zeichnet sich dadurch aus, dass sie nicht nur durch die DNA-PKcs selber, sondern auch durch die *upstream*-Kinasen ATM bzw. ATR phosphoryliert werden kann [145, 147]. Aus diesem Grund scheint Sorafenib die Proteinkinase DNA-PKcs weniger direkt sondern vielmehr indirekt über die *upstream*-Kinasen ATM/ATR zu inhibieren, da die

Autophosphorylierungsstelle S2056 nicht durch Sorafenib beeinflusst wurde (siehe Abbildung 5.15). Eine weitere Hypothese könnte sein, dass die HNSCC-*Responder* das NHEJ wesentlich stärker nutzen, während die *Non-Responder* tendenziell das Alt-EJ bevorzugen. Dies hätte zur Folge, dass bei den *Responder*-Linien eine Inhibition des NHEJ zur Strahlensensitivierung führt, nicht jedoch bei den *Non-Respondern*. Dies konnte bereits für die SAS-Zellen gezeigt werden, die zu gleichen Teilen das NHEJ und das Alt-EJ nutzen, jedoch Sorafenib einzig das NHEJ inhibiert (siehe Abbildung 5.13 und Abbildung 5.14). Die Arbeitsgruppe um Shin *et al.* konnte zeigen, dass HNSCC-Zelllinien häufig eine Verschiebung der DNA-Reparatur zum Alt-EJ aufweisen, die mit einer Verminderung des NHEJ-Reparaturwegs einhergeht [55].

Für die SAS-Zellen sind die Ergebnisse zu den DNA-Reparaturwegen im Einklang, da der gesamte Effekt von Sorafenib auf der Inhibition des klassischen NHEJ beruht und die HR bzw. das Alt-EJ durch Sorafenib nicht beeinflusst werden.

Unklar bleibt nach wie vor, wie genau das NHEJ und damit die DNA-DSB-Reparatur durch Sorafenib inhibiert wird. So besteht die Möglichkeit, dass Sorafenib direkt Kinasen der DSB-Reparatur inhibiert, wie z.B. DNA-PKcs, oder indirekt die Reparaturproteine beeinflusst über die Inhibition von *upstream*-Kinasen. Für eine indirekte Inhibition spricht die Beobachtung, dass Sorafenib eher zu einer verminderten Phosphorylierung der DNA-PKcs an der Position T2609 führt, aber nicht zu einer verminderten Phosphorylierung der Position S2056. Im Gegensatz zur Position S2056 kann die Position T2609 nicht nur von der DNA-PKcs selbst, sondern auch von anderen Kinasen wie ATM oder ATR phosphoryliert werden [145, 147, 159]. Würde Sorafenib inhibierend auf DNA-PKcs selbst wirken, wäre eine Reduktion der Phosphorylierung an beiden Positionen zu beobachten. Ob DNA-PKcs von ATM oder ATR aktiviert wird, hängt hierbei stark von der Art der DNA-Schädigung ab. Während die Proteinkinase ATM bei strahlungsinduzierten DSB aktiviert wird, wird eine Aktivierung von ATR mit der Reparatur von einzelsträngiger DNA, z.B. Basenexzisionsreparatur, aber auch mit dem Replikation-Prozess – bei dem aus unreparierten Einzelstrangbrüchen DSB generiert werden können – in Verbindung gebracht [160, 161]. Aus diesem Grund wird der ATM-Kinase eine größere Rolle bei der DSB-Reparatur zugeschrieben. Eigene Arbeiten konnten allerdings zeigen, dass Sorafenib die Phosphorylierung der Proteinkinase ATM in HNSCC-Zelllinien nicht inhibieren kann (Daten nicht gezeigt).

Ein indirekter Einfluss auf die DSB-Reparatur konnte auch nach EGFR-Inhibition in einem Kooperationsprojekt unserer Arbeitsgruppe zusammen mit dem Labor für Massenspektrometrie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Leitung Prof. Dr. H. Schlüter) beobachtet werden [74]. Aufbauend auf eigenen Vorarbeiten (Gleißner *et al.* in Präparation; eigene Daten nicht gezeigt) wurden bei diesem Projekt mit Hilfe eines quantitativen proteomanalytischen Ansatzes nukleäre Phosphoproteine analysiert [74]. Dabei zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung des Reparaturproteins PARP1 nach EGFR-Inhibition, was mit einer beeinträchtigten DNA-DSB-Reparatur assoziiert ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass der EGFR die DNA-Reparatur über den

MAPK-Signalweg reguliert. Diese Arbeiten wurden auch in SAS-Zellen durchgeführt. Für diese Zellen führt eine EGFR-Inhibition jedoch nicht zu einer Strahlensensitivierung [132]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte auch nach Inhibition des MAPK-Signalweges in SAS-Zellen keine Strahlensensitivierung erzielt werden, obwohl Sorafenib in SAS-Zellen zu einer Blockade des MAPK-Signalweges und zu einer Strahlensensitivierung führte (siehe Abbildung 5.17 D).

Letztendlich stehen die Beobachtungen, dass die Sorafenib-induzierte Strahlensensitivierung auf eine verminderte DNA-Reparatur zurückzuführen ist, mit den Daten anderer Arbeitsgruppen überein. So beschreiben Kim *et al.*, dass Sorafenib in Kolorektalkarzinomen zu einer verzögerten DNA-Reparatur führte, die sich wiederum in einer Strahlensensitivierung *in vitro* als auch *in vivo* äußerte [162]. In einer HCC-Zelllinie konnten Dai *et al.* ebenfalls eine Strahlensensitivierung nach Sorafenib-Behandlung beobachten, die auf eine verminderte DNA-DSB-Reparatur zurückzuführen war [163]. Zudem konnten Yadav *et al.* zeigen, dass Sorafenib in HNSCC-Zelllinien die DNA-Reparaturproteine ERCC-1 und XRCC-1 herunterreguliert und eine deutliche strahlensensitivierende Wirkung in Xenograft-Modellen verursacht [131].

Im Verlauf dieser Arbeit kamen deutliche Probleme bezüglich der Untersuchung der DNA-Reparatur nach Sorafenib-Behandlung zum Vorschein. Hierbei spielte die Wahl der Methode zur Analyse der DNA-Reparatur eine entscheidende Rolle. Die stringenteste Methode ist hierbei die Analyse der Chromosomen-Aberration. Mit dieser Methode können numerische und strukturelle Veränderung der Chromosomen ausgewertet werden, die aufgrund einer Fehlreparatur von DSB entstehen. Im Zuge der Analyse trat deutlich hervor, dass aufgrund der Proliferationsinhibition (siehe Abbildung 5.1) und des S/G2-Phasearrestes (siehe Abbildung 5.6) nach Sorafenib, auch in Kombination mit Bestrahlung, nicht genügend Metaphase-Chromosomen gesammelt werden konnten. Um diese anti-proliferative Wirkung von Sorafenib zu umgehen, wurde die *Premature Chromosome Condensation* (PCC)-Methode angewendet, mit der eine Kondensation der Chromosomen in jeder Zellzyklusphase möglich ist. Es konnten mit der PCC-Methode die Chromosomen der Sorafenib-behandelten und bestrahlten und damit nicht-proliferierende *Responder*-Zelllinien zwar kondensiert werden (siehe Abbildung 5.8), dennoch war eine auswertbare und vor allem vergleichbare Analyse zwischen DMSO- und Sorafenib-behandelten Zellen nicht gewährleistet. Obwohl mit der Chromosomen-Aberration die Analyse einer Fehlreparatur direkt nachgewiesen werden kann, war diese Methode im Fall von Sorafenib ungeeignet. Ähnliche Probleme sind auch im Falle anderer Inhibitoren zu erwarten, wenn diese einen starken Einfluss auf die Proliferation der Zellen haben.

Auch die in der biologischen Strahlenforschung etablierte Analyse der residuellen Reparaturkomplexe fand in dieser Arbeit Anwendung. Es stellte sich heraus, dass die *Responder*-Zelllinien eine erhöhte Anzahl an residuellen doppel-positiven γ H2AX/53BP1-Reparatur-Foci 48 Stunden nach Bestrahlung zeigten (siehe Abbildung 5.9). Überraschenderweise wurden auch in den *Non-Responder*-Zelllinien HSC4 und UT-SCC 5 eine Erhöhung der residuellen Reparatur-Foci nach Sorafenib-Behandlung beobachtet. Obwohl die Phosphorylierung von H2AX als prädiktiver Marker für die strahleninduzierten

DSB gilt [42], wurde in dieser Arbeit durch die zusätzliche Detektion des Reparaturproteins 53BP1 die DSB-Reparatur unter stringenteren Bedingungen untersucht. Dennoch korrelierte ein Anstieg der residuellen doppel-positiven γ H2AX/53BP1-Reparatur-Foci nicht mit der zellulären Strahlensensitivierung nach Sorafenib. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung ist, dass Sorafenib zwar die DNA-Reparatur in den *Responder*-Zelllinien inhibiert; gleichzeitig jedoch auch die Auflösung der Reparaturkomplexe verzögert, sodass auch die *Non-Responder*-Zelllinien scheinbar einen Reparaturdefekt zeigen. So beschrieben Kim *et al.*, dass eine kombinierte Behandlung aus Röntgenstrahlung und strahlensensitivierenden Agenzien die γ H2AX-Auflösung nach Bestrahlung beeinflussen können [162]. Zusätzlich zeigen Daten der Arbeitsgruppe ähnliche Diskrepanzen bei Verwendung von EGFR-Inhibitoren [132, 133], obwohl eine EGFR-Inhibition die DNA-Reparatur nachweislich über die Inhibition der PARP-abhängigen Reparatur beeinflusst [74].

Letztendlich zeigen die Analysen mittels Konstant- und Puls-Feld-Gelelektrophorese, dass Sorafenib zu einer echten Inhibition der DSB-Reparatur und so zu einer Strahlensensitivierung führt. Um den Einfluss von Sorafenib auf die DNA-Reparaturproteine genauer zu untersuchen, werden zur Zeit ebenfalls massenspektrometrische Analysen ähnlich den bereits erwähnten quantitativen Experimenten durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

6.4 Wirkung von Sorafenib auf das *Signaling* von Kopf-Hals-Tumorzelllinien

Der Multikinaseinhibitor Sorafenib führt zu multiplen Effekten in verschiedenen Tumorentitäten. Diese unterschiedlichen Effekte sind mit der Inhibition einer Reihe von potentiellen Kinasen assoziiert. Zudem können, je nach Abhängigkeit der molekularen Pathologie und der Tumorentität, unterschiedliche Wirkungen von Sorafenib beobachtet werden, wie die Inhibition der Proliferation und der Angiogenese oder die Induktion der Apoptose [112, 113, 149, 154]. Verschiedene Effekte von Sorafenib konnten auch in dieser Arbeit beobachtet werden, wie die anti-proliferative und zellinaktivierende Wirkung. Die heterogene Wirkung von Sorafenib spiegelt sich darin wider, dass nur in ca. einem Drittel der HNSCC-Zelllinien die strahlensensitivierende Wirkung von Sorafenib beobachtet werden kann. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Sorafenib in unterschiedliche Zelllinien – und im Weiteren auch in unterschiedlichen Tumoren – zu unterschiedlichen Effekten führen kann. Daher sollten mögliche *Targets* von Sorafenib in den verwendeten Zelllinien systematisch untersucht werden. Dafür wurden zunächst bereits bekannte Zielkinasen von Sorafenib untersucht. Dabei zeigte sich deutlich, dass viele bekannte *Targets* entweder in den HNSCC-Zelllinien nicht exprimiert wurden (wie PDGFR- β , VEGFR-2, Flt-3) oder aber Sorafenib zu keiner Inhibition der Phosphorylierung führte (wie Src, STAT3). Obwohl Sorafenib ein effektiver Raf-1 Inhibitor ist und damit den MAPK-Signalweg inhibieren kann, wurde der Signalweg in den meisten HNSCC-Zelllinien nicht inhibiert (siehe Abbildung 5.16 A und [135]). Eine Ausnahme stellen die SAS-Zellen dar, die eine deutliche Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung mit Sorafenib auch mit Bestrahlung zeigten (siehe Abbildung 5.16 A).

Wie bereits beschrieben, führte eine gezielte Inhibition des MAPK-Signalwegs durch einen spezifischen MEK-Inhibitor zu keiner Strahlensensitivierung (siehe Abbildung 5.17 D). Jedoch deutet sich an, dass die Inhibition des MAPK-Signalwegs zumindest in Teilen die Zellinaktivierung nach Sorafenib in Abwesenheit von Röntgenbestrahlung erklären könnte (siehe Abbildung 5.17 C). Obwohl Sorafenib als Raf-1-Inhibitor eingesetzt wird, zeigten bereits Wilhelm *et al.*, dass Sorafenib nicht den aktivierten MAPK-Signalweg in KRas-mutierten NSCLC-Zelllinien inhibieren kann und trotzdem eine deutliche anti-tumorigene Wirkung im Xenograft-Modell hervorruft [112]. Die bisherigen Analysen hinsichtlich der Signaltransduktion der HNSCC-Zelllinien unterstützen diese Daten und verdeutlichen die Komplexität des Einflusses von Sorafenib auf die HNSCC-Zelllinien. Aufgrund dieser hohen Komplexität wurden zwei explorative Ansätze gewählt (*PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array*; *Tyrosine Kinase PamChip®Array*) um einen Überblick über mögliche Zielkinasen von Sorafenib in HNSCC-Zellen zu erlangen.

Mit Hilfe dieser explorativen Ansätze konnte im Rahmen dieser Arbeit zwei potentielle Targets von Sorafenib identifiziert werden, die Rezeptortyrosinkinasen *c-Met* und *ephrin type-A receptor 1* (*EphA1*). Die Inhibition der Phosphorylierung des *c-Met*-Rezeptors im *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array* durch Sorafenib konnte mit Western Blot Experimenten bestätigt und in anderen Zelllinien wie z.B. SAS validiert werden. Die hier untersuchte Phosphorylierung an Position T1234/T1235 entspricht der Autophosphorylierungsstelle von *c-Met* [164]. Jedoch konnte mit dem *Tyrosine Kinase PamChip®Array* keine signifikante Inhibition der *c-Met*-Kinaseaktivität nachgewiesen werden, dies belegt auch die Limitationen solcher Screening-Ansätze (siehe Abbildung 5.20 B und Tabelle 5.1). Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Inhibition des *c-Met*-Rezeptors nicht die Ursache für den generellen Mechanismus der Strahlensensitivierung durch Sorafenib darstellen kann, da viele *Responder*-Zelllinien, wie z.B. UT-SCC 43, UT-SCC 29 und UT-SCC 60B, fast keine Basalaktivität von *c-Met* aufweisen (siehe Abbildung 5.19 A). Diese Vermutung wird durch Baschnagel *et al.* bestärkt, die nach *c-Met*-Rezeptorinhibition durch Crizotinib keine Strahlensensitivierung in HNSCC-Zelllinien beobachten konnten [165]. Vielmehr ist denkbar, dass der anti-proliferative oder zellinaktivierende Effekt von Sorafenib durch die *c-Met*-Rezeptorinhibition ausgelöst wird, gerade weil auch der *c-Met*-Rezeptor eine Vielzahl an Prozessen reguliert, wie z.B. Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung [166, 167]. Zudem ist der *c-Met*-Rezeptor in Tumoren häufig konstitutiv aktiviert [168]. So wurde für HNSCC in verschiedenen Studien eine Überexpression des *c-Met*-Rezeptors oder dessen Liganden HGF beschrieben [169, 170]. Zudem berichteten Ren *et al.*, dass ein erhöhter Serumlevel von HGF mit einem schlechteren Überleben bei ösophagealen Plattenepithelkarzinom korreliert [171]. Dies unterstreicht die generelle Bedeutung des *c-Met*-Rezeptors als potentielles *Target* von Sorafenib in den HNSCC-Zelllinien unabhängig von

Röntgenbestrahlung, sodass die Rolle von c-Met in HNSCC eingehend in einer separaten Promotion weiter untersucht wird.

Im Rahmen der PamGene-Experimente wurden weitere potentielle *Targets* von Sorafenib identifiziert. Trotz einiger Diskrepanzen zwischen den PamGene-Ergebnissen und den Western Blot-Daten und nur relativ schwacher Signale konnte eine leichte Reduktion der Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase EphA1 an der Position Y605 nach Sorafenib-Behandlung in einigen Zelllinien beobachtet werden. Diese Reduktion trat jedoch sowohl in *Responder*- (UT-SCC 29 und UT-SCC 60B) als auch in *Non-Responder*-Linien (HSC4 und UT-SCC 5) auf, weshalb kein Zusammenhang mit der Strahlensensitivierung vermutet wird. Ob die Inhibition der Phosphorylierung des EphA1-Rezeptors durch Sorafenib einen möglichen Einfluss auf die Proliferation oder Zellinaktivierung in den HNSCC-Zelllinien hat, müssen zukünftige Experimente zeigen. Der EphA1-Rezeptor gehört der Ephrin-Subrezeptorfamilie an, die noch weitere 15 Familienmitglieder besitzt. Die Eph-Rezeptoren und ihre Ephrin-Liganden regulieren zahlreiche biologische Prozesse, wie z.B. Gefäßbildung, Migration, und Angiogenese [172, 173]. Zudem spielen Eph-Rezeptoren in zahlreichen Tumorentitäten eine wichtige Rolle, wobei die Bedeutung als möglicher Tumorsuppressor bzw. Tumorkogen in den jeweiligen Tumorentitäten variiert [172, 174-176]. Giaginis *et al.* beschrieben, dass eine erhöhte EphA1 Expression mit einer gesteigerten Proliferation von NSCLC assoziiert ist [177]. Zudem berichteten Wang *et al.*, dass bei dem ösophagealen Plattenepithelkarzinom eine erhöhte Expression des EphA1-Rezeptors mit Lymphknoten-Metastasen und einer fortgeschrittenen Erkrankung einhergeht und damit eher eine onkogene Wirkung besitzt [172].

Neben dem EphA1 wurden in den PamGene®-Experimenten auch andere Mitglieder dieser Familie unter anderem in der *Non-Responder*-Zelllinie Cal33 durch Sorafenib schwach inhibiert (siehe Tabelle 5.1 und Abbildung 5.23). Zudem wurde die Inhibition einiger Eph-Rezeptoren durch Sorafenib auch in der *Responder*-Zelllinie UT-SCC 42B mit Hilfe des *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Arrays* beobachtet (siehe Abbildung 5.18 A). Aufgrund der vermehrten Hinweise, dass Eph-Rezeptoren durch Sorafenib inhibiert werden, scheint Sorafenib in HNSCC-Zelllinien einen Einfluss auf die Eph-Rezeptoren zu haben. Das Kinomprofiling mittels PamStation® gibt einen Hinweis auf die betroffene Kinasefamilie, nicht auf eine spezifische Kinase, daher sollte in Zukunft der Einfluss von Sorafenib auf die gesamte Rezeptorfamilie näher untersucht werden.

Mit dem Fokus auf Familienzugehörigkeiten treten innerhalb der Kinomprofilingstudien weitere Kinase-Subfamilien nach Sorafenib-Behandlung in den Vordergrund, wie den Subfamilien der ErbB-, die VEGFR- und die Src-Kinasen. Ein Vertreter der ErbB-Subfamilie ist der EGFR, welcher auch in dem *PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array* durch Sorafenib inhibiert wurde. Nichtsdestotrotz konnte diese Inhibition mittels Western Blot nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Tyrosinkinasen, VEGFR-2 und Src, wurden in dieser Arbeit entweder nicht exprimiert oder die Phosphorylierung durch Sorafenib nicht beeinflusst. Diese beobachtete Diskrepanz zwischen Proteinphosphorylierung und Proteinaktivität ist darauf zurückzuführen, dass die

PamGene®Technologie die Aktivität der Proteinkinasen direkt misst, während mit der Western Blot-Methode Phosphorylierungsstellen untersucht werden, die Rückschlüsse auf eine mögliche Aktivität des Proteins liefern können. Dennoch liefert die *PamChip*®Analyse Hinweise für eine zum Teil signifikante Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität von den zugehörigen Familienmitgliedern. Besonders stark vertreten ist die Src-Familie mit Lyn, Lck, Fgr, Blk, Yes1, Srm und Frk (siehe Tabelle 5.1). In den SAS-Zellen wurden fünf dieser Src-Mitglieder zum Teil deutlich und in den anderen fünf HNSCC-Zelllinien maximal drei Src-Familienmitglieder nach Sorafenib als inhibiert identifiziert. Da mittels Western Blot bisher nur die Expression und Aktivität der Src-Kinase selbst getestet wurde, muss in zukünftigen Experimenten der Einfluss von Sorafenib auf die weiteren Familienmitglieder untersucht werden.

Ungeachtet der Tatsache, dass die Sorafenib-vermittelte Kinaseinhibition keine Zuordnung der Zelllinien in die Gruppen der *Responder* oder *Non-Responder* zulässt, liefert diese Arbeit neue und wichtige Hinweise zu molekularer Wirkung von Sorafenib.

6.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Sorafenib eine starke anti-proliferative und zellinaktivierende Wirkung auf HNSCC-Zelllinien hat. Zudem konnte für ein Drittel eines HNSCC-Kollektivs (bestehend aus 20 Zelllinien) gezeigt werden, dass Sorafenib zu einer Strahlensensitivierung führt, insbesondere auch von Zelllinien mit einer ausgeprägten Strahlenresistenz. Die Strahlensensitivierung konnte auf eine beeinträchtigte DNA-DSB-Reparatur zurückgeführt werden. Diese wird wahrscheinlich durch eine Inhibition des NHEJ hervorgerufen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von Sorafenib auf die Signaltransduktion in den HNSCC-Zelllinien. Hierbei zeigte sich eine starke Heterogenität nach Sorafenib-Behandlung sowohl in den *Responder*- als auch in den *Non-Responder*-Linien. Letztendlich konnte in dieser Arbeit zwar keine Kinase identifiziert werden, die die Strahlensensitivierung erklären kann, allerdings wurden mit c-Met und EphA1 zwei neue potentielle *Targets* von Sorafenib identifiziert.

6.6 Ausblick

Insgesamt haben die Arbeiten gezeigt, dass I) Sorafenib und Röntgenstrahlung eventuell eine neue Therapieoption für HNSCC ist und II) die Identifizierung von Biomarkern für die Vorhersage eines Therapieerfolgs unerlässlich ist.

Derzeitige klinische Studien behandelten fortgeschrittene und metastasierende HNSCC-Patienten mit Sorafenib als Monotherapie und kommen einstimmig überein, dass die alleinige Sorafenib-Behandlung nur eine moderate anti-Tumoraktivität aufweist, die mit anderen molekularen *Targeting*-Vertretern vergleichbar ist [121, 122]. Dennoch verdeutlichen diese Phase II Studien, dass Sorafenib allgemein gut

verträglich ist und nur wenige Nebenwirkungen mit einem Schweregrad von 3 oder höher, wie z.B. Erschöpfung, Lymphopenie, Leukopenie und Hand-Fuß-Syndrom, auslöst. Basierend auf diesen klinischen Studien, aktuellen präklinischen *in vivo* Studien und den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, dass in zukünftigen klinischen Studien Sorafenib in Kombination mit Röntgenstrahlung und eventuell mit Chemotherapie bei HNSCC-Patienten getestet werden sollte [131, 135, 136]. Um dies präklinisch zu testen, werden in bereits begonnenen Folgeexperimenten Xenograft-Modelle mit *Responder*- und *Non-Responder*-Zelllinien hinsichtlich des Ansprechens von Sorafenib in Kombination mit Röntgenstrahlung bzw. Cisplatin-basierte Chemotherapie untersucht.

Des Weiteren verdeutlicht diese Arbeit, dass die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern für die Vorhersage eines Therapieerfolgs unerlässlich für eine erfolgreiche individualisierte Therapie ist. Durch solche Biomarker soll verhindert werden, dass Patienten, die nicht von Sorafenib profitieren würden, einer unnötigen Therapiebelastung ausgesetzt werden. Hierbei sollte der Fokus zum einen auf der Identifizierung der DNA-DSB-Reparaturmechanismen liegen, zum anderen auf den durch Sorafenib inhibierten *upstream*-Kinasen und den damit verantwortlichen Signalwegen. Für die Analyse der DSB-Reparaturmechanismen sollen quantitative proteomanalytische Ansätze zum Einsatz kommen, die die inhibitorische Wirkung von Sorafenib auf nukleäre Phosphoproteine entschlüsseln und einen möglichen Zusammenhang zwischen *upstream*-Kinasen und deren Signalwegen aufdeckt. Des Weiteren werden aktuell in der Arbeitsgruppe mit Hilfe der PamGene®Technologie Kinomprofile von Patiententumoren erstellt und diese mit den entsprechenden Normalgeweben verglichen [Bußmann *et al.*, Manuskript in Präparation]. Diese Ansätze sollen genutzt werden, um auch das Ansprechen von Tumoren auf Sorafenib zu untersuchen und somit prognostische Biomarker zu identifizieren, die eine Vorhersage über den Erfolg einer Sorafenib-Therapie bei HNSCC-Patienten erlauben.

7 Literaturverzeichnis

1. Barnes, B., et al., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016.
2. Bundesamt, S., *Gesundheit Todesursachen in Deutschland 2015*. 2017. **Fachserie 12 Reihe 4**.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Ferlay, J., et al., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. **Available from: <http://globocan.iarc.fr>** (accessed on 15/02/2017).
5. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015, Robert Koch-Institut.
6. Chaturvedi, A.K., et al., *Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers*. J Clin Oncol, 2013. **31**(36): p. 4550-9.
7. Chaturvedi, A.K., et al., *Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States*. J Clin Oncol, 2008. **26**(4): p. 612-9.
8. Chin, D., et al., *Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis*. Br J Plast Surg, 2004. **57**(7): p. 595-602.
9. Kalyankrishna, S. and J.R. Grandis, *Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(17): p. 2666-72.
10. Marmor, M.D., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 903-13.
11. Sok, J.C., et al., *Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(17): p. 5064-73.
12. Rubin Grandis, J., Q. Zeng, and D.J. Tweardy, *Retinoic acid normalizes the increased gene transcription rate of TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer cell lines*. Nat Med, 1996. **2**(2): p. 237-40.
13. Seiwert, T.Y., et al., *The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3021-31.
14. Masuda, M., et al., *Signal transducers and activators of transcription 3 up-regulates vascular endothelial growth factor production and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2007. **43**(8): p. 785-90.
15. Ma, P.C., et al., *c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition*. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(4): p. 309-25.
16. P, O.c., P. Rhys-Evans, and S.A. Eccles, *Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis*. Cancer, 2001. **92**(3): p. 556-68.
17. Qiu, W., et al., *PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1441-6.
18. McDonald, J.S., et al., *Immunohistochemical detection of the H-ras, K-ras, and N-ras oncogenes in squamous cell carcinoma of the head and neck*. J Oral Pathol Med, 1994. **23**(8): p. 342-6.
19. Murugan, A.K., et al., *Oncogenic mutations of the PIK3CA gene in head and neck squamous cell carcinomas*. Int J Oncol, 2008. **32**(1): p. 101-11.
20. Lee, J.I., et al., *Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001. **127**(12): p. 1441-5.
21. Pedrero, J.M., et al., *Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2005. **114**(2): p. 242-8.
22. Okami, K., et al., *Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors*. Cancer Res, 1998. **58**(3): p. 509-11.
23. Leeman, R.J., V.W. Lui, and J.R. Grandis, *STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(3): p. 231-41.
24. Caamano, J., et al., *p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines*. Am J Pathol, 1993. **142**(4): p. 1131-9.

25. Symonds, H., et al., *p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo*. Cell, 1994. **78**(4): p. 703-11.
26. Stransky, N., et al., *The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1157-60.
27. Yim, E.K. and J.S. Park, *The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis*. Cancer Res Treat, 2005. **37**(6): p. 319-24.
28. Cognetti, D.M., R.S. Weber, and S.Y. Lai, *Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm*. Cancer, 2008. **113**(7 Suppl): p. 1911-32.
29. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival*. Lancet Oncol, 2010. **11**(1): p. 21-8.
30. Bernier, J. and J.S. Cooper, *Chemoradiation after surgery for high-risk head and neck cancer patients: how strong is the evidence?* Oncologist, 2005. **10**(3): p. 215-24.
31. Forastiere, A.A., et al., *Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(7): p. 845-52.
32. Kang, M.H., et al., *Concurrent Chemoradiation with Low-Dose Weekly Cisplatin in Locally Advanced Stage IV Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Cancer Res Treat, 2015. **47**(3): p. 441-7.
33. Lorincz, B.B., N. Jowett, and R. Knecht, *Decision management in transoral robotic surgery: Indications, individual patient selection, and role in the multidisciplinary treatment for head and neck cancer from a European perspective*. Head Neck, 2016. **38 Suppl 1**: p. E2190-6.
34. Eisbruch, A., et al., *Dysphagia and aspiration after chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: which anatomic structures are affected and can they be spared by IMRT?* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **60**(5): p. 1425-39.
35. Rivelli, T.G., et al., *Cisplatin based chemoradiation late toxicities in head and neck squamous cell carcinoma patients*. Discov Med, 2015. **20**(108): p. 57-66.
36. Dikomey, E., et al., *Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen*. Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen. (Hrsg Zeller, zur Hausen): Ecomed Medizin: Landsberg/Lech., 2012: p. 20.
37. Uziel, T., et al., *Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage*. Embo j, 2003. **22**(20): p. 5612-21.
38. Lavin, M.F. and S. Kozlov, *ATM activation and DNA damage response*. Cell Cycle, 2007. **6**(8): p. 931-42.
39. Burma, S., et al., *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42462-7.
40. Shibata, A. and P.A. Jeggo, *DNA double-strand break repair in a cellular context*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2014. **26**(5): p. 243-9.
41. Mattioli, F., et al., *RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1182-95.
42. Taneja, N., et al., *Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 2273-80.
43. Rothkamm, K., et al., *Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(16): p. 5706-5715.
44. Difilippantonio, M.J., et al., *DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation*. Nature, 2000. **404**(6777): p. 510-4.
45. Takata, M., et al., *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. Embo j, 1998. **17**(18): p. 5497-508.
46. Cary, R.B., et al., *DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4267-72.
47. Yaneva, M., T. Kowalewski, and M.R. Lieber, *Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies*. Embo j, 1997. **16**(16): p. 5098-112.

48. Ding, Q., et al., *Autophosphorylation of the Catalytic Subunit of the DNA-Dependent Protein Kinase Is Required for Efficient End Processing during DNA Double-Strand Break Repair*. *Molecular and Cellular Biology*, 2003. **23**(16): p. 5836-5848.
49. Reddy, Y.V., et al., *Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(38): p. 39408-13.
50. Ahnesorg, P., P. Smith, and S.P. Jackson, *XLFI interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 301-13.
51. Mari, P.O., et al., *Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(49): p. 18597-602.
52. Nick McElhinny, S.A., et al., *Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(9): p. 2996-3003.
53. Ma, Y., et al., *Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination*. *Cell*, 2002. **108**(6): p. 781-94.
54. Iliakis, G., J. Dahm-Daphi, and E. Dikomey, *DNA repair and cell cycle regulation after ionizing irradiation*, in *The Impact of Tumor Biology on Cancer Treatment and Multidisciplinary Strategies*. 2009, Springer. p. 251-271.
55. Shin, K.H., et al., *Abnormal DNA end-joining activity in human head and neck cancer*. *Int J Mol Med*, 2006. **17**(5): p. 917-24.
56. Baldeyron, C., et al., *A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining*. *Oncogene*, 2002. **21**(9): p. 1401-10.
57. Bentley, J., et al., *DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(17): p. 5249-59.
58. Nussenzweig, A. and M.C. Nussenzweig, *A backup DNA repair pathway moves to the forefront*. *Cell*, 2007. **131**(2): p. 223-5.
59. Grabarz, A., et al., *Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining*. *Am J Cancer Res*, 2012. **2**(3): p. 249-68.
60. Della-Maria, J., et al., *Human Mre11/human Rad50/Nbs1 and DNA ligase IIIalpha/XRCC1 protein complexes act together in an alternative nonhomologous end joining pathway*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(39): p. 33845-53.
61. Audebert, M., B. Salles, and P. Calsou, *Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-strand Breaks Rejoining*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(53): p. 55117-55126.
62. Hartlerode, A.J. and R. Scully, *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*. *Biochem J*, 2009. **423**(2): p. 157-68.
63. Helleday, T., et al., *DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment*. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(7): p. 923-35.
64. Meyn, R.E., et al., *Receptor signaling as a regulatory mechanism of DNA repair*. *Radiother Oncol*, 2009. **92**(3): p. 316-22.
65. Huang, S.M. and P.M. Harari, *Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(6): p. 2166-74.
66. Bandyopadhyay, D., et al., *Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(3): p. 1568-73.
67. Shintani, S., et al., *Enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(6): p. 1030-7.
68. Yacoub, A., et al., *MAPK dependence of DNA damage repair: ionizing radiation and the induction of expression of the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 human prostate carcinoma cells in a MEK1/2 dependent fashion*. *Int J Radiat Biol*, 2001. **77**(10): p. 1067-78.
69. Ko, J.C., et al., *Role of repair protein Rad51 in regulating the response to gefitinib in human non-small cell lung cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(11): p. 3632-41.

70. Toulany, M., et al., *Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 1772-81.
71. Golding, S.E., et al., *Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1046-53.
72. Golding, S.E., et al., *Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(8): p. 730-8.
73. Kriegs, M., et al., *The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(8): p. 889-97.
74. Myllynen, L., et al., *Quantitative proteomics unveiled: Regulation of DNA double strand break repair by EGFR involves PARP1*. Radiother Oncol, 2015. **116**(3): p. 423-30.
75. Ma, W.W. and A.A. Adjei, *Novel agents on the horizon for cancer therapy*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(2): p. 111-37.
76. Brahmer, J.R., H. Hammers, and E.J. Lipson, *Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity*. Future Oncol, 2015. **11**(9): p. 1307-26.
77. McCabe, N., et al., *Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8109-15.
78. Murata, S., et al., *Predictors and Modulators of Synthetic Lethality: An Update on PARP Inhibitors and Personalized Medicine*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 2346585.
79. Kortmann, U., et al., *Tumor growth inhibition by olaparib in BRCA2 germline-mutated patient-derived ovarian cancer tissue xenografts*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(4): p. 783-91.
80. Rottenberg, S., et al., *High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 17079-84.
81. Fong, P.C., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers*. N Engl J Med, 2009. **361**(2): p. 123-34.
82. Fong, P.C., et al., *Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval*. J Clin Oncol, 2010. **28**(15): p. 2512-9.
83. Koch, S. and L. Claesson-Welsh, *Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006502.
84. Shin, S.J., et al., *Circulating vascular endothelial growth factor receptor 2/pAkt-positive cells as a functional pharmacodynamic marker in metastatic colorectal cancers treated with antiangiogenic agent*. Invest New Drugs, 2013. **31**(1): p. 1-13.
85. Huang, S.M., J.M. Bock, and P.M. Harari, *Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Cancer Res, 1999. **59**(8): p. 1935-40.
86. Feng, F.Y., et al., *Effect of epidermal growth factor receptor inhibitor class in the treatment of head and neck cancer with concurrent radiochemotherapy in vivo*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(8): p. 2512-8.
87. Sirotinak, F.M., *Studies with ZD1839 in preclinical models*. Semin Oncol, 2003. **30**(1 Suppl 1): p. 12-20.
88. Hidalgo, M., *Erlotinib: preclinical investigations*. Oncology (Williston Park), 2003. **17**(11 Suppl 12): p. 11-6.
89. Rocha-Lima, C.M., et al., *EGFR targeting of solid tumors*. Cancer Control, 2007. **14**(3): p. 295-304.
90. Akita, R.W. and M.X. Sliwkowski, *Preclinical studies with Erlotinib (Tarceva)*. Semin Oncol, 2003. **30**(3 Suppl 7): p. 15-24.
91. Prewett, M., et al., *The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1996. **19**(6): p. 419-27.
92. Searle, E.J., T.M. Illidge, and I.J. Stratford, *Emerging opportunities for the combination of molecularly targeted drugs with radiotherapy*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2014. **26**(5): p. 266-76.

93. Ang, K.K., et al., *Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522*. J Clin Oncol, 2014. **32**(27): p. 2940-50.
94. Rao, K., et al., *A phase II study of intra-arterial cisplatin with concurrent radiation and erlotinib for locally advanced head and neck cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **72**(3): p. 545-52.
95. Heath, C.H., et al., *Phase I study of erlotinib plus radiation therapy in patients with advanced cutaneous squamous cell carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. **85**(5): p. 1275-81.
96. Welsh, J.W., et al., *Phase II trial of erlotinib plus concurrent whole-brain radiation therapy for patients with brain metastases from non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(7): p. 895-902.
97. Ma, S., et al., *Treatment of brain metastasis from non-small cell lung cancer with whole brain radiotherapy and Gefitinib in a Chinese population*. Lung Cancer, 2009. **65**(2): p. 198-203.
98. Joensuu, G., et al., *A phase I/II trial of gefitinib given concurrently with radiotherapy in patients with nonmetastatic prostate cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **78**(1): p. 42-9.
99. Ready, N., et al., *Chemoradiotherapy and gefitinib in stage III non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor and KRAS mutation analysis: cancer and leukemia group B (CALEB) 30106, a CALGB-stratified phase II trial*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(9): p. 1382-90.
100. Sperduto, P.W., et al., *A phase 3 trial of whole brain radiation therapy and stereotactic radiosurgery alone versus WBRT and SRS with temozolomide or erlotinib for non-small cell lung cancer and 1 to 3 brain metastases: Radiation Therapy Oncology Group 0320*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. **85**(5): p. 1312-8.
101. Morris, Z.S. and P.M. Harari, *Interaction of radiation therapy with molecular targeted agents*. J Clin Oncol, 2014. **32**(26): p. 2886-93.
102. Kotter, A., et al., *Inhibition of PARP1-dependent end-joining contributes to Olaparib-mediated radiosensitization in tumor cells*. Mol Oncol, 2014. **8**(8): p. 1616-25.
103. Brock, W.A., et al., *Radiosensitization of human and rodent cell lines by INO-1001, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase*. Cancer Lett, 2004. **205**(2): p. 155-60.
104. Nile, D.L., et al., *An evaluation in vitro of PARP-1 inhibitors, rucaparib and olaparib, as radiosensitisers for the treatment of neuroblastoma*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 621.
105. Verheij, M., C. Vens, and B. van Triest, *Novel therapeutics in combination with radiotherapy to improve cancer treatment: rationale, mechanisms of action and clinical perspective*. Drug Resist Updat, 2010. **13**(1-2): p. 29-43.
106. Rabinowits, G. and R.I. Haddad, *Overcoming resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer: a review of the literature*. Oral Oncol, 2012. **48**(11): p. 1085-9.
107. Erjala, K., et al., *Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(13): p. 4103-11.
108. Yonesaka, K., et al., *Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab*. Sci Transl Med, 2011. **3**(99): p. 99ra86.
109. Lo Muzio, L., et al., *Scatter factor receptor (c-Met) as possible prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma*. Anticancer Res, 2004. **24**(2c): p. 1063-9.
110. Liu, L., et al., *Synergistic effects of foretinib with HER-targeted agents in MET and HER1- or HER2-coactivated tumor cells*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(3): p. 518-30.
111. Wilhelm, S., et al., *Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(10): p. 835-44.
112. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7099-109.
113. Wilhelm, S.M., et al., *Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(10): p. 3129-40.
114. Dal Lago, L., V. D'Hondt, and A. Awada, *Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors*. Oncologist, 2008. **13**(8): p. 845-58.

115. Rahmani, M., et al., *Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35217-27.
116. Yu, C., et al., *The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006*. Oncogene, 2005. **24**(46): p. 6861-9.
117. Eisen, T., et al., *Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis*. Br J Cancer, 2006. **95**(5): p. 581-6.
118. Blumenschein, G.R., Jr., et al., *Phase II, multicenter, uncontrolled trial of single-agent sorafenib in patients with relapsed or refractory, advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4274-80.
119. Steinbild, S., et al., *A clinical phase II study with sorafenib in patients with progressive hormone-refractory prostate cancer: a study of the CESAR Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIV*. Br J Cancer, 2007. **97**(11): p. 1480-5.
120. Maki, R.G., et al., *Phase II study of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas*. J Clin Oncol, 2009. **27**(19): p. 3133-40.
121. Elser, C., et al., *Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(24): p. 3766-73.
122. Williamson, S.K., et al., *Phase II evaluation of sorafenib in advanced and metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: Southwest Oncology Group Study S0420*. J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3330-5.
123. Abou-Alfa, G.K., et al., *Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial*. Jama, 2010. **304**(19): p. 2154-60.
124. Bellmunt, J., et al., *Activity of a multitargeted chemo-switch regimen (sorafenib, gemcitabine, and metronomic capecitabine) in metastatic renal-cell carcinoma: a phase 2 study (SOGUG-02-06)*. Lancet Oncol, 2010. **11**(4): p. 350-7.
125. Heravi, M., et al., *Sorafenib in combination with ionizing radiation has a greater anti-tumour activity in a breast cancer model*. Anticancer Drugs, 2012. **23**(5): p. 525-33.
126. Kuo, Y.-C., et al., *Sorafenib sensitizes human colorectal carcinoma to radiation via suppression of NF- κ B expression in vitro and in vivo*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2012. **66**(1): p. 12-20.
127. Yu, W., et al., *Sorafenib potentiates irradiation effect in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo*. Cancer Lett, 2013. **329**(1): p. 109-17.
128. Plastaras, J.P., et al., *Cell cycle dependent and schedule-dependent antitumor effects of sorafenib combined with radiation*. Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9443-54.
129. Suen, A.W., et al., *Sorafenib and radiation: a promising combination in colorectal cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **78**(1): p. 213-20.
130. Den, R.B., et al., *A phase I study of the combination of sorafenib with temozolomide and radiation therapy for the treatment of primary and recurrent high-grade gliomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. **85**(2): p. 321-8.
131. Yadav, A., et al., *Sorafenib enhances the antitumor effects of chemoradiation treatment by downregulating ERCC-1 and XRCC-1 DNA repair proteins*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(7): p. 1241-51.
132. Kriegs, M., et al., *Radiosensitization of HNSCC cells by EGFR inhibition depends on the induction of cell cycle arrests*. Oncotarget, 2016. **7**(29): p. 45122-45133.
133. Kriegs, M., et al., *Radiosensitization of NSCLC cells by EGFR inhibition is the result of an enhanced p53-dependent G1 arrest*. Radiother Oncol, 2015. **115**(1): p. 120-7.
134. Kasten-Pisula, U., et al., *Cellular and tumor radiosensitivity is correlated to epidermal growth factor receptor protein expression level in tumors without EGFR amplification*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011. **80**(4): p. 1181-8.
135. Laban, S., et al., *Sorafenib sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to ionizing radiation*. Radiother Oncol, 2013. **109**(2): p. 286-92.
136. Mockelmann, N., et al., *Effect of sorafenib on cisplatin-based chemoradiation in head and neck cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(17): p. 23542-51.
137. Busch, C.J., et al., *HPV-positive HNSCC cell lines but not primary human fibroblasts are radiosensitized by the inhibition of Chk1*. Radiother Oncol, 2013. **108**(3): p. 495-9.

138. Borgmann, K., et al., *For X-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(2): p. 445-52.
139. Bender, M.A., H.G. Griggs, and J.S. Bedford, *Mechanisms of chromosomal aberration production. 3. Chemicals and ionizing radiation*. Mutat Res, 1974. **23**(2): p. 197-212.
140. Thompson, S.L. and D.A. Compton, *Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells*. J Cell Biol, 2008. **180**(4): p. 665-72.
141. Gotoh, E., *Agents and a method of chromosome preparation using protein phosphatase inhibitors induced premature chromosome condensation (PCC) technique*. 1998, Google Patents.
142. Dahm-Daphi, J. and E. Dikomey, *Separation of DNA fragments induced by ionizing irradiation using a graded-field gel electrophoresis*. Int J Radiat Biol, 1995. **67**(2): p. 161-8.
143. El-Awady, R.A., E. Dikomey, and J. Dahm-Daphi, *Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks*. Br J Cancer, 2003. **89**(3): p. 593-601.
144. Barnard, S., S. Bouffler, and K. Rothkamm, *The shape of the radiation dose response for DNA double-strand break induction and repair*. Genome Integr, 2013. **4**(1): p. 1.
145. Chen, B.P., et al., *Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6582-7.
146. Vidal-Eychenie, S., et al., *DNA structure-specific priming of ATR activation by DNA-PKcs*. J Cell Biol, 2013. **202**(3): p. 421-9.
147. Yajima, H., K.J. Lee, and B.P. Chen, *ATR-dependent phosphorylation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in response to UV-induced replication stress*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(20): p. 7520-8.
148. Yang, F., et al., *Sorafenib induces growth arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the dephosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(4): p. 953-62.
149. Zhao, W., et al., *Sorafenib induces apoptosis in HL60 cells by inhibiting Src kinase-mediated STAT3 phosphorylation*. Anticancer Drugs, 2011. **22**(1): p. 79-88.
150. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-1934.
151. Liu, L., et al., *Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11851-8.
152. Riedel, M., et al., *Sorafenib inhibits cell growth but fails to enhance radio- and chemosensitivity of glioblastoma cell lines*. Oncotarget, 2016. **7**(38): p. 61988-61995.
153. Kim, Y.S., et al., *Sorafenib induces apoptotic cell death in human non-small cell lung cancer cells by down-regulating mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent survivin expression*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(3): p. 216-26.
154. Huang, C.Y., et al., *Sorafenib enhances radiation-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by inhibiting STAT3*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. **86**(3): p. 456-62.
155. Struve, N., et al., *EGFRvIII does not affect radiosensitivity with or without gefitinib treatment in glioblastoma cells*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 33867-77.
156. Dahm-Daphi, J. and E. Dikomey, *Rejoining of DNA double-strand breaks in X-irradiated CHO cells studied by constant- and graded-field gel electrophoresis*. Int J Radiat Biol, 1996. **69**(5): p. 615-21.
157. Kasten-Pisula, U., H. Tastan, and E. Dikomey, *Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity*. International Journal of Radiation Biology, 2009. **81**(6): p. 409-419.
158. Deans, A.J. and S.C. West, *DNA interstrand crosslink repair and cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(7): p. 467-80.
159. Wechsler, T., et al., *DNA-PKcs function regulated specifically by protein phosphatase 5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1247-52.
160. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 499-506.

161. Marechal, A. and L. Zou, *DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
162. Kim, Y.B., et al., *Mechanism of enhancement of radiation-induced cytotoxicity by sorafenib in colorectal cancer*. J Radiat Res, 2013. **54**(1): p. 52-60.
163. Dai, X.F., et al., *Radiosensitivity enhancement of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 by sorafenib through the MEK/ERK signal pathway*. Int J Radiat Biol, 2013. **89**(9): p. 724-31.
164. Longati, P., et al., *Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor)*. Oncogene, 1994. **9**(1): p. 49-57.
165. Baschnagel, A.M., et al., *Crizotinib Fails to Enhance the Effect of Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Xenografts*. Anticancer Res, 2015. **35**(11): p. 5973-82.
166. Kong-Beltran, M., J. Stamos, and D. Wickramasinghe, *The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation*. Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 75-84.
167. Lesko, E. and M. Majka, *The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 1271-80.
168. Xu, Y. and G.J. Fisher, *Role of met axis in head and neck cancer*. Cancers (Basel), 2013. **5**(4): p. 1601-18.
169. Knowles, L.M., et al., *HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(11): p. 3740-50.
170. Cortesina, G., et al., *Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases*. Int J Cancer, 2000. **89**(3): p. 286-92.
171. Ren, Y., et al., *Hepatocyte growth factor promotes cancer cell migration and angiogenic factors expression: a prognostic marker of human esophageal squamous cell carcinomas*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(17): p. 6190-7.
172. Wang, J., et al., *High expression of EphA1 in esophageal squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastasis and advanced disease*. Apmis, 2013. **121**(1): p. 30-7.
173. Zhang, J. and S. Hughes, *Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system*. J Pathol, 2006. **208**(4): p. 453-61.
174. Hafner, C., et al., *Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in nonmelanoma skin cancer*. Mod Pathol, 2006. **19**(10): p. 1369-77.
175. Wang, J., et al., *Expression of EphA1 in gastric carcinomas is associated with metastasis and survival*. Oncol Rep, 2010. **24**(6): p. 1577-84.
176. Dong, Y., et al., *Downregulation of EphA1 in colorectal carcinomas correlates with invasion and metastasis*. Mod Pathol, 2009. **22**(1): p. 151-60.
177. Giaginis, C., et al., *Ephrin (Eph) receptor A1, A4, A5 and A7 expression in human non-small cell lung carcinoma: associations with clinicopathological parameters, tumor proliferative capacity and patients' survival*. BMC Clin Pathol, 2014. **14**(1): p. 8.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Strahlungsinduzierte DNA-Doppelstrangbruch Reparaturwege.	7
Abbildung 1.2 Angriffspunkte des molekularen <i>Targetings</i> in der Tumorthherapie.	10
Abbildung 1.3 Wirkmechanismus von Sorafenib.	14
Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des <i>PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array</i>	36
Abbildung 5.1 Einfluss einer kontinuierlichen Sorafenib-Behandlung auf die Proliferation von HNSCC-Zelllinien.	44
Abbildung 5.2 Einfluss einer 24-stündigen Sorafenib-Behandlung auf die Proliferation von HNSCC-Zelllinien.	45
Abbildung 5.3 Zellinaktivierung von HNSCC-Zelllinien durch Sorafenib.	46
Abbildung 5.4 Einfluss von Sorafenib auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von HNSCC-Zelllinien.	47
Abbildung 5.5 Einfluss von Sorafenib auf die Apoptose-Induktion.	49
Abbildung 5.6 Einfluss von Sorafenib auf den Zellzyklus.	51
Abbildung 5.7 Einfluss von Sorafenib auf permanente Zellzyklusarreste.	52
Abbildung 5.8 Analyse der DNA-DSB-Reparatur mittels Chromosomenaberration.	54
Abbildung 5.9 Einfluss von Sorafenib auf die DNA-DSB-Reparatur: Residuelle Reparatur-Foci.	56
Abbildung 5.10 Einfluss von Sorafenib auf die DNA-DSB-Reparatur: Konstant-Feld-Gelelektrophorese.	58
Abbildung 5.11 Einfluss von Sorafenib auf die DNA-DSB-Reparatur: Puls-Feld-Gelelektrophorese.	61
Abbildung 5.12 Einfluss von Sorafenib auf die Homologe Rekombination.	62
Abbildung 5.13 Einfluss von Sorafenib auf das <i>alternative end-joining</i>	63
Abbildung 5.14 Einfluss von Sorafenib auf die Nicht-homologe Endverknüpfung.	64
Abbildung 5.15 Einfluss von Sorafenib auf die zentralen Reparaturproteine des NHEJ.	66
Abbildung 5.16 Analyse bekannter Zielkinasen von Sorafenib in HNSCC-Zelllinien.	68
Abbildung 5.17 Einfluss des MAPK-Signalwegs auf die Strahlenempfindlichkeit von SAS-Zellen. ...	69
Abbildung 5.18 Suche nach potentiellen Sorafenib- <i>Targets</i> mittels <i>PathScan® Receptor Tyrosine Kinase Signaling Antibody Array</i>	71
Abbildung 5.19 Einfluss von Sorafenib auf die c-Met-Rezeptoraktivität.	72
Abbildung 5.20 Analyse der Tyrosinkinaseaktivität nach Sorafenib-Behandlung auf dem <i>Tyrosine Kinase PamChip® Array</i>	74
Abbildung 5.21 Expression und Phosphorylierung von EphA1 in HNSCC-Zelllinien.	76
Abbildung 5.22 Darstellung der Tyrosinkinasen als phylogenetischer Baum.	78

Abbildung 5.23 Übersicht der Sorafenib-vermittelten Inhibition der *upstream*-Tyrosinkinasen vom Tyrosine Kinase PamChip®Array mit Hilfe von phylogenetischen Bäumen..... 79

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Charakterisierung der Plattenepithelkarzinom-Zelllinien	19
Tabelle 3.2 Eigenschaften der primären Antikörper	19
Tabelle 3.3 Eigenschaften der sekundären Antikörper.....	21
Tabelle 3.4 Verwendete Kits	21
Tabelle 3.5 Verwendete Reagenzien und Medien für die Zellkultur	22
Tabelle 3.6 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	22
Tabelle 3.7 Verwendete Puffer und Lösungen	23
Tabelle 3.8 Verwendete Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3.9 Verwendete Geräte und Hilfsmittel.....	26
Tabelle 3.10 Verwendete Software	27
Tabelle 4.1 Zusammensetzung des Master-Mixes für die Analyse des <i>Tyrosine Kinase PamChip®Array</i> an der PamStation®12.....	38
Tabelle 4.2 Versuchsprotokoll für die Analyse des <i>Tyrosine Kinase PamChip®Array</i> an der PamStation®12.	38
Tabelle 5.1 Übersicht der identifizierten <i>upstream</i> -Kinasen nach Sorafenib-Inhibition.....	75
Tabelle 5.2 Gegenüberstellung der Sorafenib-induzierten Kinaseinhibition, Proliferation und zelluläres Überleben nach Sorafenib-Behandlung.....	80

10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
53BP1	p53-bindendes Protein 1
Akt	Proteinkinase B
Alt-EJ	<i>alternative end-joining</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1, early onset</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Caspasen	<i>cysteiny-l-aspartate specific protease</i>
CFGE	<i>constant field gel electrophoresis</i>
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	<i>DNA damage response</i>
DEF	<i>dose enhancement factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PKcs	katalytische Untereinheit der Proteinkinase DNA-PK
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
E6	virales Protein E6 (HPV)
E7	virales Protein E7 (HPV)
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>

eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
engl.	englisch
ERK1	<i>extracellular signal-regulated kinases 1</i>
<i>et al.</i>	und andere
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
F _{DNA}	ausgewanderte fragmentierte DNA
FGFR1	<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FLICA®	<i>Fluorescent Labeled Inhibitors of Caspases</i>
Flt-3	<i>fms like tyrosine kinase 3</i>
Foci	Reparaturkomplex
F _{Plug}	ungeschädigte DNA
g	fache Erdbeschleunigung
G1-Phase	1. Lücke (Gab) des Zellzyklus
G2-Phase	2. Lücke (Gab) des Zellzyklus
Gy	Gray
h	Stunde
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HGFR	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	humanes Papillomvirus
HR	Homologe Rekombination
IC ₅₀ -Wert	mittlere inhibitorische Konzentration
IGFR1	<i>insulin-like growth factor receptor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mbp	Mega-Basenpaar
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia-1</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase (MAPK Kinase)</i>

mg.....	Milligramm
min.....	Minute
ml.....	Milliliter
mm.....	Millimeter
mM.....	Millimolar
MRE11.....	<i>meiotic recombination 11</i>
msec.....	<i>millisecond</i>
mTOR.....	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
NBS1.....	<i>Nijmegen breakage syndrom 1</i>
NHEJ.....	Nicht-homologe Endverknüpfung
nm.....	Nanometer
nM.....	Nanomolar
NSCLC.....	<i>non small cell lung cancer</i>
PARP.....	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS.....	<i>phosphate buffered saline</i>
PCC.....	<i>Premature Chromosome Condensation</i>
PFGE.....	<i>pulsed field gel electrophoresis</i>
PFGFR- β	<i>platelet-derived growth factor receptor-β</i>
PI.....	Propidiumiodid
PI3K.....	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIK3CA.....	<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform</i>
PK.....	Proteinkinase (Isoform A, B, C, C α , C γ)
PLC γ	Phospholipase C γ
PTEN.....	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
Rad50.....	<i>DNA repair protein 50</i>
Raf.....	Zelluläre Variante des <i>virus-induced rapidly accelerated fibrosarcoma proteins</i>
Ras.....	<i>Rat sarcoma</i> Protein
rel.FD.....	relativ ausgewanderte fragmentierte DNA-Menge
RPA.....	<i>replication protein A</i>
RT.....	Raumtemperatur
SDS.....	Sodiumdodecylsulfat
sec.....	<i>second</i>
sek.....	Sekunde
SF _{6Gy}	<i>survival fraction</i> bei 6 Gy
S-Phase.....	Synthesephase des Zellzyklus
SSA.....	<i>single-strand annealing</i>
ssDNA.....	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)

STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween® 20</i>
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organization</i>
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
γ H2AX	phosphoryliertes Histon 2AX (Serin 139)

11 Publikationen

Teile der Dissertation sind in zwei Veröffentlichungen enthalten.

Laban, S., Steinmeister, L., **Gleißner, L.**, Grob, T.J., Grénman, R., Peterson, C., Gal, A., Knecht, R., Dikomey, E., Kriegs, M., *Sorafenib sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to ionizing radiation*. *Radiother Oncol*, 2013. **109**(2): p. 286-92.

Mockelmann, N., Rieckmann, T., Busch, C-J., Becker, B., **Gleißner, L.**, Hoffer, K., Omniczynski, M., Steinmeister, L., Laban, S., Grénman, R., Peterson, C., Rothkamm, K., Dikomey, E., Knecht, R., Kriegs, M., et al., *Effect of sorafenib on cisplatin-based chemoradiation in head and neck cancer cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(17): p. 23542-51.

Zudem habe ich während der Promotion an einer weiteren Veröffentlichung Anteil gehabt.

Myllynen, L.*, Kwiatkowski, M.* , **Gleißner, L.***, Riepen, B., Hoffer, K., Wurlitzer, M., Peterson, C., Dikomey, E., Rothkamm, K., Schlüter, H.** , Kriegs, M.** , *Quantitative proteomics unveiled: Regulation of DNA double strand break repair by EGFR involves PARP1*. *Radiother Oncol*, 2015. **116**(3): p. 423-30.

* geteilte Erstautorenschaft; ** geteilte Letztautorenschaft

12 Danksagung

Mein erster, herzlichster Dank geht an PD Dr. Malte Kriegs, der diese Arbeit betreut hat. Danke für das große Vertrauen, die lebhaften Diskussionen und die großartige Unterstützung, die Du mir und meinem Projekt entgegengebracht hast. Sehr dankbar bin ich Dir für deine verständnisvolle und motivierende Art und das tolle Arbeitsgruppen-Klima, dass du ermöglicht hast.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Ekkehard Dikomey. Du hast mir die Möglichkeit gegeben dieses spannende Projekt bearbeiten zu dürfen. Für deine vielfältigen Diskussionen, ehrlichen Worte und positiven Sichtweise möchte ich mich herzlichst bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Wilhelm Schäfer für die Begutachtung meiner Dissertation und dafür, dass Sie mir die Experimente mit Ihrer Puls-Feld-Gelelektrophorese erst ermöglicht haben.

Bei Prof. Dr. Kai Rothkamm möchte ich mich für die Unterstützung und die Diskussionen besonders rund um das Thema Puls-Feld-Gelelektrophorese bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Lara Bußmann. Du bist unerschütterlich in die Tiefen der PamGene®Welt eingetaucht und hast mit deiner unermüdlichen Entschlossenheit die bioinformatischen Geister bezwungen und meine PamGene®Ergebnisse in dieser Weise erst ermöglicht.

Bei Konstantin Hoffer möchte ich mich ganz besonders für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken. Für deinen Einsatz in allen Bereichen, deine zahlreichen Gespräche als Bench-Nachbar, und deine Begeisterung für Film und Bücher bleiben für mich unvergessen.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Dr. Nina Struve. Du hast in allen Lebenslagen immer die richtigen Worte gefunden und hast mich in stressigen Tagen aufgebaut. Danke für 4 tolle Jahre als meine Sitznachbarin und als Kaffee-Buddy.

Jennifer Volquardsen möchte ich herzlichst für ihre Freundschaft danken. Du hast mit deiner erfrischenden Art nicht nur meinen Laboralltag erhellt. Vielen Dank auch für die nützlichen Tipps zum satzwertigen Infinitiv und für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Bei Jana Jensen möchte ich mich für ihre immer zu positive Art bedanken, für die entspannten und lustigen Stunden im Labor aber auch in der Freizeit. Auch Du warst mir eine große Hilfe beim Korrekturlesen meiner Dissertation.

Ich möchte mich bei allen lieben Menschen im Labor bedanken, die ein so einzigartiges Arbeitsklima geschaffen haben, dass der Laboralltag ein unvergessliches Erlebnis geworden ist.

Bei Jan Radczuk, Clayton Speed, Lena Nordquist und Lisa Steinbrecher möchte ich mich herzlichst bedanken, die ich im Rahmen ihrer Ausbildung bzw. Bachelorarbeit betreuen durfte und mich in meinem Projekt tatkräftig unterstützt haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre Unterstützung und Motivation in allen Lebensphasen bedanken.

Mein größter Dank geht an Patrick. Du begleitest mich mit deiner unvoreingenommenen Sichtweise und bringst mich mit den richtigen Worten wieder in die Realität. Danke, dass du mich immer unterstützt und mich auffängst, wenn ich strauchle. Für deine Motivation bin ich dir unendlich dankbar und dass Du mir zeigst, dass das Leben seine eigene Geschwindigkeit hat.

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

Lisa Gleißner