UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Leiter: Prof. Dr. Kai Rothkamm

Die Inhibition der Rezeptor-Tyrosinkinase cMET in HPV-negativen HNSCC induziert keine Radiosensitivierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Kaweh Thieme-Beizaei
aus Berlin, Deutschland

Hamburg 2021

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: **04.03.2022**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Gunhild von Amsberg

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Kai Rothkamm

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 13

2. Material und Methoden 16
2.1. Zelllinien 16
2.2. cMET-Inhibitoren 16
2.3. Bestrahlung 16
2.4. Western-Blot 16
2.5. Proliferation 17
2.6. Kolonietests 17
2.7. Datenauswertung 17

3. Ergebnisse 18

3.1. cMET Expression und Phosphorylierung in HNSCC 18
3.2. Auswirkungen der cMET-Inhibition auf Zell-Proliferation, Zellüberleben und Strahlensensitivität 19

4. Diskussion 22

5. Zusammenfassung 24

6. Abkürzungsverzeichnis 26

7. Literaturverzeichnis 27

8. Danksagung 31

9. Lebenslauf 32

10. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation 34

11. Eidesstattliche Erklärung 35

Publikation

Receptor tyrosine kinase MET as potential target of multi-kinase inhibitor and radiosensitizer sorafenib in HNSCC

Kaweh Beizaei[1] | Lisa Gleißner MS[1] | Konstantin Hoffer[1] | Lara Bußmann MD[2] | Anh Thu Vu[1] | Leonhard Steinmeister MD[3] | Simon Laban MD[4] | Nikolaus Möckelmann MD[2] | Adrian Münscher MD[2] | Cordula Petersen MD[1] | Kai Rothkamm PhD[1] | Malte Kriegs PhD[1]

[1]Laboratory of Radiobiology and Experimental Radiation Oncology, Hubertus Wald Tumorzentrum—University Cancer Center Hamburg, Hamburg-Eppendorf, Germany

[2]Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Hubertus Wald Tumorzentrum—University Cancer Center Hamburg, Hamburg-Eppendorf, Germany

[3]Department for Diagnostic and Interventional Radiology and Nuclear Medicine, Hubertus Wald Tumorzentrum—University Cancer Center Hamburg, Hamburg-Eppendorf, Germany

[4]Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Medical Center Ulm, Ulm, Germany

Erschienen in:

Head & Neck. 2019; 41:208–215.

Received: 7 February 2018 | Revised: 13 June 2018 | Accepted: 18 July 2018

DOI: 10.1002/hed.25440

WILEY

ORIGINAL ARTICLE

Receptor tyrosine kinase MET as potential target of multi-kinase inhibitor and radiosensitizer sorafenib in HNSCC

Kaweh Beizaei[1] | Lisa Gleißner MS[1] | Konstantin Hoffer[1] | Lara Bußmann MD[2] | Anh Thu Vu[1] | Leonhard Steinmeister MD[3] | Simon Laban MD[4] | Nikolaus Möckelmann MD[2] | Adrian Münscher MD[2] | Cordula Petersen MD[1] | Kai Rothkamm PhD[1] | Malte Kriegs PhD[1]

[1]Laboratory of Radiobiology and Experimental Radiation Oncology, Hubertus Wald Tumorzentrum—University Cancer Center Hamburg, Hamburg-Eppendorf, Germany

[2]Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Hubertus Wald Tumorzentrum—University Cancer Center Hamburg, Hamburg-Eppendorf, Germany

[3]Department for Diagnostic and Interventional Radiology and Nuclear Medicine, Hubertus Wald Tumorzentrum—University Cancer Center Hamburg, Hamburg-Eppendorf, Germany

[4]Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Medical Center Ulm, Ulm, Germany

Correspondence
Malte Kriegs, Laboratory of Radiobiology and Experimental Radiation Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, Hamburg D-20246, Germany.
Email: m.kriegs@uke.de

Funding information
Bundesministerium für Bildung und Forschung, Grant/Award Number: 02NUK032; Hamburger Stiftung zur Förderung der Krebsbekämpfung; Hamburger Krebsgesellschaft; Bayer HealthCare

Abstract

Background: The multi-kinase inhibitor sorafenib displays antitumoral effects in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC); however, the targeted kinases are unknown. Here we aimed to identify those kinases to determine the mechanism of sorafenib-mediated effects and establish candidate biomarkers for patient stratification.

Methods: The effects of sorafenib and MET inhibitors crizotinib and SU11274 were analyzed using a slide-based antibody array, Western blotting, proliferation, and survival assays. X-rays were used for irradiations.

Results: Sorafenib inhibited auto-phosphorylation of epidermal growth factor receptor and MET, which has not been described previously. MET expression in HNSCC cells was not always associated with activity/phosphorylation. Furthermore, sorafenib-dependent cell kill and radiosensitization was not associated with MET level. Although MET inhibitors blocked proliferation, they caused only mild cytotoxicity and no radiosensitization.

Conclusion: We identified MET as a new potential target of sorafenib. However, MET inhibition is not the cause for sorafenib-mediated cytotoxicity or radiosensitization.

KEYWORDS

head and neck cancer, MET, radiosensitization, sorafenib, targeted therapy

1 | INTRODUCTION

Molecular targeting is expected to improve the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), both in the palliative and the curative setting. Various strategies have been tested in clinical and preclinical studies, many of them using drugs directed against hyperactivated kinases. So far, these efforts have led to the approval of cetuximab in combination with either chemotherapy or irradiation.[1] Although many targeting strategies show very promising results initially, response is often limited to a subset of patients, arguing for predictive biomarkers and personalized treatment regimens.

In this context, we have demonstrated that the small molecule inhibitor sorafenib causes significant cell inactivation and growth retardation in HNSCC cells.[2,3] Although not interacting with cisplatin-mediated cell inactivation, sorafenib enhances the efficacy of X-irradiation, leading to radiosensitization and a striking overall cell kill.[3] Sorafenib-mediated radiosensitization of cancer cells is probably caused by compromised DNA repair[2,4] and can be observed in various other entities such as colorectal, liver, or breast cancer.[5–8] It is not, however, a general phenomenon because glioblastoma cells were not sensitized.[9] Additionally, although its effects on proliferation and cell inactivation without irradiation can be observed in every tested HNSCC cell line, radiosensitization can only be observed in selected cell lines, arguing for 2 groups of HNSCC, *responding* and *nonresponding* cell lines in terms of sorafenib-mediated

radiosensitization.[2,3] Because the use of sorafenib as a monotherapy did not achieve a convincing therapeutic effect in HNSCC,[10,11] sorafenib may only be clinically useful as a radiosensitizer for responsive tumors. Unfortunately, no biomarkers are available to discriminate *responders* from *non-responders*, preventing the efficient use of sorafenib in the context of radiotherapy/chemotherapy. Additionally it is still unclear which kinases are inhibited by sorafenib in HNSCC, because the activity of its main known targets like Raf kinases is not affected in HNSCC.[2]

In this study, we therefore wanted to identify target kinases for sorafenib and determine their role in cellular effects like growth inhibition, cell inactivation, and radiosensitization of HNSCC cells. Because there is a special need to improve the therapy for human papilloma virus (HPV)–negative HNSCC due to the comparatively bad prognosis,[12] we focused only on HPV-negative HNSCC.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell lines

HPV-negative HNSCC cells and normal fibroblasts (F180) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, Carlsbad, California) containing 10% fetal calf serum (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) and 2 mM glutamine (Invitrogen) at 37°C and 100% humidification. Squamous cell carcinoma (SCC) cell lines were kindly provided by Prof. Dr. Reidar Grénman from the University Hospital Turku (UT), Finland. Cells were identified by a short tandem repeat multiplex assay (Applied Biosystems, Foster City, California) if a reference was available.

2.2 | Substances

Sorafenib (Nexavar; Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany), Crizotinib (LC Laboratories, Woburn, Massachusetts), and SU11274 (Abcam, Cambridge, United Kingdom) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Roche, Basel, Switzerland).

2.3 | Irradiation

Cells were irradiated at room temperature (RT) with 200 kV X-rays (Gulmay RS225; Gulmay Medical Ltd., Byfleet, United Kingdom; 15 mA, 0.8 mm Be +0.5 mm Cu filtering; dose rate of 1.2 Gy/min).

2.4 | Slide-based antibody array to analyze tyrosine kinase signaling

Proteins from whole-cell extracts were analyzed as specified by the manufacturer (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts). In brief, the antibody arrays were blocked and the cell lysates were incubated over night at 4°C under constant shaking. Unbound proteins were discarded and wells washed. After incubation with the detection antibody cocktail and subsequent washing, the wells were incubated with DyLight 680-linked Streptavidin. After another round of washing, the antibody array was rinsed with 10 mL purified water and completely dried. For fluorescence detection, the Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, Nebraska) was used. Signals were quantified using either Image J or LI-COR Image Studio 2.1 software.

2.5 | Western blotting

Of note, 250 000 cells were seeded, and 24 hours later approximately 5 μg protein from whole-cell extracts were detected by Western blot according to standard protocols. After the transfer, the membranes were blocked using phosphate-buffered saline containing 0.2% Tween20 and 5% bovine serum albumin (both Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) for 1 hour at RT. Antibodies were diluted in blocking solution for 1 hour at RT. Primary antibodies are anti-EGFR (#4407; 1:1000), anti-pEGFR (Y1173, #2239; 1:1000) anti-MET (#3127; 1:1000), anti-pMET (Y1234/1235; #3077; 1:1000) from Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts); anti-actin (#A-2228; 1:40000) from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Secondary antibodies (1 hour at RT) are anti-mouse and anti-rabbit antibodies (LI-COR, Lincoln, Nebraska; 1:7700).

2.6 | Cell proliferation

To measure cell proliferation, 100000 cells were seeded, treated with inhibitors or DMSO as a control 24 hours later, and cell numbers were determined as indicated using a Coulter Counter (Beckmann, Indianapolis, Indiana).

2.7 | Colony formation assay

Cell survival was measured by colony formation under preplating conditions. Therefore, 250 cells were seeded in T25 flasks 24 hours before inhibitor treatment. After 2 hours of treatment, the cells were irradiated as indicated and the medium was changed 24 hours later, keeping the cells without inhibitor for the rest of the experiment. Because inhibitor treatment might affect proliferation, all samples were grown until colonies reached equal size. After 10-20 days, colonies were fixed and stained with crystal violet, and the colonies of more than 50 cells were scored as "survivors." The surviving fraction was either normalized to the plating efficiency of the non-irradiated DMSO sample or the nonirradiated samples of each treatment arm.

2.8 | Data evaluation

Unless otherwise indicated, experiments were repeated at least 3 times. The data are presented as mean values (SEM). Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, California) was used for analyzing and graphing the data. To test for statistical

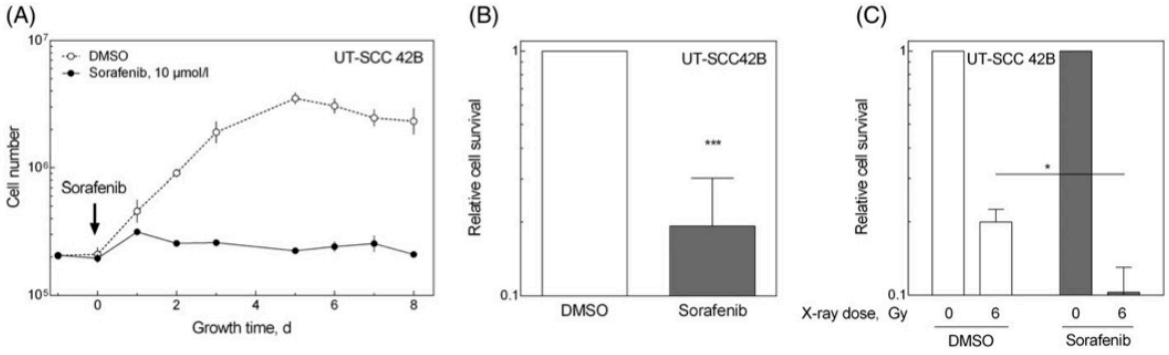


FIGURE 1 Effect of sorafenib on HNSCC cells. UT-SCC 42B cells were treated with dimethyl sulfoxide or 10 µM sorafenib. A, Proliferation was determined on the following days as indicated. B and C, Relative cell survival after 24 hours of sorafenib treatment as analyzed by colony formation assay without (B) or in combination with (C) X-irradiation. Cells were irradiated with 6 Gy after 2 hours of sorafenib treatment (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$)

significance, the unpaired student's t test was performed to calculate P-values (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$).

3 | RESULTS

3.1 | Effect of sorafenib on HNSCC cells and cellular signaling

As reported previously, sorafenib inhibits cell proliferation (Figure 1A), induces significant cell inactivation (Figure 1B) and radiosensitizes HNSCC *responder* cells such as UT-SCC 42B[2,3] (Figure 1C) causing a massive overall cell inactivation (Supporting Information Figure S1A). To identify the kinase(s), whose inhibition might be responsible for this radiosensitization, we first analyzed the effect of sorafenib on well-described targets such as Raf or PDGF receptor.[13] However, these kinases were either barely expressed or were not inhibited (see reference 2 and Supporting Information Figure S2). Because sorafenib is reported to predominantly block receptor tyrosine kinases (RTK),[13] we next analyzed the effect of sorafenib on RTK using an explorative slide-based antibody array that includes 38 RTK and RTK-dependent proteins (Figure 2A). Setting a threshold of 2-fold, the array identified at least 2 RTK which might be inhibited by sorafenib: the hepatocyte growth factor receptor (MET) and the epidermal growth factor receptor (EGFR). Using Western blot, we validated these results (Figure 2B). Because we detected autophosphorylation of tyrosine 1234/1235 (MET) and 1173

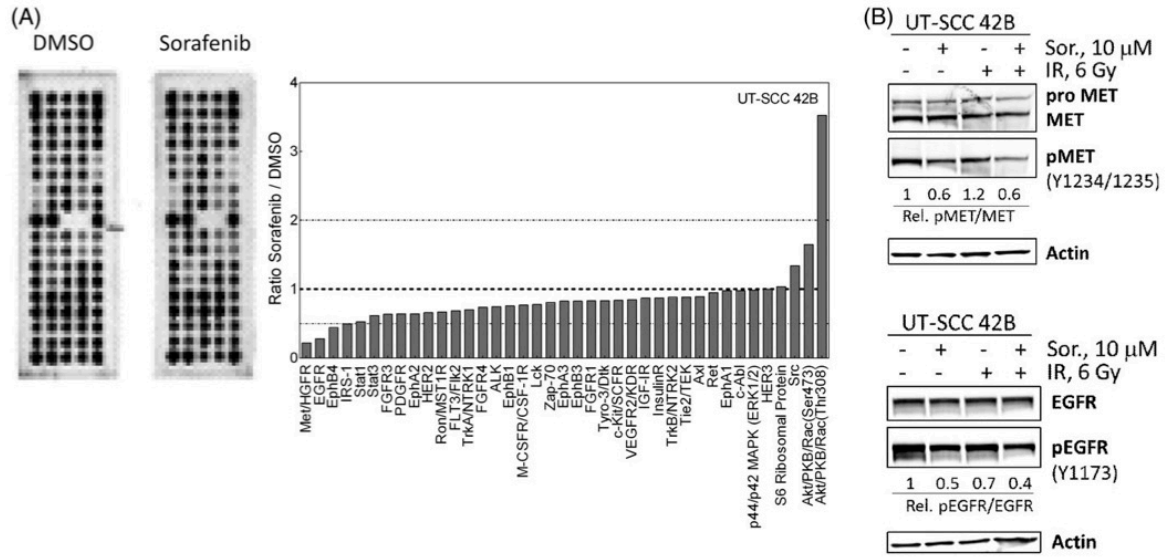


FIGURE 2 Effect of sorafenib on receptor tyrosine kinase (RTK) signaling. A, Left: Slide-based antibody array to analyze RTK signaling. Right: Relative ratio of signal intensities for cells treated with sorafenib or dimethyl sulfoxide as a control. The threshold was set 2-fold. B, Western blot analysis of UT-SCC 42B cells treated with sorafenib and irradiation 2 hours thereafter as indicated. Cells were lysed 15 minutes after irradiation. Antibodies against MET, EGFR, and the phosphorylated RTK (pMET, pEGFR), and actin (control) were used. Relative signal intensities for phosphorylated proteins normalized to the expression signals are depicted

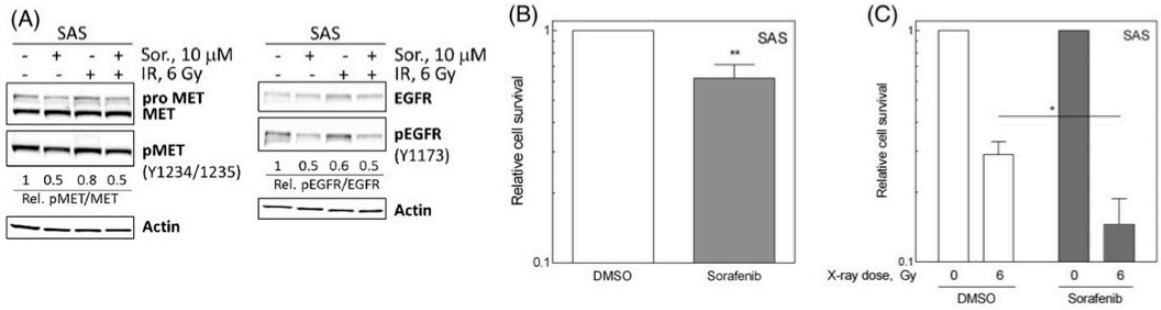


FIGURE 3 Effect of sorafenib on SAS cells. SAS cells were treated with dimethyl sulfoxide or 10 μM sorafenib. A, Western blot analysis of SAS cells treated with sorafenib and irradiation 2 hours thereafter as indicated. Cells were lysed 15 minutes after irradiation. Antibodies against MET, EGFR, and the phosphorylated RTK (pMET, pEGFR), and actin (control) were used. Relative signal intensities for phosphorylated proteins normalized to the expression signals are depicted. B and C, relative cell survival after 24 hours of sorafenib treatment as analyzed by colony formation assay without (B) or in combination with (C) X-irradiation. Cells were irradiated with 6 Gy after 2 hours of sorafenib treatment (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$)

(EGFR), these data indicate direct inhibition of both RTK by sorafenib. The effects of sorafenib on MET and EGFR phosphorylation (Figure 3A) as well as the effect on cell survival with and without X-irradiation (Figure 3B,C and Supporting Information Figure S1B) were confirmed using SAS as a second *responder* line.[3] Although a reasonable block of HNSCC proliferation can be induced by EGFR inhibition, only minor cell inactivation and no efficient radiosensitization can be achieved as described recently.[14] Therefore, EGFR inhibition is probably not the cause for sorafenib-mediated cytotoxicity or radiosensitization, arguing for MET inhibition as the potential cause of sorafenib-mediated cellular effects.

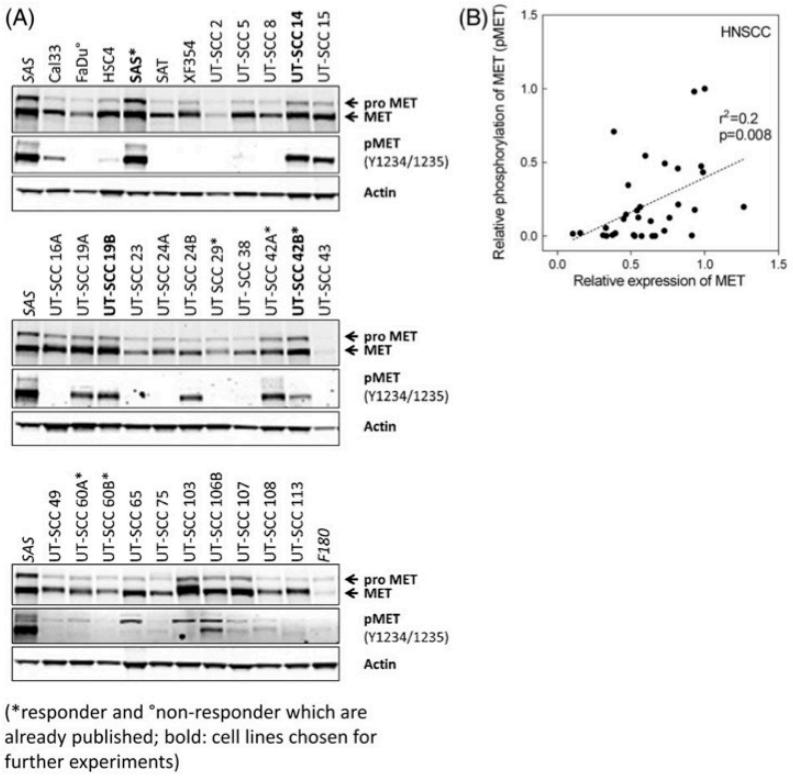


FIGURE 4 MET expression and phosphorylation in HNSCC. A, MET expression and phosphorylation in HNSCC cells and normal fibroblasts (F180) as analyzed by Western blot. Antibodies against MET, phosphorylated MET (pMET), and actin (control) were used. SAS cell lysate was used as a standard. If already published, *responder* cells are marked with an asterisk (*), *nonresponder*s are marked with an open circle (°). Cells used for further experiments are marked in bold. B, Relative signal intensities for MET expression and phosphorylation from (A) were plotted and analyzed by linear regression analysis

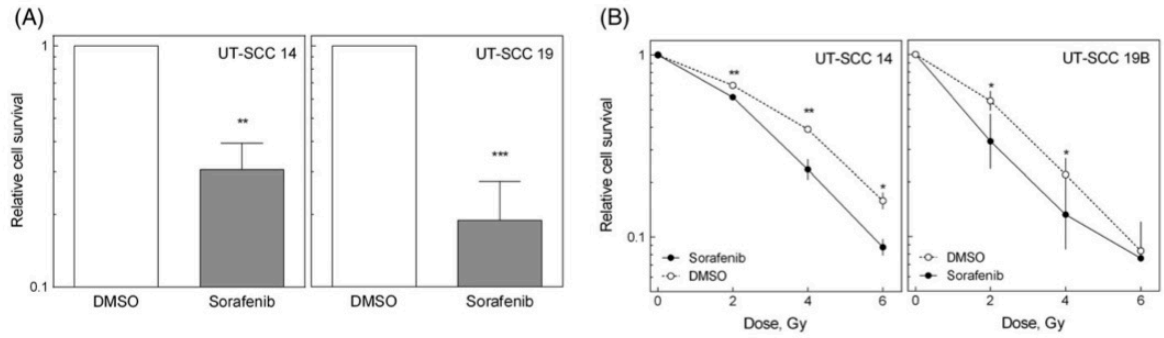


FIGURE 5 Effect of sorafenib on UT-SCC 14 and UT-SCC 19B cells. UT-SCC 14 and UT-SCC 19B cells were treated with dimethyl sulfoxide or 10 μM sorafenib. Relative cell survival after 24 hours of sorafenib treatment was analyzed by colony formation assay without (A) or in combination with (B) X-irradiation. Cells were irradiated with 0, 2, 4, or 6 Gy after 2 hours of sorafenib treatment (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$)

3.2 | MET expression and phosphorylation in HNSCC

Because MET seemed to be a promising target in HNSCC, we analyzed MET expression and phosphorylation in a panel of 32 HNSCC cell lines via Western blot (Figure 4A). SAS cells were used as a standard, whereas fibroblast cells (F180) were analyzed to compare expression to normal cells. As expected, most HNSCC cell lines displayed increased MET expression and phosphorylation compared to normal cells. Some HNSCC cells even showed very strong MET expression, like SAS and UT-SCC 19B, whereas others displayed moderate or only weak expression. Importantly, strong expression of MET was not always associated with increased MET phosphorylation, as detected for HSC4 and UT-SCC 16A cells, for example. But on average, MET phosphorylation correlated with expression as shown in Figure 4B. We observed no association between MET expression or phosphorylation and cellular radiosensitivity at 6 Gy (SF6; Supporting Information Figure S3A, B). With respect to sorafenib response, we observed high (SAS, UT-SCC 42B) as well as low MET expression/phosphorylation levels (UT-SCC 29, UT-SCC 60A, and UT-SCC 60B) among *responder* (*) cell lines, indicating that inhibition of MET might not be the only parameter for sorafenib-mediated effects.

3.3 | Effect of MET inhibition on proliferation, cell survival, and cellular radiosensitivity

For further experiments, 2 already known *responder* cell lines with strong (SAS) and moderate MET phosphorylation (UT-SCC 42B) and 2 additional cell lines with strong (UT-SCC 14) and moderate expression (UT-SCC 19B) were chosen. Using the colony formation assay, both additional cell lines displayed remarkable cell kill after sorafenib treatment (Figure 5A) and turned out to be *responder* cell lines in respect of sorafenib-mediated radiosensitization (Figure 5B). Although radiosensitization was more pronounced in UT-SCC 14 cells, combined treatment resulted in an impressive overall cell inactivation for both cell lines

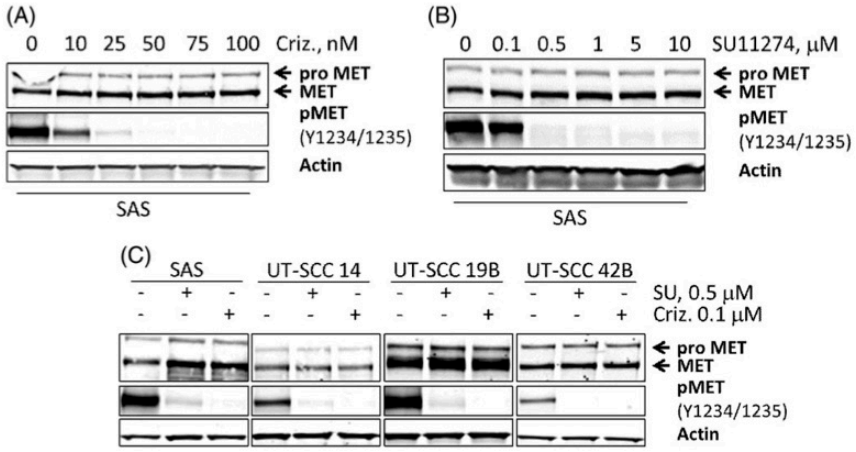


FIGURE 6 Inhibition of MET by crizotinib and SU11274. Western Blot analysis of MET expression and phosphorylation after 2 hours of treatment with MET inhibitors, crizotinib or SU11274. A and B, Different concentrations were tested using SAS cells. C, Crizotinib (0.1 μM) and SU11274 (0.5 μM) were tested in SAS, UT-SCC 19B, UT-SCC 42B, and UT-SCC 14 cells

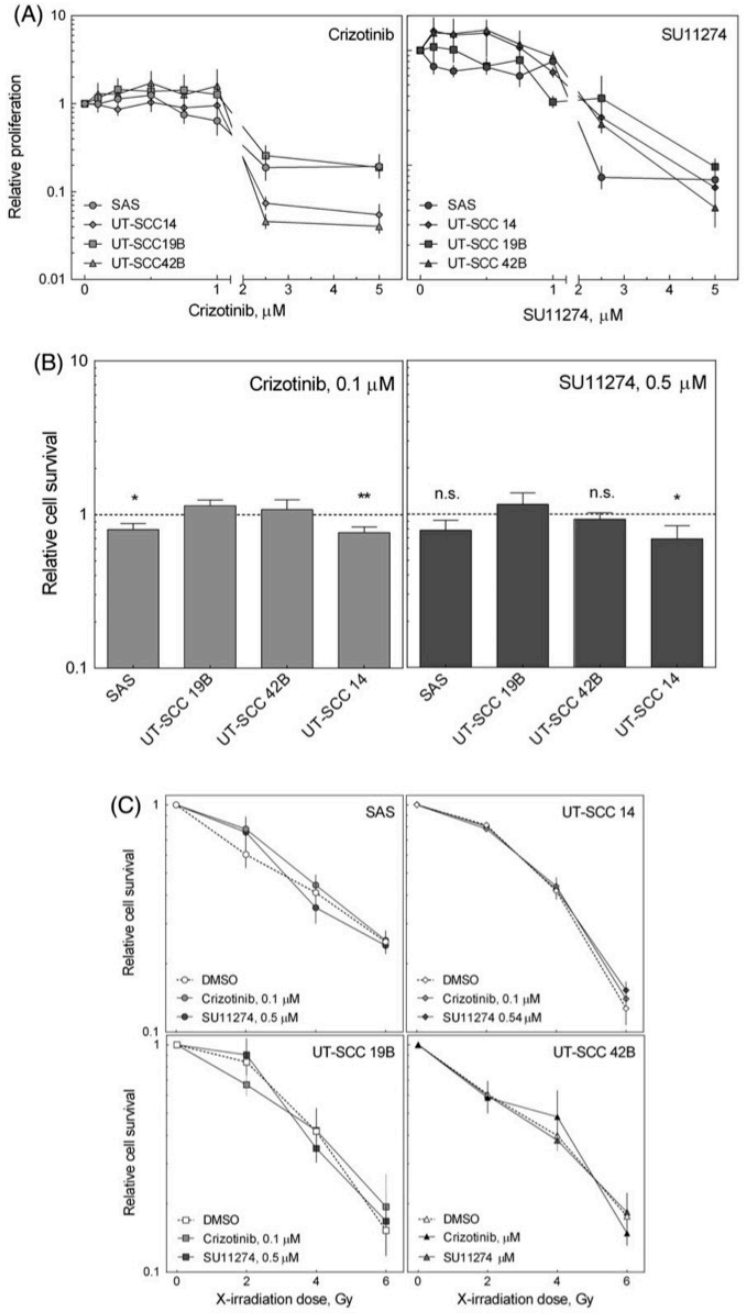


FIGURE 7 Effect of MET inhibitors on proliferation and cell survival. A, Relative proliferation. The effect of crizotinib (left) and SU11274 (right) on proliferation was tested by incubating HNSCC cell lines with increasing concentrations for 3 days. B and C, Relative cell survival. The effect of 0.1 μM crizotinib (left) and 0.5 μM SU11274 (right) on cell survival was analyzed by colony formation assay. The cells were treated with both inhibitors for 24 hours before changing the medium, keeping the cells without inhibitors for the rest of the time, without irradiation (B) or in combination with (C) X-irradiation. Cells were irradiated with 0, 2, 4, or 6 Gy after 2 hours of inhibitor treatment (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$)

(Supporting Information Figure S4A-B). To prove that sorafenib mediates its biological effects via MET inhibition, we also selected 2 small molecule inhibitors directed against MET, crizotinib and SU11274. Although crizotinib inhibits MET but also other tyrosine kinases like ALK and can be used to treat ALK-positive lung cancer,[15,16] SU11274 is described to be highly specific for MET.[17] Crizotinib completely blocked MET phosphorylation at a concentration

of 0.05 μM, whereas 0.5 μM SU11274 was required to achieve a complete block (Figure 6A). For all 4 cell lines, an effective blockage of MET could be observed with both inhibitors (Figure 6B).

Analyzing the effect of MET inhibition on proliferation, we observed no inhibitory effect of crizotinib in the sub-micromolar range and only mild effects for SU11274 (Figure 7A). Above 1 μM, more pronounced effects were apparent. Because we observed MET inhibition already at 50 nM (Crizotinib) and 0.5 μM (SU11274; Figure 6A), off-target blockage of other kinases is likely responsible for these antiproliferative effects. Without irradiation, MET inhibition only slightly affected cell survival in SAS and UT-SCC 14 cells but not in the other 2 cell lines as analyzed by colony formation assay (Figure 7B).

Next, we analyzed the effect of MET inhibition on cellular radiosensitivity. To this end, we incubated all 4 cell lines for 2 hours with MET inhibitors before irradiation. To avoid effects of proliferation inhibition on colony size, we changed the medium 24 hours after irradiation. Neither crizotinib nor SU11274 increased cellular radiosensitivity under the given conditions (Figure 7C), resulting only in moderate overall cell inactivation (Supporting Information Figure S5). This result demonstrates that the mechanism of sorafenib-mediated radiosensitization is independent of MET inhibition; hence, MET, although it is a target of sorafenib, is probably no target for cellular radiosensitization of HNSCC.

4 | DISCUSSION

Molecular targeting is a promising tool to improve the treatment of HNSCC, especially in combination with X-irradiation with the intent to radiosensitize the tumor cells. However, the underlying mechanisms have to be understood to enable precise and personalized treatment. In this context, we wanted to unveil the target(s) of multi-kinase inhibitor sorafenib, which inhibits proliferation and induces cell death and radiosensitization in a significant proportion of HNSCC cells. Using an explorative slide-based antibody array, we identified the RTK MET and EGFR as potential targets of sorafenib. With respect to EGFR, we have recently demonstrated that inhibition failed to induce significant cell death or robust radiosensitization in the cell lines used in this study. Although MET inhibition induces radiosensitization in other entities,[18–20] it also failed to do so in our HNSCC cells pretreated for 2 hours with 2 different MET inhibitors. Additionally, effects of crizotinib or SU11274 on proliferation and cell survival without irradiation turned out to be very limited in the sub-micromolar range, the concentration range where maximal MET inhibition was already achievable at the protein level (see Figure 6). This demonstrates that MET inhibition is likely not the cause of sorafenib-induced cell inactivation or radiosensitization. These results are in agreement with Baschnagel et al.[21] who also detected no radiosensitization and only moderate effects on cell survival in HNSCC using crizotinib.

Nevertheless, the identification of EGFR and MET as new potential targets of sorafenib is very interesting, because both are important oncogenes in various cancer types[22,23] and increased EGFR and MET expression are associated with worse prognosis in HNSCC.[24–26] Furthermore, sorafenib has also been described to interfere with tumor cell migration, invasion, and vascularization,[27], which are also mechanisms that can be regulated by EGFR and MET.[23,28] Therefore, EGFR and MET inhibition by sorafenib might still add to its antitumor activity, independently of the end points analyzed here. Although sorafenib has shown no clinical benefit in single treatment or in combination with cetuximab for advanced HNSCC,[10,11,29] its combination with radio-chemotherapy seems to be promising due to the observed cellular radiosensitization. Furthermore, it does not interfere with chemotherapy on the level of tumor cells but increases the survival of cisplatin-treated normal cells.[3] With respect to immunotherapies, sorafenib might lead to an immunosuppressive phenotype, which could be reverted by immune checkpoint inhibition as shown for liver cell cancer.[30,31] However, both EGFR and MET have been also shown to induce immune suppressive phenotypes,[32,33] which might be attenuated by a treatment with sorafenib. To define optimal conditions for a possible use of sorafenib in HNSCC, such interactions have to be analyzed in detail using preclinical models in the future.

The comparison of MET expression and phosphorylation in 32 HNSCC cell lines showed strong heterogeneity. We identified several cell lines with consistently weak expression and phosphorylation or strong expression and phosphorylation. However, we also identified cell lines with moderate MET expression showing moderate (eg, UT-SCC 15 and UT-SCC 24B), weak (eg, Cal33 and UT-SCC 42B), or even no (eg, SAT and UT-SCC 16A) detectable MET phosphorylation. These data emphasize the necessity to analyze phosphorylation or even the kinase activity rather than expression in the context of kinase-specific targeted therapeutics. Furthermore, we were not able to confirm any of the so-far described sorafenib targets such as Raf, PDGFR, VEGFR, or STAT in HNSCC (data not shown), arguing for different targets of sorafenib in the different cancer entities. With EGFR and MET, we have now identified 2 new potential targets of sorafenib in HNSCC which, however, seem not to confer cell inactivation nor radiosensitization but which are central molecules for targeted therapy in HNSCC.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Bayer HealthCare for providing sorafenib. Malte Kriegs and Kai Rothkamm were supported by Bundesministerium für Bildung und Forschung (02NUK032) and

Hamburger Krebsgesellschaft; Lara Bußmann was supported by Hamburger Stiftung zur Förderung der Krebsbekämpfung and Hamburger Krebsgesellschaft.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

ORCID

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

REFERENCES

1. Mockelmann N, Kriegs M, Lorincz BB, Busch CJ, Knecht R. Molecular targeting in combination with platinum-based chemoradiotherapy in head and neck cancer treatment. *Head Neck*. 2015;38:E2173-E2181.
2. Laban S, Steinmeister L, Gleissner L, et al. Sorafenib sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol*. 2013;109(2):286-292.
3. Mockelmann N, Rieckmann T, Busch CJ, et al. Effect of sorafenib on cisplatin-based chemoradiation in head and neck cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(17):23542-23551.
4. Gleissner L, Kwiatkowski M, Myllynen L, et al. Analyzing the influence of kinase inhibitors on DNA repair by differential proteomics of chromatin-interacting proteins and nuclear phospho-proteins. *Oncotarget*. 2017;8(67):110983-110993.
5. Dai XF, Ding J, Zhang RG, Ren JH, Ma CM, Wu G. 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):724-731.
6. Heravi M, Tomic N, Liang L, et al. Sorafenib in combination with ionizing radiation has a greater anti-tumour activity in a breast cancer model. *Anticancer Drugs*. 2012;23(5):525-533.
7. Kuo YC, Lin WC, Chiang IT, et al. Sorafenib sensitizes human colorectal carcinoma to radiation via suppression of NF-kappaB expression in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother*. 2012;66(1):12-20.
8. Yadav A, Kumar B, Teknos TN, Kumar P. Sorafenib enhances the antitumor effects of chemoradiation treatment by downregulating ERCC-1 and XRCC-1 DNA repair proteins. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(7):1241-1251.
9. Riedel M, Struve N, Muller-Goebel J, et al. Sorafenib inhibits cell growth but fails to enhance radio- and chemosensitivity of glioblastoma cell lines. *Oncotarget*. 2016;7(38):61988-61995.
10. Williamson SK, Moon J, Huang CH, 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):3330-3335.
11. Elser C, Siu LL, Winquist E, 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):3766-3773.
12. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus–associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*. 2006;24(5):736-747.
13. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(10):835-844.
14. Kriegs M, Kasten-Pisula U, Riepen B, et al. Radiosensitization of HNSCC cells by EGFR inhibition depends on the induction of cell cycle arrests. *Oncotarget*. 2016;7(29):45122-45133.
15. Cui JJ, Tran-Dube M, Shen H, et al. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). *J Med Chem*. 2011;54(18):6342-6363.
16. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(25):2385-2394.
17. Sattler M, Pride YB, Ma P, et al. A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer Res*. 2003;63(17):5462-5469.
18. Yang H, Lee HW, Kim Y, et al. Radiosensitization of brain metastasis by targeting c-MET. *Lab Invest*. 2013;93(3):344-353.
19. Li Y, Wang J, Gao X, et al. C-Met targeting enhances the effect of irradiation and chemical agents against malignant colon cells harboring a KRAS mutation. *PLoS One*. 2014;9(11):e113186.
20. Lal B, Xia S, Abounader R, Laterra J. Targeting the c-Met pathway potentiates glioblastoma responses to gamma-radiation. *Clin Cancer Res*. 2005;11(12):4479-4486.
21. Baschnagel AM, Galoforo S, Thibodeau BJ, et al. Crizotinib fails to enhance the effect of radiation in head and neck squamous cell carcinoma Xenografts. *Anticancer Res*. 2015;35(11):5973-5982.
22. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37(Suppl 4):S9-S15.
23. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(12):834-848.
24. Baschnagel AM, Williams L, Hanna A, et al. C-Met expression is a marker of poor prognosis in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated with chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;88(3):701-707.
25. Hartmann S, Bhola NE, Grandis JR. HGF/Met signaling in head and neck cancer: impact on the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2016;22(16):4005-4013.
26. Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62(24):7350-7356.
27. Kim EH, Kim MS, Jung WG. The mechanisms responsible for the radiosensitizing effects of sorafenib on colon cancer cells. *Oncol Rep*. 2014;32(6):2421-2428.
28. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol*. 2007;25(26):4057-4065.
29. Gilbert J, Schell MJ, Zhao X, et al. A randomized phase II efficacy and correlative studies of cetuximab with or without sorafenib in recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2015;51(4):376-382.
30. Chen Y, Duda DG. Targeting immunosuppression after standard sorafenib treatment to facilitate immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma—an auto-commentary on clinical potential and future development. *Oncoimmunology*. 2015;4(10):e1029703.
31. Chen Y, Ramjiawan RR, Reiberger T, et al. CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 2015;61(5):1591-1602.
32. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov*. 2013;3(12):1355-1363.
33. Balan M, Mier y Teran E, Waaga-Gasser AM, et al. Novel roles of c-Met in the survival of renal cancer cells through the regulation of HO-1 and PD-L1 expression. *J Biol Chem*. 2015;290(13):8110-8120.

SUPPORTING INFORMATION

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

How to cite this article: Beizaei K, Gleißner L, Hoffer K, et al. Receptor tyrosine kinase MET as potential target of multi-kinase inhibitor and radiosensitizer sorafenib in HNSCC. *Head & Neck*. 2019;41:208–215. https://doi.org/10.1002/hed.25440

1. Einleitung

Tumoren können in unterschiedlichen Regionen des Kopf-Hals Bereichs auftreten, z.B. Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx oder Larynx. In mehr als 90% der Fälle handelt es sich hierbei um Plattenepithelkarzinome, die von den Epithelzellen der Mukosa ausgehen (engl. *Head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC*). Mit ca. 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr stellen sie die sechsthäufigste Krebserkrankung weltweit dar[3].

Zu den konventionellen Therapieoptionen zählen die Operation, die platinbasierte Chemotherapie und die Strahlentherapie. Lediglich in einem Drittel der Fälle werden die Tumore im Frühstadium diagnostiziert, in dem sowohl die Operation als auch die Bestrahlung eine ähnlich gute lokale Tumorkontrolle erzielen können. In den meisten Fällen jedoch liegt bei Diagnosestellung bereits ein lokal fortgeschrittenes Stadium vor, das eine Kombination der genannten Therapiesäulen notwendig macht[1, 3, 4, 5].

Man unterscheidet grob zwei Entitäten, nämlich HPV-positive HNSCC, die durch humane hoch-Risiko Papillomaviren ausgelöst werden und die HPV-negativen Tumore, die mit langjährigem Tabak- und Alkoholkonsum assoziiert sind[1, 2, 3]. Während die Inzidenz der HPV-negativen HNSCC in westlichen Ländern durch gesundheitspolitische Maßnahmen rückläufig ist, nimmt die Inzidenz der HPV-assoziierten Tumore stetig zu[1, 3]. Trotz des Rückgangs HPV-negativer HNSCC ist die Prognose dieser Patientengruppe mit einem 5-Jahres Gesamtüberleben von 50 % deutlich schlechter als die der Patienten mit HPV-positivem Status[1]. Deshalb gilt es bei HPV-negativen HNSCC zum einen neue Targets für eine Zielgerichtete Therapie zu identifizieren und zum anderen neue Biomarker zu etablieren, die ein therapeutisches Ansprechen vorhersagen können. Dabei stehen hyperaktive Kinasen im Fokus der Forschung, deren Hemmung durch Antikörper oder Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) nicht nur als Monotreatment effektiv sein könnten, sondern auch in Kombination z.B. mit Röntgenbestrahlung sensitivierend wirken könnten[1, 4, 5, 6].

Die Amplifikation oder Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl.: *epidermal growth factor receptor*, EGFR) stellt in HNSCC eine häufige

Veränderung dar. Diese Tatsache führte zur Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab, der gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist und sowohl von der FDA als auch von der EMA in Kombination mit Bestrahlung oder platinbasierter Chemotherapie bei Patienten mit Kopf-Hals Tumoren zugelassen ist[1]. Der Erfolg solcher zielgerichteten Therapien ist aber begrenzt, da es sich meist um Subgruppen von Patienten handelt, die davon profitieren. Deshalb ist es wichtig nach prädiktiven Biomarker zu suchen, um genau diese Patientengruppen zu identifizieren[6].

Mit dem Ziel, neue zielgerichtete Therapeutika in der Therapie HPV-negativer HNSCC zu identifizieren, ist in Voruntersuchungen zu dieser Arbeit der niedermolekulare Inhibitor Sorafenib als vielversprechender Ansatz in unseren Fokus gerückt[4, 5]. Sorafenib wurde im Jahr 2005 erstmalig von der FDA in der Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen. Als Multikinase-Inhibitor hemmt Sorafenib die Autophosphorylierung mehrerer Kinasen, darunter die Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR1, -2, und -3, PDGFRβ, c-Kit und RET, sowie die Serin-Threonin-Kinasen der RAF-Familie[8].

In Voruntersuchungen zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sorafenib in HPV-negativen HNSCC Zelllinien sowohl das Zellwachstum hemmt, als auch eine Strahlensensitivierung induziert[4, 5]. In Einklang mit diesen Ergebnissen haben andere Arbeitsgruppen aufzeigen können, dass Sorafenib auch bei anderen Tumorentitäten in Kombination mit Bestrahlung eine Strahlensensitiverung bewirken kann[9, 10]. Allerdings lässt sich die Strahlensensitivierung in HPV-negativen HNSCC nicht allgemein beobachten, sondern nur in ausgewählten Zelllinien. Im Gegensatz dazu, konnte der zytotoxische und antiproliferative Effekt von Sorafenib in allen von uns untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass es bezüglich der Sorafenib-vermittelten Strahlen-sensitivierung zwei HNSCC-Gruppen geben muss, nämlich die sogenannten *responder* und die *non-responder*[4, 5]. Bislang gibt es jedoch keinen Biomarker, der die *responder* identifizieren kann. Wir wissen lediglich, dass die Sorafenib-vermittelte Strahlensensitivierung durch eine Beeinträchtigung der DNA-Reparatur zustande kommt[4, 11], und dass die bekannten Ziel-Kinasen von Sorafenib (z.B. RAF) bei der Sorafenib-vermittelten Strahlensensitivierung keine Rolle spielen[4].

Um herauszufinden, ob es neben den bereits bekannten Zielen weitere Kinasen gibt, die von Sorafenib inhibiert werden und somit potentiell an der Sorafenib-vermittelten Strahlensensitivierung beteiligt sind, wurde im Rahmen einer Vorgängerstudie ein *slide-based antibody arrays* angewendet. Hier wurde die Wirkung von Sorafenib auf 38 verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine Rezeptor-Tyrosinkinase gehemmt wurde, die bislang noch nicht als Target von Sorafenib beschrieben wurde, nämlich der *cellular hepatocyte growth factor receptor* (cMET)[6].

Die Rezeptor-Tyrosinkinase cMET wird in Epithelzellen verschiedener Organe exprimiert und ist physiologischerweise an der Gewebehomöostase beteiligt. Sein Ligand, der *hepatocyte growth factor* (HGF) aktiviert nach Bindung an den Rezeptor eine Reihe von Signalwegen, unter anderem den MAPK-Signalweg und den PI3K/Akt-Signalweg, die an der Proliferation, Motilität, Migration und Invasion beteiligt sind[13].

Die Aufgabenstellung innerhalb meiner Arbeit war es, die Auswirkungen einer MET-Hemmung auf HPV-negative Zelllinien zu untersuchen, und zwar auf molekularer Ebene und auf Ebene der Proliferation bzw. des Zelllüberlebens. Letzteres wurde auch im Zusammenhang mit einer Bestrahlung mittels Röntgenstrahlung untersucht. Um die zellulären Sorafenib-vermittelten Effekte mit einer hohen Sicherheit auf eine MET-Hemmung zurückführen zu können, wurden für die Experimente zudem zwei MET-Inhibitoren eingesetzt. Zum einen der klinisch relevante aber nicht-selektive MET-Inhibitor Crizotinib, zum anderen der hoch-selektive experimentelle MET-Inhibitor SU11274.
Zudem wurde im Vorfeld die basale cMET-Expression sowie die cMET-Autophosphorylierung - als Surrogatmarker für die cMET-Aktivität - in normalen Fibroblasten und einer Reihe von HNSCC Zelllinien untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

Humane papillomavirus- negative HNSCC Zelllinien wurden bei 37°C und 100 % Luftfeuchtigkeit in Dulbecco's Modified Eagle Medium kultiviert (D-MEM; Invitrogen, Carlsbad, California), welches 10% fötales Kälberserum (FCS; PAN Biotech, Aidenbach, Germany) und 2 mM Glutamin enthielt (Invitrogen, Carlsbad, California). UT-SCC-Zelllinien wurden von Prof. Dr. Reidar Grénman vom Universitätsklinikum Turku (UT, Finland) zur Verfügung gestellt. Um alle Zelllinien eindeutig zu identifizieren, wurde ein *Short Tandem Repeat Multiplex Assay* durchgeführt (Applied Biosystems, Foster City, California).

2.2. cMET-Inhibitoren

Als cMET-Inhibitoren wurden Crizotinib (LC Laboratories, Woburn, Massachusetts) und SU11274 (Abcam, Cambridge, United Kingdom) verwendet, welche in Dimethylsulfoxid (DMSO; Roche, Basel, Switzerland) gelöst wurden.

2.3. Bestrahlung

Die Tumorzellen wurden bei Raumtemperatur mit 200 kV Röntgenstrahlen bestrahlt (Gulmay RS225; Gulmay Medical Ltd., Byfleet, United Kingdom; 15 mA, 0.8 mm Be + 0,5 mm Cu filtering; dose rate of 1.2 Gy/min).

2.4. Western Blot

Es wurden jeweils 250.000 Zellen ausgesät, von denen nach 24 h ca. 5 μg Protein aus Ganzzellextrakten gemäß Standardprotokoll per Western-Blot analysiert wurden. Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), 0,2% Tween20 und 5% Rinderalbumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri)) geblockt. Die Antikörper wurden bei Raumtemperatur für 1 h in Blockierlösung verdünnt. Zu den verwendeten Primärantikörper gehören Anti-MET (#3127; 1:1000), Anti-pMET

(Y1234/1235; #3077; 1:1000) von Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts); Anti-Aktin (#A-2228; 1:40000) von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Als Sekundärantikörper (eine Stunde bei Raumtemperatur) kamen Anti-Maus und Anti-Kaninchen Antikörper zum Einsatz (LI-COR, Lincoln, Nebraska; 1:7700).

2.5. Proliferation

Für die Proliferationstests wurden 100.000 Zellen ausgesät und 24 h später mit dem jeweiligen Inhibitor oder DMSO als Kontrolle behandelt. Zur Quantifizierung der Zellzahlen kam ein *Coulter Counter* zum Einsatz (Beckmann, Indianapolis, Indiana).

2.6. Kolonietests

Das Zellüberleben wurde unter *pre-plating* Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden 250 Zellen in T25-Flaschen ausgesät und 24 h später mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt. Die Zellen wurden 2 h nach Inhibitor-Gabe bestrahlt. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung wurde das Medium gewechselt, um es vom Inhibitor zu befreien. Sobald die Proben gleichgroße Kolonien gebildet hatten, wurden sie nach 10-20 Tagen fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Lediglich die Kolonien mit mehr als 50 Zellen wurden gezählt, alle anderen wurden ignoriert. Die Überlebensrate wurde entweder auf die „*plating efficiency*“ (= Zahl der Kolonien, die jeweils durch eine Zelle entstanden sind) der unbestrahlten DMSO Proben normiert oder aber auf die unbestrahlten Proben jeder einzelnen Behandlungsreihe.

2.7. Datenauswertung

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Experimente mindestens dreimal wiederholt. Alle Messdaten werden als Mittelwerte (SEM) dargestellt. Die Datenanalyse und Darstellung der Graphen wurde mit der Software prism 5 durchgeführt (GraphPad Software, La Jolla, California). Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen, wurden p-Werte mit Hilfe des ungepaarten Students t-Test berechnet (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$).

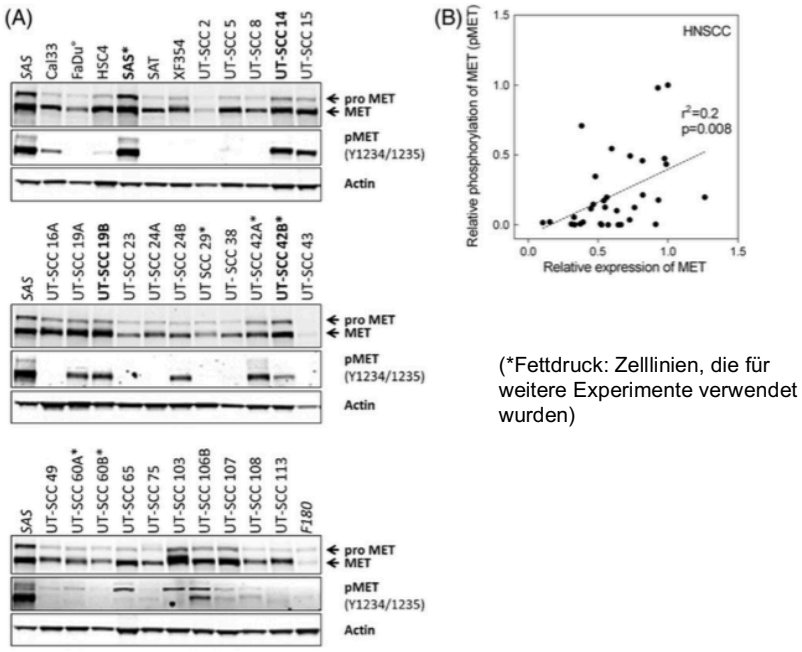
3. Ergebnisse

3.1. cMET Expression und Phosphorylierung in HNSCC

Da die Rezeptor-Tyrosinkinase cMET als potentiell neues Zielmolekül in unseren Fokus gerückt war, haben wir zunächst an 32 HNSCC Zelllinien sowohl die cMET-Expression als auch die cMET-Phosphorylierung mittels Western-Blot untersucht (Abb. 1A). Aufgrund der hohen cMET-Expression und -Phosphorylierung der Zelllinie SAS, wurde diese als Standard verwendet. Um die cMET-Expression und -Phosphorylierung von HNSCC-Zellen mit normalen Zellen zu vergleichen, wurden zusätzlich Fibroblasten (F180) untersucht.

Dabei konnten wir erwartungsgemäß aufzeigen, dass in den meisten HNSCC-Zelllinien die cMET-Expression und -Phosphorylierung im Vergleich zu normalen Zellen höher war. Jedoch war die Expression und Phosphorylierung zwischen den einzelnen HNSCC-Zelllinien unterschiedlich hoch. Die Zelllinien mit der höchsten MET-Expression waren dabei SAS und UT-SCC 19B. Zudem fanden wir heraus, dass zwar eine signifikante ($p=0,08$) aber schwache Korrelation ($r^2=0,2$) zwischen der Höhe der MET-Phosphorylierung und der Höhe der MET-Expression besteht (Abb. 1B). Zum Beispiel zeigen die Zelllinien HSC4 und UT-SCC 16A jeweils eine starke MET-Expression, die cMET-Autophosphorylierung ist aber gering.

Für die weiteren Untersuchungen wurden vier HNSCC Zelllinien mit unterschiedlicher cMET-Expression und cMET-Autohphosphorylierung ausgewählt: SAS (sehr starke Expression, sehr starke Autophosphorylierung), UT-SCC 14 (starke Expression, starke Autophosphorylierung), UT-SCC 19B (starke Expression, mittlere Autophosphorylierung) und UT-SCC 42B (starke Expression, schwache Autophosphorylierung). Zudem war zum Zeitpunkt der Experimente bekannt, dass SAS und UT-SCC 42B Zellen durch Sorafenib radiosensitiviert werden konnten, es sich also bei diesen Linien um *responder* handelte. Im Zuge der weiteren Arbeiten stellte sich zudem heraus, dass auch UT-SCC 14 und UT-SCC 19 Zellen durch Sorafenib radiosensitiviert werden können (Daten nicht gezeigt), weshalb im weiteren Verlauf also mit insgesamt vier *responder*-Zelllinien gearbeitet wurde.



(*Fettdruck: Zelllinien, die für weitere Experimente verwendet wurden)

Abb. 1 cMET Expression und Phosphorylierung in HNSCC. (A) cMET Expression und Phosphorylierung in HNSCC Zellen sowie normalen Fibroblasten (F180), die durch Western-Blot untersucht worden sind. Es wurden Antikörper gegen cMET, phosphoryliertes cMET (pMET) und Aktin (Kontrolle) verwendet. Als Standard wurde SAS Zell-Lysat verwendet. Die Sorafenib *responder*-Zelllinien sind (*)-markiert, die *nonresponder*-Zelllinien (°)-markiert. Zelllinien, die für weitere Versuche benutzt wurden, sind fettgedruckt. (B) Die relativen Signalintensitäten der cMET-Expression und Phosphorylierung aller Zelllinien aus (A) wurden durch lineare Regressionsanalyse in Beziehung gesetzt.

3.2. Auswirkungen der cMET-Inhibition auf Zell-Proliferation, Zellüberleben und Strahlensensitivität

Um herauszufinden, ob die Sorafenib-vermittelten Effekte durch eine cMET-Hemmung zu erklären sind, wurden zwei niedermolekulare Inhibitoren für unsere Experimente verwendet. Bei dem ersten Inhibitor handelt es sich um Crizotinib, einem TKI, der neben cMET weitere Tyrosin-Kinasen wie z.B. ALK hemmt und eine wichtige Rolle in der Therapie des ALK-positiven Bronchialkarzinoms einnimmt[14,15]. Bei dem zweiten Inhibitor handelt es sich um den hochselektiven MET-Inhibitor SU11274[16].

Mittels Western-Blot konnten wir nachweisen, dass Crizotinib in der Zelllinie SAS bereits ab einer Konzentration von 0,05 μM die Autophosphorylierung von cMET komplett hemmt (Abb. 2A) und bei SU11274 eine Konzentration von 0,5 μM zu einer Hemmung der cMET-Autophosphorylierung führt (Abb. 2B). Dies spricht für eine effiziente Hemmung von cMET bei diesen Konzentrationen. Darüber hinaus konnte in allen vier untersuchten Zelllinien sowohl mit Crizotinib als auch mit SU11274 bei

vergleichbarer Konzentration eine effektive cMET-Hemmung erzielt werden (Abb. 2C).

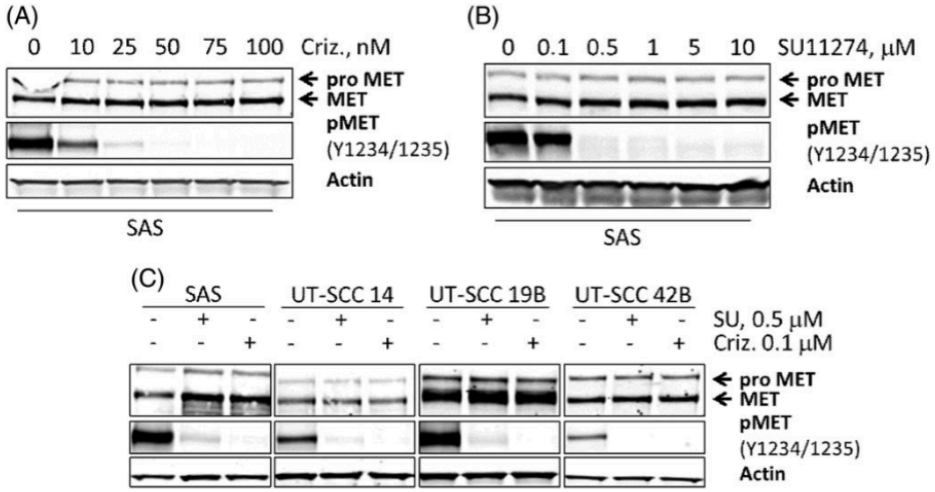


Abb. 2 cMET-Hemmung durch Crizotinib und SU11274. Western-Blot Analyse der cMET-Expression und Autophosphorylierung nach 2 h cMET-Inhibition. Unterschiedliche Konzentrationen an (A) Crizotinib oder (B) SU11274 wurden an der Zelllinie SAS getestet. (C), Crizotinib (0,1 μM) und SU11274 (0,5 μM) wurden in folgenden Zelllinien getestet: SAS, UT-SCC 19B, UT-SCC 42B, UT-SCC 14.

Als nächstes wurde untersucht, welche Auswirkung eine cMET-Hemmung auf die Zellproliferation hat. Dabei konnte beobachten werden, dass im submikromolaren Dosisbereich Crizotinib keine und SU11274 nur eine sehr geringe Proliferationshemmung erzielen konnte (Abb. 3A). Im Dosisbereich über 1 μM waren die Effekte auf die Zellproliferation wesentlich ausgeprägter.

Zudem wurde der Einfluss einer MET-Hemmung auf das Zellüberleben mit Hilfe von Koloniebildungstests untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass eine MET-Hemmung das Zellüberleben lediglich in den Zelllinien SAS und UT-SCC 14 geringfügig beeinträchtigt, während die beiden anderen Zelllinien unbeeinflusst blieben (Abb. 3B).

Im letzten Schritt wurde darüber hinaus untersucht, ob eine direkte cMET-Hemmung Einfluss auf die Strahlensensitivität hat, so wie aus den Vorarbeiten zu Sorafenib vermutet werden konnte. Zu diesem Zweck wurden alle vier Zelllinien für 2 h mit dem jeweiligen cMET-Inhibitor inkubiert, bevor sie mit unterschiedlichen Dosen an Röntgenstrahlung bestrahlt wurden. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung wurde das Medium jeder behandelten Zelllinie gewechselt, um zu vermeiden, dass

die Inhibitoren durch Proliferationshemmung die Koloniegröße beeinflussen. Unter diesen Bedingungen konnte weder Crizotinib noch SU11274 die Strahlensensitivität der Tumorzellen beeinflussen (Abb. 3C). Diese Resultate zeigen daher, dass die Sorafenib-vermittelte Strahlensensitivierung nicht mit einer cMET-Hemmung erklärt werden kann und cMET kein Target für Strategien zur Radiosensitivierung von HNSCC darstellt.

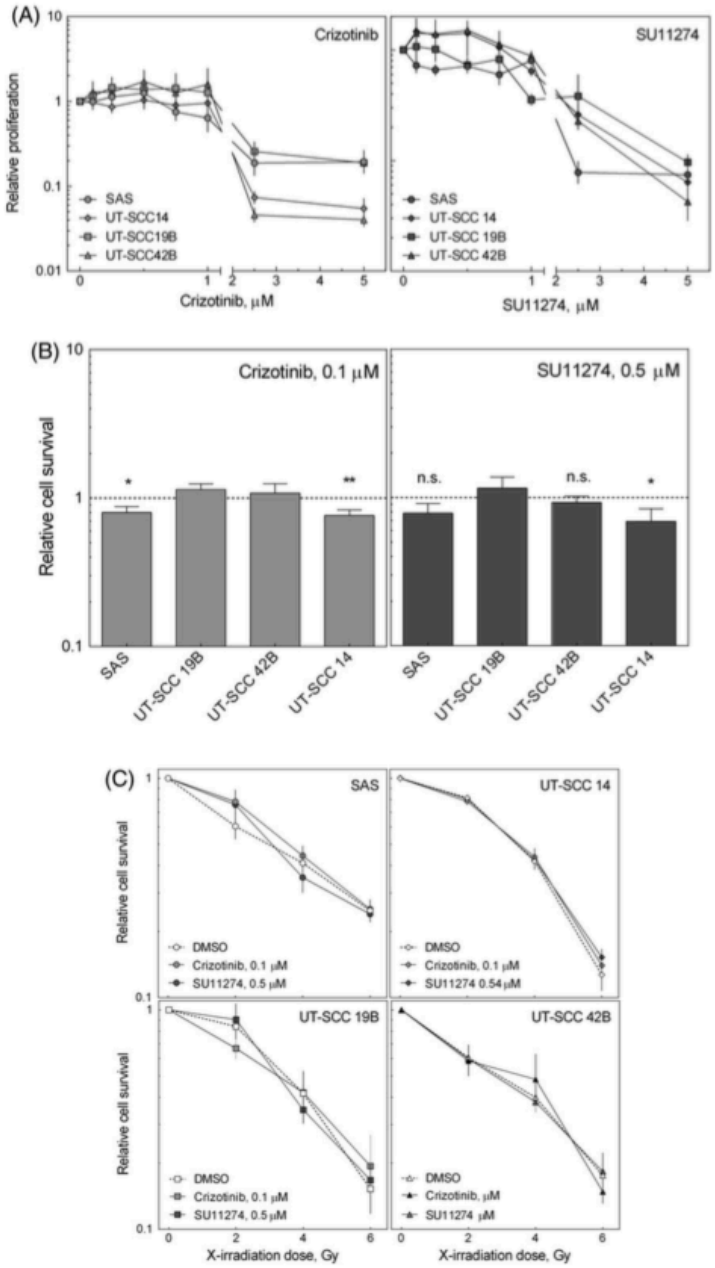


Abb. 3 Auswirkungen der cMET-Hemmung auf die Zellproliferation und das Zellüberleben. (A) Relative Proliferation. Die Auswirkung von Crizotinib (links) und SU11274 (rechts) auf die Proliferation wurde untersucht, in dem die HNSCC-Zelllinien mit unterschiedlich hohen Konzentrationen für 3 d inkubiert wurden. (B) und (C), Relatives Zellüberleben. Der Effekt von 0,1 μM Crizotinib (links) und 0,5 μM SU11274 (rechts) auf das Zellüberleben wurde durch einen Koloniebildungstest untersucht. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Inhibitor für 24 h behandelt, anschließend wurde das Medium gewechselt, so dass die Zellen für die restliche Zeit vom Inhibitor befreit waren. (B) Ohne Bestrahlung oder (C) in Kombination mit Bestrahlung; dabei wurden die Zellen zunächst für 2 h mit dem Inhibitor behandelt und anschließend mit 0, 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt (* P < .05; ** P < .01; *** P < .001)

4. Diskussion

Die molekulare Therapie bzw. das molekulares Targeting ist ein vielversprechender Ansatz in der Therapie von Kopf-Hals Tumoren, auch zur Strahlensensitiverung der Tumorzellen. Es müssen aber zugrundeliegende Mechanismus verstanden werden, um daraus effiziente und personalisierte Therapien ableiten zu können. Vorarbeiten haben eine Radiosensitiverende Wirkung des klinisch zugelassenen Multikinaseinhibitors Sorafenib aufgezeigt (Laban *et al.,* Möckelmann *et al.*). Obwohl Sorafenib als Monotherapie oder in Kombination mit Cetuximab bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren bislang keinen klinischen Nutzen erzielen konnte[27, 28, 29], erscheint die Kombination mit einer Radiochemotherapie aufgrund der beobachteten zellulären Strahlensensitivierung vielversprechend. Zudem beeinflusst Sorafenib die Chemotherapie nicht negativ auf Ebene der Tumorzellen und erhöht sogar das Überleben von Normalzellen nach Cisplatin-Behandlung[5].
In diesem Kontext wurde bereits in Voruntersuchungen versucht, diejenigen Zielmoleküle des Multikinase-Inhibitors Sorafenib zu identifizieren, die in HNSCC-Zelllinien für die Hemmung der Zellproliferation, der Induktion des Zelltods und einer Strahlensensitivierung verantwortlich sind. Dabei wurde im Rahmen eines „*Slide-based antibody array*" neben EGFR unter anderem die Rezeptor-Tyrosinkinase cMET als potentielles Target von Sorafenib identifiziert. Daraus ergab sich die Frage, ob die Hemmung von cMET für die Sorafenib vermittelten Effekte und insbesondere die Radiosensitivierung verantwortlich ist.

Die Identifikation von cMET und EGFR als potentiell neue Targets von Sorafenib ist eine interessante Entdeckung, insbesondere, weil es sich in beiden Fällen um wichtige Onkogene handelt, die in unterschiedlichen Tumorentitäten vorkommen[21, 22] und bei Vorliegen einer Überexpression in HNSCC mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert sind[23-25]. Interessanter Weise zeigte der Vergleich zwischen cMET-Expression und –Phosphorylierung in 32 HNSCC Zelllinien eine große Heterogenität auf. Neben Zelllinien mit schwacher Expression und Phosphorylierung bzw. starker Expression und Phosphorylierung konnten auch Zelllinien identifiziert werden, die eine moderate MET-Expression aufwiesen, teilweise mit nur mäßiger (z.B. UT-SCC 15 und UT-SCC 24B), schwacher (z.B. Cal33 und UT-SCC 42B) oder gar keiner cMET-Phosphorylierung (z.B. SAT und UT-SCC 16A). Dies zeigt, dass die

Expression nicht immer die Aktivität einer Kinase wiederspiegelt, was gerade in Bezug auf kinase-spezifische zielgerichtete Therapien von Interesse ist; Untersuchungen der Phosphorylierung oder sogar die Untersuchung der Kinase-Aktivität scheinen in dem Zusammenhang aussagekräftiger als die Expression selbst.

Die für die weiteren Untersuchungen verwendeten Zelllinien zeigten sowohl im Hinblick auf die Expression als auch in Hinblick auf die Phosphorylierung unterschiedliche Basallevel, von stark bis schwach. Trotzdem konnte in keiner dieser Linien in dieser Arbeit eine Strahlensensitivierung induziert werden. Dies steht zwar im Wiederspruch zu Ergebnissen mit anderen Entitäten, bei denen eine Strahlensensitivierung nach cMET-Hemmung erreicht werden konnte [17-19]; für HNSCC bestätigen diese Daten aber die Beobachtungen von Baschnagel *et al.* die auch keine Strahlensensitivierung zeigen. Ebenfalls wie bei Baschnagel et al. hatten die beiden MET-Inhibitoren Crizotinib und SU11274 ohne Bestrahlung eine nur sehr begrenzte Wirkung auf die Proliferation und das Zellüberleben im submikromolaren Dosisbereich (siehe Abb. 2). Denn obwohl in den Western-Blot Analysen eine MET-Hemmung bereits mit Dosierungen unter 1 μM zu erreichen war, nämlich 50 nM (Crizotinib; Abb. 2A) und 0,5 μM (SU11274; Abb. 2B), konnte der antiproliferative Effekt erst im Dosisbereich über 1 μM erzielt werden. Deshalb kann der antiproliferative Effekt nicht durch eine MET-Hemmung erklärt werden. Es müssen vielmehr *Off-target*-Effekte, als die Hemmung anderer Kinasen verantwortlich für die Proliferationshemmung sein.
Insgesamt zeigen die Daten, dass der Effekt einer MET-Hemmung auf die bislang untersuchten Endpunkte begrenzt ist und die Blockade von cMET nicht ursächlich für die Sorafenib-vermittelte Zellinaktivierung oder Strahlensensitivierung ist. Ähnliche Erkenntnisse konnten bereits auch für die Inhibition des EGFR gewonnen werden (Kriegs et al. 2016)

Die Ergebnisse schließen aber nicht aus, dass andere therapierelevante Prozesse durch die Inhibition von cMET oder des EGFR beeinflusst werden, wie z.B. die Tumorzellmigration, -invasion sowie -vaskularisierung[22,26] und daher die EGFR oder cMET Hemmung durch Sorafenib hierrüber zum therapeutischen Nutzen von Sorafenib beiträgt. Denkbar sind auch immunologische Effekte, die therapierelevant sein könnten, da cMET als auch der EGFR immunsuppressive Phänotypen

induzieren[32,33], die durch eine Behandlung mit Sorafenib abgeschwächt werden könnten. Allerdings weiß man auch, dass Sorafenib wiederrum hepatozelluläre Karzinomzellen in immunsuppressive Phänotypen überführt, die erst durch eine Immun-Checkpoint Blockade wieder rückgängig gemacht werden können[30,31]. Um optimale Bedingungen für einen möglichen Einsatz von Sorafenib zu definieren, müssen solche Wechselwirkungen künftig in präklinischen Modellen detailliert untersucht werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die fehlende Radiosensitivierung HPV-negativer HNSCC durch eine cMET-Hemmung die Tyrosinkinase cMET mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an der Sorafenib-vermittelten Strahlensensitivierung beteiligt ist, obwohl diese durch Sorafenib gehemmt wird. Auch die zuvor beschriebene antiproliferative und zytotoxische Wirkung von Sorafenib auf HPV-negative HNSCC scheint nicht durch eine cMET-Hemmung bedingt zu sein. Somit kann cMET nicht als Biomarker fungieren, um Sorafenib-*responder* zu identifizieren. Trotzdem haben wir mit cMET und EGFR zwei für das HNSCC bedeutende Moleküle als Targets für Sorafenib identifiziert, bedeutend deshalb, weil ihre Überexpression mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert ist und immunsuppressive Eigenschaften begünstigt[32,33]. Daher bleibt zu untersuchen, welche Wechselwirkungen zwischen Immunzellen und cMET existieren und vor allem, wie sich eine Kombination aus cMET-Hemmung und Immun-Checkpoint Blockade in HNSCC auswirkt. Insbesondere eine Kombination von Sorafenib mit Immun-Checkpoint Inhibitoren scheint zumindest in anderen Tumorentitäten wie das hepatozelluläre Karzinom ein vielversprechender Ansatz zu sein[30,31] und sollte auch im HNSCC in zukünftigen Studien getestet werden.

5. Zusammenfassung

In Voruntersuchungen zu meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Multikinase-Inhibitor Sorafenib in HPV-negativen HNSCC eine Radiosensitivierung induzieren kann. Im Rahmen eines *slide-based antibody array* wurde die Rezeptor-Tyrosinkinase cMET als bislang unbekanntes Zielmolekül von Sorafenib identifiziert, so dass die Frage aufkam, ob cMET potentiell die Radiosensitivierung durch

Sorafenib in HPV-negativen HNSCC vermittelt. In meinen Experimenten habe ich mich dieser Fragestellung gewidmet, in dem ich in HPV-negativen HNSCC durch eine Hemmung der Rezeptor-Tyrosinkinase cMET die Auswirkungen in erster Linie auf die Radiosensitivierung, aber auch auf die zelluläre Toxizität sowie Zellproliferation untersucht habe. Dabei habe ich sowohl den hochselektiven, experimentellen Inhibitor SU11274 als auch den nicht-selektiven, klinisch zugelassenen Inhibitor Crizotinib verwendet. Eine Radiosensitivierung konnte dabei mit beiden Inhibitoren nicht erreicht werden. Ein zytotoxischer Effekt war nur geringfügig in zwei Zelllinien nachzuweisen, während die Zellproliferation im submikromolaren Bereich unbeeinträchtigt blieb, trotz effektiver Hemmung der cMET-Autophosphorylierung.
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Hemmung von cMET keine Radiosensitivierung in HPV-negativen HNSCC induzieren kann und die beobachtete, Sorafenib-vermittelte Radionsensitivierung somit nicht durch cMET vermittelt wird.

Summary

Preliminary investigations could demonstrate the radiosensitizing potential of the multikinase inhibitor Sorafenib in HPV-negative HNSCC cells. As part of a slide-based antibody array the receptor tyrosine kinase cMET could be revealed as a new target of Sorafenib. Both findings led to the question, whether cMET is potentially responsible for the radiosensitizing effect of Sorafenib in HPV-negative HNSCC. To answer this question, I have examined the effects of a cMET inhibition in HPV-negative HNSCC primarily on radiosensitization but also on cytotoxicity and cell proliferation. To inhibit cMET I have used two inhibitors. On the one hand the highly selective Inhibitor SU11274, which is clinically not approved. On the other hand, the clinically approved Inhibitor Crizotinib, which is less selective.
Despite of an effective inhibition of cMET autophosphorylation, both inhibitors failed to induce radiosensitization. Cytotoxic effects were only seen in two cell lines and cell proliferation was not affected in the submicromolar range.
These results show that cMET inhibition in HPV-negative HNSCC does not induce radiosensitization and consequently the Sorafenib-mediated radiosensitization is not caused by cMET.

6. Abkürzungsverzeichnis

ALK	*Anaplastic Lymphoma Kinase*
c-KIT	Tyrosinkinase KIT (= Protoonkogen)
cMET	Tyrosinkinase MET (= Protoonkogen), Syn. HGFR
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor*
FDA	*Food and Drug Administration*
HGFR	*Hepatocyte Growth Factor Receptor*, Syn. cMET
HNSCC	*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*
HPV	Humane Papillomaviren
MAPK	*Mitogen-activated protein* (mehrstufige Signaltransduktionswege)
PDGFRß	*Plateled Derived Growth Factor Receptor*
RAF	Familie von Proteinkinasen im MAP-Kinase-Signalweg
RET	Tyrosinkinase RET (= Protoonkogen)
TKI	*Tyrosine Kinase Inhibitor*
UT-SCC	HNSCC-Zelllinie von der Universität Turku (FIN)
VEGFR 1, -2, -3	*Vascular Endothelial Growth Factor receptor 1, -2, -3*

7. Literaturverzeichnis

1. Rüveyda Dok, Sandra Nuyts. HPV positive Head and Neck Cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. Cancers (Basel). 2016 Mar 29;8(4):41. doi: 10.3390/cancers8040041. PMID: 27043631; PMCID: PMC4846850.
2. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer. 2011 Jan;11(1):9-22. doi: 10.1038/nrc2982. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21160525.
3. Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. Cell Death Dis. 2014 Jan 23;5(1):e1018. doi: 10.1038/cddis.2013.548. PMID: 24457962; PMCID: PMC4040714.
4. Laban S, Steinmeister L, Gleißner L, et al. Sorafenib sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to ionizing radiation. Radiother Oncol. 2013 Nov;109(2):286-92. doi: 10.1016/j.radonc.2013.07.003. Epub 2013 Aug 13. PMID: 23953412.
5. Möckelmann N, Rieckmann T, Busch CJ, et al. Effect of sorafenib on cisplatin-based chemoradiation in head and neck cancer cells. Oncotarget. 2016 Apr 26;7(17):23542-51. doi: 10.18632/oncotarget.8275. PMID: 27015558; PMCID: PMC5029646.
6. Beizaei K, Gleißner L, Hoffer K, et al. Receptor tyrosine kinase MET as potential target of multi-kinase inhibitor and radiosensitizer sorafenib in HNSCC. Head Neck. 2019 Jan;41(1):208-215. doi: 10.1002/hed.25440. Epub 2018 Dec 15. PMID: 30552828.
7. Möckelmann N, Kriegs M, Lörincz BB, et al. Molecular targeting in combination with platinum-based chemoradiotherapy in head and neck cancer treatment. Head Neck. 2016 Apr;38 Suppl 1:E2173-81. doi: 10.1002/hed.24031. Epub 2015 Jul 7. PMID: 25783524.
8. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. Nat Rev Drug Discov. 2006 Oct;5(10):835-44. doi: 10.1038/nrd2130. Erratum in: Nat Rev Drug Discov. 2007 Feb;6(2):126. PMID: 17016424.

9. Heravi M, Tomic N, Liang L, et al. Sorafenib in combination with ionizing radiation has a greater anti-tumour activity in a breast cancer model. Anticancer Drugs. 2012 Jun;23(5):525-33. doi: 10.1097/CAD.0b013e32834ea5b3. PMID: 22357220.
10. Dai XF, Ding J, Zhang RG, 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 Sep;89(9):724-31. doi: 10.3109/09553002.2013.791405. Epub 2013 May 31. PMID: 23682582.
11. Gleißner L, Kwiatkowski M, Myllynen L, et al. Analyzing the influence of kinase inhibitors on DNA repair by differential proteomics of chromatin-interacting proteins and nuclear phospho-proteins. Oncotarget. 2017 Nov 10;8(67):110983-110993. doi: 10.18632/oncotarget.22424. PMID: 29340031; PMCID: PMC5762299.
12. Kriegs M, Kasten-Pisula U, Riepen B, et al. Radiosensitization of HNSCC cells by EGFR inhibition depends on the induction of cell cycle arrests. Oncotarget. 2016 Jul 19;7(29):45122-45133. doi: 10.18632/oncotarget.9161. PMID: 27281611; PMCID: PMC5216710.
13. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. Ther Adv Med Oncol. 2011 Nov;3(1 Suppl):S7-S19. doi: 10.1177/1758834011422556. PMID: 22128289; PMCID: PMC3225017.
14. Cui JJ, Tran-Dubé M, Shen H, Nambu M, et al. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). J Med Chem. 2011 Sep 22;54(18):6342-63. doi: 10.1021/jm2007613. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21812414.
15. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. N Engl J Med. 2013 Jun 20;368(25):2385-94. doi: 10.1056/NEJMoa1214886. Epub 2013 Jun 1. Erratum in: N Engl J Med. 2015 Oct 15;373(16):1582. PMID: 23724913.
16. Sattler M, Pride YB, Ma P, et al. A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. Cancer Res. 2003 Sep 1;63(17):5462-9. PMID: 14500382.

17. Yang H, Lee HW, Kim Y, et al. Radiosensitization of brain metastasis by targeting c-MET. Lab Invest. 2013 Mar;93(3):344-53. doi: 10.1038/labinvest.2012.180. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23381625.
18. Li Y, Wang J, Gao X, et al. c-Met targeting enhances the effect of irradiation and chemical agents against malignant colon cells harboring a KRAS mutation. PLoS One. 2014 Nov 26;9(11):e113186. doi: 10.1371/journal.pone.0113186. PMID: 25427200; PMCID: PMC4245100.
19. Lal B, Xia S, Abounader R, et al. Targeting the c-Met pathway potentiates glioblastoma responses to gamma-radiation. Clin Cancer Res. 2005 Jun 15;11(12):4479-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0166. PMID: 15958633.
20. Baschnagel AM, Galoforo S, Thibodeau BJ, et al. Crizotinib Fails to Enhance the Effect of Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Xenografts. Anticancer Res. 2015 Nov;35(11):5973-82. PMID: 26504020.
21. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. Eur J Cancer. 2001 Sep;37 Suppl 4:S9-15. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00231-3. PMID: 11597399.
22. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Dec;11(12):834-48. doi: 10.1038/nrm3012. PMID: 21102609.
23. Baschnagel AM, Williams L, Hanna A, et al. c-Met expression is a marker of poor prognosis in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated with chemoradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2014 Mar 1;88(3):701-7. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.11.013. PMID: 24521684.
24. Hartmann S, Bhola NE, Grandis JR. HGF/Met Signaling in Head and Neck Cancer: Impact on the Tumor Microenvironment. Clin Cancer Res. 2016 Aug 15;22(16):4005-13. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0951. Epub 2016 Jul 1. PMID: 27370607; PMCID: PMC6820346.
25. Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. Cancer Res. 2002 Dec 15;62(24):7350-6. PMID: 12499279.
26. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. J Clin Oncol. 2007 Sep 10;25(26):4057-65. doi: 10.1200/JCO.2007.11.8984. PMID: 17827454.

27. Williamson SK, Moon J, Huang CH, 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 Jul 10;28(20):3330-5. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6834. Epub 2010 May 24. PMID: 20498388; PMCID: PMC2903329.
28. Elser C, Siu LL, Winquist E, 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 Aug 20;25(24):3766-73. doi: 10.1200/JCO.2006.10.2871. PMID: 17704426.
29. Gilbert J, Schell MJ, Zhao X, et al. A randomized phase II efficacy and correlative studies of cetuximab with or without sorafenib in recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2015 Apr;51(4):376-82. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.12.011. Epub 2015 Jan 13. PMID: 25593015; PMCID: PMC4459134.
30. Chen Y, Duda DG. Targeting immunosuppression after standard sorafenib treatment to facilitate immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma - an auto-commentary on clinical potential and future development. Oncoimmunology. 2015 May 27;4(10):e1029703. doi: 10.1080/2162402X.2015.1029703. PMID: 26451297; PMCID: PMC4589048.
31. Chen Y, Ramjiawan RR, Reiberger T, et al. CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice. Hepatology. 2015 May;61(5):1591-602. doi: 10.1002/hep.27665. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25529917; PMCID: PMC4406806.
32. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. Cancer Discov. 2013 Dec;3(12):1355-63. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0310. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24078774; PMCID: PMC3864135.
33. Balan M, Mier y Teran E, Waaga-Gasser AM, et al. Novel roles of c-Met in the survival of renal cancer cells through the regulation of HO-1 and PD-L1 expression. J Biol Chem. 2015 Mar 27;290(13):8110-20. doi: 10.1074/jbc.M114.612689. Epub 2015 Feb 2. PMID: 25645920; PMCID: PMC4375468.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn **PD Dr. Malte Kriegs**, der mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn **Konstantin Hoffer**, der mich mit Geduld insbesondere bei den technischen Abläufen der Experimente unterstütze, aber auch das restliche Laborteam, das Fragen meinerseits nie scheute und immer Hilfe anbot, wo es nötig war. Nicht zu vergessen Frau **Dr. Lisa Beckert** (ehem. Gleißner), die mir durch ihre Vorexperimente und Ergebnisse erst den Weg zu meiner Dissertation ebnete. Letzlich gilt mein Dank meinem Doktorvater und Laborleiter Herrn **Prof. Dr. Kai Rothkamm** für die Überlassung des Themas.

9. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

10. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Die Abfassung der Publikation erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer PD Dr. Malte Kriegs. Sämtliche Experimente, die sich im Rahmen der Publikation mit der cMET-Expression und –Phosphorylierung sowie mit den Auswirkungen der cMET-Inhibition mit den Inhibitoren Crizotinib und SU11274 beschäftigen, wurden von mir persönlich durchgeführt und ausgewertet. Bezüglich der cMET-Expression und –Phosphorylierung sind dies im Detail die Western-Blot Untersuchungen. Bezüglich der Auswirkungen einer cMET-Inhibition sind dies die Proliferationstests sowie die Kolonietests zur Untersuchung der Zytotoxizität und Strahlensensitivität. Alle weiteren Daten dieser Publikation, die sich mit der cMET-Inhibition durch Sorafenib beschäftigen, basieren auf Voruntersuchungen, die von den Co-Autoren durchgeführt wurden. Die Graphiken, die auf den von mir durchgeführten Experimenten basieren, wurden in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer PD. Dr. Malte Kriegs erstellt.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....