

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer und Plastische Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

**Einfluss von Autophagie-modulierenden Wirkstoffen auf die Proliferation
von oralen Tumorzelllinien**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

René Sampers

aus Meerbusch

Würzburg, November 2022

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Müller

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2023

Der Promovend ist Zahnarzt.

meinen Großeltern Ursula und Peter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Karzinogenese	1
1.2 Grundlagen der Autophagie	2
1.2.1 Molekularer Mechanismus der Autophagie	3
1.2.1.1 Initiation	4
1.2.1.2 Nukleation	6
1.2.1.3 Expansion der Isolationsmembran	7
1.2.1.4 Fusion von Autophagosom und Lysosom	9
1.2.2 Autophagie bei Tumorerkrankungen	11
1.2.3 Autophagie in HNSCC	13
1.3 Autophagie in der Tumorthherapie	14
1.3.1 Autophagieinhibition	16
1.3.1.1 Chloroquin und Hydroxychloroquin	16
1.3.1.2 Bafilomycin A1	18
1.3.2 Autophagieinduktion	18
1.3.2.1 Rapamycin	19
1.3.2.2 Methioninrestriktion	20
1.4 Karzinome der Mundhöhle und des Rachens	21
1.5 Ziel der Arbeit	25
2. Material & Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Zellkulturmedien	28
2.1.4 Reagenzien	29
2.1.5 Puffer & Lösungen	30
2.1.6 Software	31
2.2 Methoden	31
2.2.1 Zelllinien und Zellkultur	31
2.2.2 Zytotoxizitätsassay	32

2.2.2.1	Datenanalyse	33
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
3.	Ergebnisse	37
3.1	Analyse der IC ₁₀ von Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin.....	37
3.2	Analyse der Responsivität auf FasL, TNF α und Cisplatin	42
3.3	Kombinationstherapie von FasL, TNF α und Cisplatin mit Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin.....	46
3.4	Analyse des Einflusses der Methioninrestriktion auf die FasL- Sensitivität.....	59
3.5	Analyse der TNF α -Sensitivität nach Kostimulation mit Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin unter Methioninrestriktion.....	60
3.6	Analyse der IL-8 Expression	63
3.7	Analyse der Autophagiemodulation auf Proteinebene	67
4.	Diskussion	69
4.1	Bewertung der Autophagieinhibition in HNSCC	73
4.2	Bewertung der Autophagieinduktion in HNSCC	76
4.3	Resümee und Ausblick	79
5.	Zusammenfassung.....	82
6.	Literaturverzeichnis.....	83
I.	Abkürzungsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	
III.	Tabellenverzeichnis.....	
IV.	Danksagung	
V.	Veröffentlichungen.....	

1. Einleitung

1.1 Karzinogenese

Die heutzutage am weitesten verbreitete Theorie zur Entstehung von Tumorerkrankungen, die somatische Mutationstheorie (SMT), geht vor allem auf die Forschung von Theodor Boveri zurück, der in seinem 1914 erschienenen Werk Chromosomendefekte als Ursache für die Entartung gesunder Körperzellen hin zur malignen Tumorzelle annahm (1). Erst 1960 lieferten Nowell und Hungerford experimentelle Daten zur Bedeutung des Philadelphia-Chromosoms bei der Entstehung von chronisch myeloischer Leukämie (2), die Boveri's Theorie stützten und letztlich zum heute gängigen Verständnis von Krebs, dessen Ursache in der genetischen Störung des Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Apoptose einer Körperzelle liegt, beigetragen haben.

In der Übersichtsarbeit „hallmarks of cancer“ von Douglas Hannahan und Robert A. Weinberg sind die notwendigen und grundlegenden Merkmale einer zur Tumorzelle entarteten gesunden Körperzelle unabhängig von der Tumorentität definiert (3). Sie postulieren, dass Tumorzellen eine Manifestation sechs essenzieller Veränderungen in der Zellphysiologie sind:

1. Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
2. Unabhängigkeit von wachstumshemmenden Faktoren
3. Umgehung der Apoptose
4. unbegrenztes, replikatives Potenzial
5. Fähigkeit zur Angiogenese
6. Fähigkeit zur Metastasierung

In einer weiteren Publikation (4) führten sie die Bedeutung der Rekrutierung gesunder Stromazellen durch Tumorzellen zur Bildung einer für sie vorteilhaften Tumormikroumgebung für Wachstum und Malignität aus. So ist nicht nur die Entwicklung einer Genominstabilität ein wichtiges Charakteristikum für die Tumorentstehung, sondern auch der Inflammationsstatus der prämaligen Zelle. Zusätzlich erlangen Tumorzellen die Fähigkeit, sich der Immunantwort des Körpers zu

entziehen. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Inflammation als auch bei der Entstehung, Angiogenese und Proliferation von Tumoren. Auch die Infiltration von Immunzellen durch die Bildung bestimmter Faktoren führt paradoxerweise zu einer Progression des Tumorwachstums (5).

1.2 Grundlagen der Autophagie

Der Begriff Autophagie stammt von dem altgriechischen Wort *autóphagos* ab und bedeutet so viel wie „sich selbst verzehrend“. Er bezeichnet einen in allen eukaryotischen Zellen, von einzelligen Hefen bis hin zu Säugetieren vorkommenden, evolutionär konservierten Zellprozess, der zytoplasmatische Zellkomponenten in Doppelmembran-Vesikel verpackt und zu den Lysosomen transportiert (6). Dort werden die Makromoleküle durch lysosomale Proteasen, Nukleasen und Lipasen hydrolysiert und abgebaut (7).

Christian De Duve prägte den Begriff Autophagie erstmals im Jahre 1963, um das Vorhandensein von Einfach- und Doppelmembran-Vesikeln, den Autophagosomen, in unterschiedlichen Stadien des lysosomalen Abbaus verschiedener zellulärer Bestandteile zu beschreiben (8). Zunächst erschien es kontrovers, dass die Zelle ihre eigenen Komponenten selbstverdaut und man vermutete, dass die Autophagie eine Art Recyclingmechanismus der Zelle darstellt. Aus heutiger Sicht ist die Autophagie ein Recyclingprozess, der nicht nur dem Abbau fehlgefalteter Proteine oder geschädigter Zellorganellen dient, sondern auch als Energie- und Nährstofflieferant, wie beispielsweise in Phasen der Vorbereitung der Zellteilung oder des Nährstoffmangels (9). Sie nimmt auch eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr gegen intrazelluläre Mikroben ein (10) bzw. ist wesentlicher Bestandteil von verschiedenen Krankheiten wie zum Beispiel Krebs- (11) oder neurodegenerativen Erkrankungen (12). Auch als Teil der Immunantwort, in der Entwicklung und dem Altern ist sie von großer Bedeutung (13). Grundlage dieser vielfältigen Funktionen ist ein komplexer Mechanismus, der intrazellulär abläuft und für den unterschiedliche extrazelluläre Signale, Regulatorproteine und Organellen von Bedeutung sind.

1.2.1 Molekularer Mechanismus der Autophagie

Bei der sog. Makroautophagie bildet sich um unselektive, zytoplasmatische Komponenten das Autophagosom, ein Doppelmembran-Vesikel. Durch die Fusion der äußeren Membran des Autophagosoms mit einem Lysosom entsteht ein Autophagolysosom. Zur Degradation der Moleküle wird die innere Membran des ehemaligen Autophagosoms lysiert und der Inhalt von den Enzymen des Lysosoms hydrolysiert. Neben der Makroautophagie existieren noch zwei weitere Formen, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie. Da die Makroautophagie jedoch bei weitem den dominierenden Prozess darstellt, wird sie oft vereinfacht als Autophagie bezeichnet. Sie leistet neben der proteasomalen Degradation den größten Beitrag zum Abbau von biologischen Makromolekülen und Organellen (14,15) Der Ablauf lässt sich grundsätzlich in die vier Phasen Initiation, Nukleation, Expansion und Fusion einteilen. Für die Initiation der Bildung des Autophagosoms sind unterschiedliche Proteine und Enzymkomplexe notwendig.

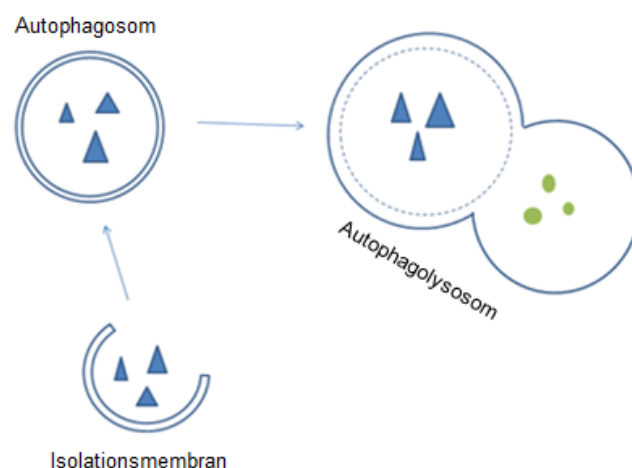


Abbildung 1: schematische Darstellung der Bildung eines Autophagolysosoms.

1.2.1.1 Initiation

Die Autophagie wird als frühe zelluläre Antwort auf Nährstoffmangel, Hypoxie oder der reduzierten Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren zur Anpassung des Zellmetabolismus aktiviert, um die verfügbaren Energieressourcen optimal zu nutzen (16). Unter den vielen unterschiedlichen Enzymen und Signalwegen, die eine Rolle bei der Regulation von Autophagie und Wachstum spielen, nimmt das Enzym *mTOR* (mechanistic target of Rapamycin) eine Schlüsselrolle ein (17), da es in Abhängigkeit der zellulären, physiologischen Bedingungen die Balance zwischen anabolem und katabolem Metabolismus koordiniert. *mTOR* ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die zur Enzymfamilie der PIKKs (Phosphatidylinositol-3-kinase-related-kinases) gehört. Die Aktivität von *mTOR* ist unter Bedingungen des Nährstoffmangels inhibiert, was sich schon früh als ein entscheidender Schritt für die Initiation der Autophagie in Eukaryoten herausgestellt hat (18). Für die Vermittlung der Downstream-Effekte von *mTOR* spielen die *autophagy related gene proteins* (Atg-Proteine) die womöglich größte Rolle, denn sie regulieren sowohl die Initiation als auch die Elongation der Doppelmembran und somit die Bildung des Autophagosoms (19). Sie vermitteln ihre unterschiedlichen, komplexen Funktionen in verschiedenen Proteinkomplexen (s. Abb. 2).

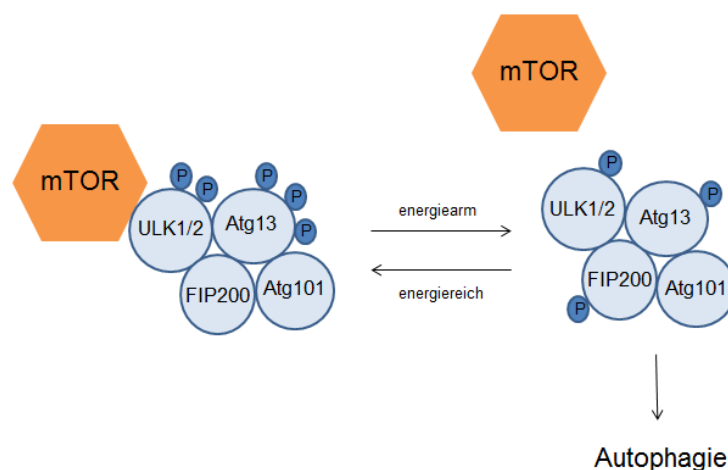


Abbildung 2: mTOR-abhängige Aktivierung des Initiationskomplexes. Unter energiereichen Bedingungen führt die mTOR-abhängige Phosphorylierung von Bestandteilen des Initiationskomplexes zur Herunterregulierung der Autophagie. Unter bestimmten Bedingungen wie Nährstoffmangel oder hypoxischem Stress dissoziiert mTOR von dem Initiationskomplex und induziert so die Autophagie.

Unter energiereichen Bedingungen liegt mTOR an einen Kinasekomplex gebunden vor, der von unterschiedlichen Atg-Proteinen (u.a. ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101-Kinase-Komplex) gebildet wird. mTOR inaktiviert dabei den Kinasekomplex durch die Phosphorylierung von ULK1/2 und Atg13. Kommt es nun beispielsweise zu einem Nährstoffmangel, dissoziiert mTOR von dem Kinasekomplex und ULK1/2 und Atg13 werden durch Phosphatasen dephosphoryliert. ULK1/2 kann nun FIP200 phosphorylieren und erlaubt es dem so aktivierten Komplex den weiteren Mechanismus der Autophagie in Gang zu setzen (20). Zusätzlich zu mTOR wird der Initiationskomplex von verschiedenen weiteren Enzymen reguliert, wie zum Beispiel der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) (21) oder der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) (22,23). Der genaue Ort der Doppelmembranbildung ist bisher nicht endgültig geklärt, die meisten Studien deuten allerdings auf das endoplasmatische Retikulum als Bildungsort hin (24,25).

Die Rekrutierung des ULK1/2-Komplexes an den Bildungsort der Autophagosomenmembran am endoplasmatischen Retikulum allein ist allerdings nicht ausreichend für die Initiation und der darauffolgenden Nukleation der Autophagie, sondern weitere Proteinkomplexe spielen eine wichtige Rolle.

1.2.1.2 Nukleation

Ein wichtiger Faktor für die Rekrutierung weiterer Proteinkomplexe ist die Bildung des second messengers Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP3) an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (s. Abb. 3).

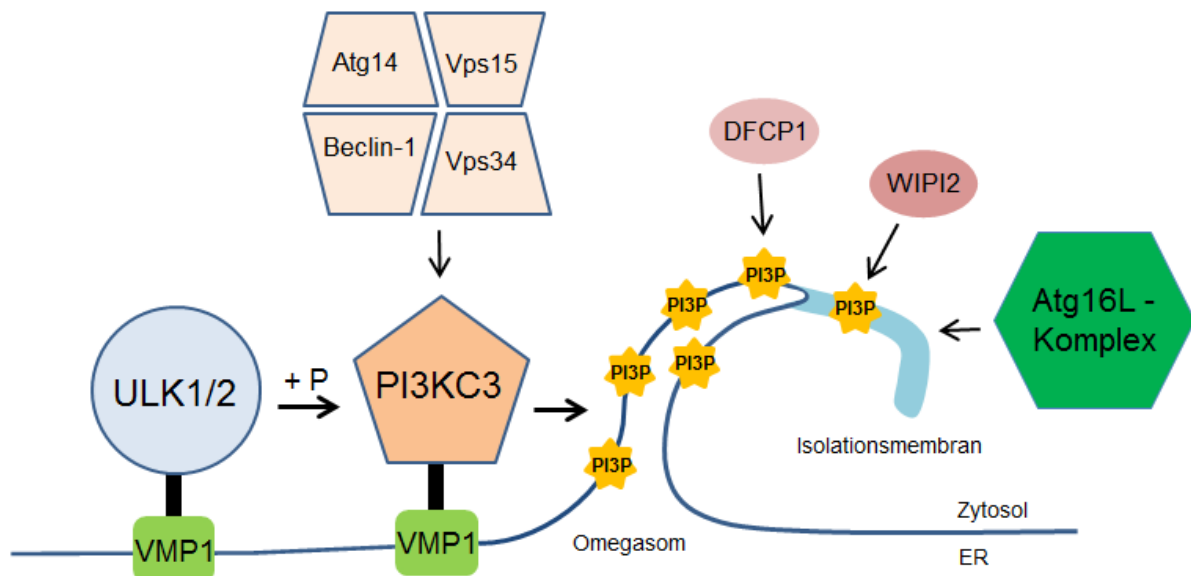


Abbildung 3: Bildung der Isolationsmembran. Die Bildung von PI3P durch den Kinasekomplex PI3KC3 an der Membran des endoplasmatischen Retikulums führt zur Rekrutierung PI3P-bindender Proteine, die den Startpunkt der Bildung der Isolationsmembran markieren.

Der Kinasekomplex PI3KC3 (class-III-phosphatidylinositol-3-phosphate-kinase) generiert die Bildung von PI3P und sorgt so für die Rekrutierung von PI3P-bindenden Proteinen an den Bildungsort der Doppelmembran, dem *Omegasom*. Wichtige Beispiele hierfür sind WIPIs (WD-repeat protein-interacting phosphoinositide), DFCP1 (Double-FYVE-containing protein 1) und der ebenfalls essenzielle Ubiquitin-ähnliche Atg12-Atg5-Atg16L1 Komplex (26). Der katalytisch aktive Teil der PI3KC3 ist die Lipidkinase Vps34, die dort an die Proteine Beclin-1 und Vps15 gebunden vorliegt und zwei unterschiedliche Komplexe bilden kann (27). Komplex I beinhaltet die Autophagie-spezifische Untereinheit Atg14 (28), der für die Generierung des PI3P-reichen Milieus verantwortlich ist. Komplex II liegt mit dem Protein UVRAG assoziiert vor und spielt erst bei der Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom eine Rolle (siehe unten) (29). Reguliert wird die Aktivität des Komplex I durch die Phosphorylierung von Beclin-1 an Ser14. Dafür verantwortlich ist der Initiationskomplex ULK1/2, der durch Atg14 an den Komplex bindet und nach der

Phosphorylierung von Beclin-1 die Bildung von PI3P durch die Vps34-Kinase induziert (30). Die Bedeutung von Beclin-1 für die Aktivierung der Kinasefunktion von Vps34 basiert vor allem auf der Beobachtung, dass die Bindung von Beclin-1 an das anti-apoptotische Protein Beclin-2 unter energiearmen Bedingungen schwächer wird und somit mehr Beclin-1 für die Komplexbildung zur Verfügung steht. Es zeigte sich, dass bei Mutationen von Beclin-1, die eine mangelhafte Bindung an Beclin-2 zur Folge haben, die Autophagie vermehrt abläuft (31).

ULK1/2 und PI3KC3 binden an eine gekrümmte Stelle der Membran des endoplasmatischen Retikulums über das Transmembranprotein VMP1 (26) und sind essenziell für den Ablauf der Autophagie (32). An dieser omega-förmigen Subdomäne des endoplasmatischen Retikulums, dem bereits erwähnten Omegasom, startet die Rekrutierung von Membrananteilen zur Bildung der *Isolationsmembran*, aus der sich während des Elongationsprozesses die Autophagosomenmembran bildet. Omegasomen wurden als Bereiche des endoplasmatischen Retikulums identifiziert, die durch das PI3P-bindende Protein DFPC1 gekennzeichnet sind und die Anwesenheit von PI3KC3 voraussetzt (33). DFPC1-positive Omegasomen erscheinen an Kontaktstellen der Membran des endoplasmatischen Retikulums mit der Mitochondrienmembran (34), die eine Quelle für Bestandteile der Autophagosomenmembran darstellt (35).

1.2.1.3 Expansion der Isolationsmembran

Die Expansion der Isolationsmembran wird vor allem durch zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme moduliert, dem Atg12-Atg5-Atg16L-Konjugationssystem (Atg16L-Komplex) und dem LC3-Konjugationssystem (s. Abb. 4).

Atg12 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das mit Atg5 ein Konjugat bildet. Atg16L bindet an dieses Konjugat und bildet den Atg16L-Komplex, welcher die Konjugation von LC3 mit Phosphatidylethanolamin (PE) ermöglicht (36). Der Atg16L-Komplex wird unter anderem durch das PI3P-bindende Protein WIPI2 an den Ort der Membranbildung rekrutiert (37). Beobachtungen von Polson et al. lassen vermuten, dass die genaue Lokalisation der PI3P-bindenden Proteine DFPC1 und WIPI2 unterschiedlich ist. Während DFPC1 am Omegasom lokalisiert ist, findet man WIPI2

vor allem auf der sich am Omegasom bildenden Isolationsmembran, was eine besondere Bedeutung des Atg16L-Komplexes für dessen Expansion vermuten lässt (38). Während der Atg16L-Komplex spezifisch auf der äußeren Seite der Membran lokalisiert ist, kommt das LC3-PE-Konjugat sowohl auf der äußeren, als auch auf der inneren Seite der Membran vor und dient als spezifischer Marker für die qualitative und quantitative Analyse von Membranstrukturen während der Autophagie (39). Das Ubiquitin-ähnliche Protein LC3 gehört zur Familie der Atg8-Proteine und liegt im Zytosol gelöst vor (LC3-I). LC3-I wird durch eine Ubiquitin-ähnliche Reaktion mit Hilfe der Enzyme Atg7, Atg3 und dem Atg16L-Komplex kovalent an das Lipid PE gebunden. Die lipidierte Form LC3-II scheint für die Expansion der Isolationsmembran und den Abschluss der Autophagosomen-Membranbildung von Relevanz zu sein (40,41). Die exakte Funktion in der Autophagie ist allerdings noch nicht endgültig geklärt, denn neben seiner Funktion bei der Membranbildung fungiert LC3 auch als Rezeptor auf der Autophagosomenmembran, der für die selektive Inkorporation von Proteinen, die der autophagischen Degradation zugeführt werden sollen, verantwortlich ist (42). Nach Abschluss der Autophagosomenbildung erfolgt die Fusion mit Lysosomen und späten Endosomen zum Autophagolysosom.

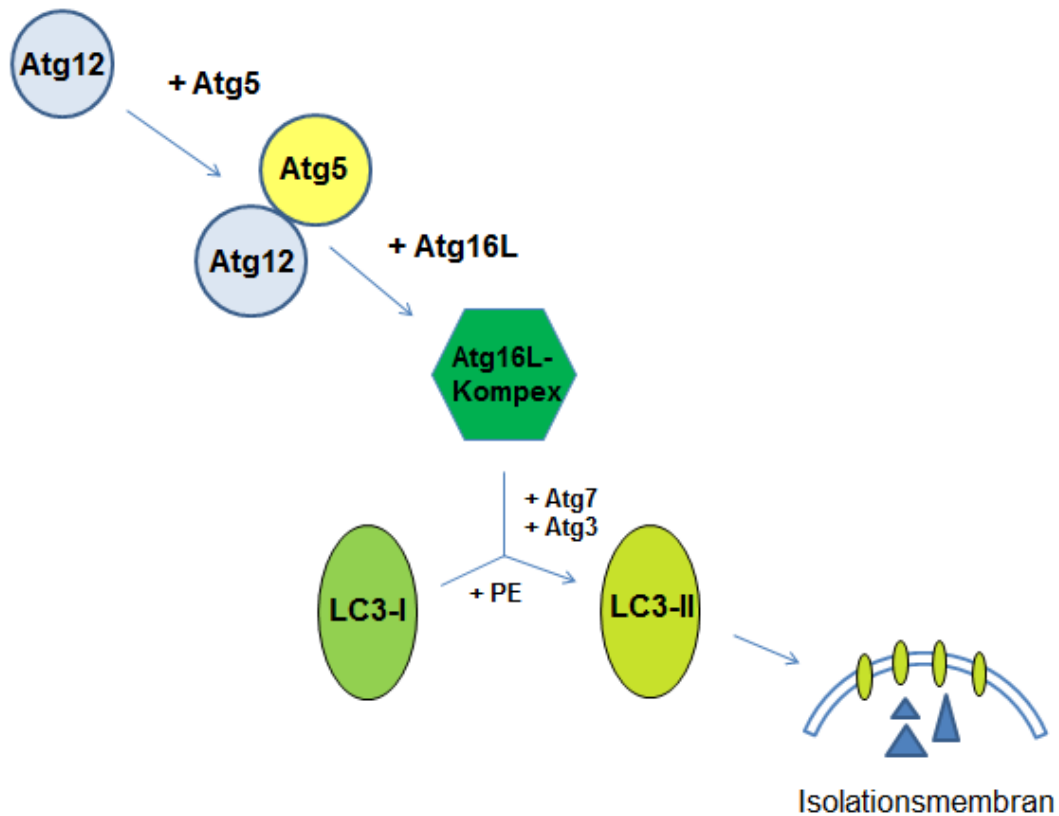


Abbildung 4: LC3- und Atg16L-Konjugationssystem. Zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme vermitteln den Einbau von LC3-II in die expandierende Isolationsmembran.

1.2.1.4 Fusion von Autophagosom und Lysosom

Für die Fusion eines Autophagosoms mit einem Lysosom ist das Zytoskelett und vor allem das Mikrotubulussystem essenziell (43). Späte Endosomen und Lysosomen finden sich vorwiegend in der perinukleären Region, während Autophagosomen überall im Zytoplasma vorliegen können (44). Für die Fusion der beiden Zellkompartimente ist der koordinierte Transport entlang des Mikrotubulussystems notwendig. Entsprechende Beobachtungen zeigen, dass reife Autophagosomen mit Hilfe von Dynein-Dynaktin-Motorkomplexen am Mikrotubulus entlang in Richtung Minus-Ende in die perinukleäre Region zu den Lysosomen transportiert werden (45). Es ist allerdings schwierig zwischen dem reinen Transport entlang der Mikrotubuli und dem eigentlichen Fusionsprozess zu unterscheiden, denn beide Prozesse scheinen fast zeitgleich abzulaufen. Die heutige Vorstellung dieses Mechanismus beruht dabei vor allem auf dem generellen Verständnis von intrazellulärem Membrantransport, insbesondere im Hinblick auf drei unterschiedliche Proteinfamilien: Rab GTPasen, membranbindende Komplexe und SNAP-Rezeptoren (SNARE = soluble N-

ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) (46-48). Rab-Proteine rekrutieren membranbindende Komplexe, die als Brücke zwischen den zu fusionierenden Kompartimenten fungieren und die SNARE-Proteine bei ihrer Funktion unterstützen, die Fusion sich gegenüberliegender Doppelmembranen zu induzieren (s. Abb. 5).

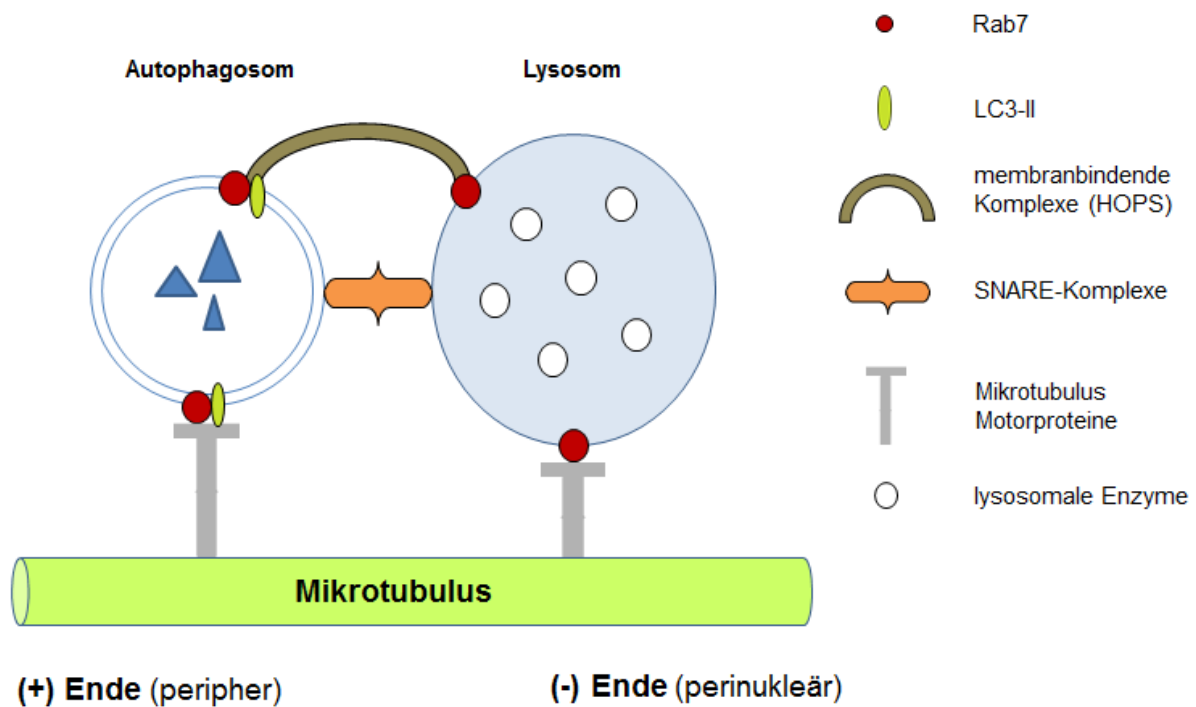


Abbildung 5: Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom. Die Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom wird durch die Interaktion unterschiedlicher Proteine vermittelt. Die Abbildung zeigt schematisch die für die Fusion wichtigsten Proteine und Proteinkomplexe.

Verankert werden beide Zellorganellen am Mikrotubulus über die kleine GTPase Rab7, die nicht nur dem Transport dient, sondern auch wie oben beschrieben für die Fusion beider Zellorganellen wichtig ist (49). Autophagosomen rekrutieren während ihrer Reifung Rab7 auf bisher noch unbekannte Weise und sind so in der Lage, mit anderen Rab7-positiven Organellen, wie den späten Endosomen oder Lysosomen, zu fusionieren (50). Reguliert wird die GTPase-Aktivität von Rab7 unter anderem durch den Komplex II der PI3KC3 mit seiner Untereinheit UVRAG (51), die an das Protein Vps16 bindet, einer Untereinheit des HOPS-Komplexes (homotypic fusion and protein sorting complex). HOPS-Komplexe sind membranbindende Komplexe, die mit dem SNARE-Protein STX17 interagieren und die Fusion von Autophagosom und Lysosom

fördern (52). Ein Mangel an HOPS-Komplexen und STX17 führt zur Akkumulation von Autophagosomen und damit Hemmung der Autophagie, was deren enorme Bedeutung für den Ablauf der Autophagie unterstreicht (53).

Nach der Fusion der äußeren Membran des Autophagosoms mit dem Lysosom wird die innere Membran mit Hilfe der Atg15-Lipase lysiert (54) und der Inhalt des Autophagosoms durch unterschiedliche lysosomale Enzyme abgebaut. Die abgebauten Bestandteile werden nun zurück in das Zytosol mittels einer Membranpermease (enthält Atg22) transportiert, wo sie beispielsweise als Energiequelle dienen (55).

1.2.2 Autophagie bei Tumorerkrankungen

Die Autophagie wurde schon früh mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht und zunächst als reiner Tumorsuppressor angesehen. Diese Annahme stützte sich auf erste Studien, in denen der monoallele Verlust von BECN1 (Beclin-1) zu einer hohen Inzidenz spontan auftretender Tumore bei Beclin-1^{+/-}-Mäusen führt (56) und auch bei einigen Arten von humanen Mamma-, Ovarial- und Prostatatumoren gefunden wurde (57,58). Diese Ergebnisse gingen mit anderen Beobachtungen einher, bei denen eine Überexpression von Beclin-1 das Tumorstadium in humanen Brustkrebs-Zelllinien unterdrückt (11). Widersprüchliche Ergebnisse lieferten Daten aus der Genomanalyse unterschiedlicher Tumorentitäten, die zeigten, dass eine BECN1-Mutation nur bei Mamma- und Ovarialkarzinomen und gleichzeitig auftretender Mutation im BRCA1-Gen auftrat. In anderen Tumorentitäten fand man keine Hinweise für eine wiederkehrende BECN1-Mutation (59). Als mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse wird die direkte Nachbarschaft von BECN1 und BRCA1 auf dem Chromosom 17 angeführt (57). So sei eine Mutation im BECN1-Gen eine Begleiterscheinung bei Mutationen im BRCA1-Gen, die oftmals größere Genabschnitte mit betreffen. Diese beteiligten Mutationen anderer Genabschnitte können jedoch nicht als ursächlich für die Tumorbildung angesehen werden. In GEMMs (genetically engineered mouse models) für hereditäre Mammakarzinome förderte der Verlust von BECN1 die Aktivierung von p53, was zu einer verminderten Tumorbildung führte und damit genau entgegen der bisherigen Vermutung von BECN1 als reinem Tumorsuppressor spricht (60). Diese zunächst paradoxen Beobachtungen

zeigten sich auch bei der Entwicklung benigner Hepatoma in genetisch veränderten Mäusen mit einem allelen Verlust der Autophagie-spezifischen Gene ATG5 und ATG7. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Autophagie in der Leber einer Tumorentstehung entgegenwirkt und gleichzeitig für die Progression von benignen zu malignen Tumoren von Bedeutung ist (61), also eine Funktion beim Wachstum solider Tumore innehat. Bei *Atg7^{-/-}*-Mäusen führt der Mangel an Autophagie zu erhöhtem oxidativem Stress, der bei *Braf^{V600E}* - Lungentumoren durch die Aktivierung von NRF2 das Tumorstadium stimuliert. In späteren Stadien des Tumorstadiums führt dies aber zu einem verlangsamten Wachstum und einer verringerten Konversion benignen in maligne Tumore (62). Dass die Autophagie für das Tumorstadium essenziell zu sein scheint, deckt sich mit der Beobachtung, dass die basal ablaufende Autophagie in hypoxischen Tumorstadien hochreguliert ist (63). Auch in RAS-abhängigen Tumoren findet man eine hochregulierte Autophagie, die das Wachstum, das Überleben und die Metastasierung fördert und eine Abhängigkeit des wachsenden Tumors von der Autophagie vermuten lässt (64-66). In humanen Melanomen mit aktiver BRAF-Mutation und einer Resistenz gegenüber BRAF-Inhibition wurde ein hohes Level basal ablaufender Autophagie entdeckt, was mit einem aggressiveren Verlauf einhergeht und vermuten lässt, dass die Autophagie womöglich bei der Resistenzentwicklung eine Rolle spielt (67). Durch kombinierte BRAF- und Autophagie-Inhibition konnte die Resistenz überwunden, der Zelltod induziert und die Tumorstadiumregression gefördert werden (68).

Der Einfluss verschiedener therapeutischer Maßnahmen der Krebstherapie auf die Autophagie und ihre mögliche Rolle bei der Resistenzentwicklung wurde bereits in einigen Studien untersucht und zeigen das therapeutische Potenzial der Autophagie-Inhibition als adjuvante, therapeutische Maßnahme (69-71). Die Invasion von Tumorzellen in das benachbarte Gewebe und die Metastasierung in andere Organe ist ein wichtiges Merkmal für die Aggressivität eines Tumors. Dies hat enormen Einfluss auf die Prognose des Patienten. Die Autophagie scheint an der Invasion, Migration und Metastasierung durch die Reduzierung fokaler Adhäsionskontakte direkt beteiligt zu sein (72,73).

Der tumorsuppressive Effekt der Autophagie lässt sich durch die Versuche mit GEMMs auf verschiedene Effekte zurückführen. Die Autophagie verhindert oxidativen Stress in den Zellen, aktiviert die DNA-Schadensantwort, mindert chronischen Gewebeschaden

und Inflammation und verhindert die Akkumulation von p62, einem Regulatorprotein in der Autophagie, das bei der Karzinogenese beteiligt sein soll (74). Die genannten Ereignisse sind bekannte Ursachen für genomische Instabilität und fördern das Tumorwachstum (75-77). Ob dieser Mechanismus der Initiation der Tumorbildung durch eine genetisch bedingt vermindert ablaufende Autophagie auch beim Menschen eine Rolle spielt, muss in Zukunft weiter untersucht werden. Wahrscheinlicher ist, dass diese Mechanismen beim Menschen indirekt, durch beispielsweise die Aktivierung von mTOR und damit Inhibition der Autophagie, auf die Karzinogenese Einfluss nehmen (78).

Die genaue Funktion der Autophagie bei der Tumorentstehung und –progression ist komplex und hängt von unterschiedlichen Faktoren, wie der Phase des Tumorwachstums, dem Gewebe oder eventuellen Mutationen in Autophagie-spezifischen Genen, ab. Sie kann sowohl der Tumorentstehung entgegenwirken als auch das Wachstum solider Tumore fördern und zu Resistenzen beitragen. Eine zukünftige Evaluation der genauen Funktion in einzelnen Tumorentitäten ist daher von zentraler Bedeutung.

1.2.3 Autophagie in HNSCC

Tumore des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) sind heterogene Tumore mit unterschiedlichen, aber auch immer wieder auftretenden genetischen Mutationen (79), wovon einige Auswirkungen auf Signalwege haben, die für die Autophagie relevant sind (80). Beispielsweise ist das PI3KCA-Gen in HNSCC häufig mutiert, das über die Aktivierung von PI3K und nachgeordneten Effektoren wie mTOR Einfluss auf die Autophagie ausübt. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) wird durch eine Mutation im entsprechenden Gen in HNSCC häufig vermehrt exprimiert (81) und moduliert als vorgeschalteter Regulator den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (82,83). In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (NSCLC) fördert die erhöhte Expression von EGFR das Tumorwachstum und Resistenzen gegenüber Chemotherapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren unter anderem durch seine Wirkung auf Beclin-1 und damit verbundener geringerer Vps34 Aktivität (83). Ein häufig klinisch eingesetzter EGFR-Inhibitor ist Cetuximab, der in Kombination mit anderen Therapieoptionen zu einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit HNSCC führt

(84,85). Cetuximab führt in vitro zu einer Induktion der Autophagie. Dies dient der Zelle als Schutzmechanismus, um der durch Cetuximab induzierten Apoptose zu entgehen. Gleichzeitige Inhibition der Autophagie durch den Autophagie-Inhibitor Chloroquin (Chloroquin, siehe unten) verstärkt den apoptoseinduzierenden Effekt von Cetuximab (86) und verdeutlicht das therapeutische Potenzial einer Autophagiemodulation. Immunohistochemische Studien mit OSCC (oral squamous cell carcinoma) zeigten erhöhte Level an zytoplasmatischem p62, was auf eine beeinträchtigte Autophagie schließen lässt und mit einer schlechten Prognose sowie reduziertem Gesamtüberleben einherging (87,88). Interessanterweise fand man in derselben Studie ebenfalls erhöhte Level an LC3-II bei Patienten mit schlechter Prognose, was auf ein erhöhtes Level basal ablaufender Autophagie in fortgeschrittenen Wachstumsstadien hindeutet. Dies unterstreicht die bereits beschriebenen paradoxen Eigenschaften der Autophagie abhängig von der Phase des Tumorwachstums. Eine andere Forschungsgruppe konnte aufzeigen, dass die Expression von Beclin-1 und LC3 in TSCC (tongue squamous cell carcinoma) herunterreguliert ist und mit hohen Tumorstadien und schlechter Prognose korreliert (89). Auch eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) kann zur Entwicklung eines HNSCC führen. Zudem wird die Autophagie beeinflusst, da mindestens ein Subtyp des Virus (HPV 16) die Autophagie in der infizierten Zelle inhibiert und somit eine Tumorentstehung begünstigen kann (90,91).

1.3 Autophagie in der Tumorthherapie

Weil die Autophagie bei Tumorerkrankungen sowohl für die Entstehung als auch für die Progression von großer Bedeutung ist, macht es sie zu einem attraktiven Ziel in der Tumorthherapie. Da die Autophagie jedoch unterschiedlichen Einfluss nimmt, je nach Tumorentität, -stadium und Differenzierung, stellt sich in der Forschung die zentrale Frage, ob man die Autophagie therapeutisch verstärken oder inhibieren soll. Bei prämaligen Läsionen existieren einige Hinweise, die darauf hindeuten, dass eine Verstärkung der Autophagie einer Tumorentstehung entgegenwirken könnte, da sie die Akkumulation genomischer Defekte verhindert (92). Im Gegensatz dazu scheint sowohl die Verstärkung als auch die Inhibition eine mögliche therapeutische Strategie bei der Behandlung solider Tumore zu sein (93,94). Der Großteil der aktuellen

klinischen Studien (über 80%) untersucht allerdings den Einfluss der Autophagieinhibition auf das klinische Ergebnis der Patienten. Das ergab eine Suche nach den Begriffen „autophagy“ und „cancer“ auf *clinicaltrials.gov* im Dezember 2020 (s. Abb. 6).

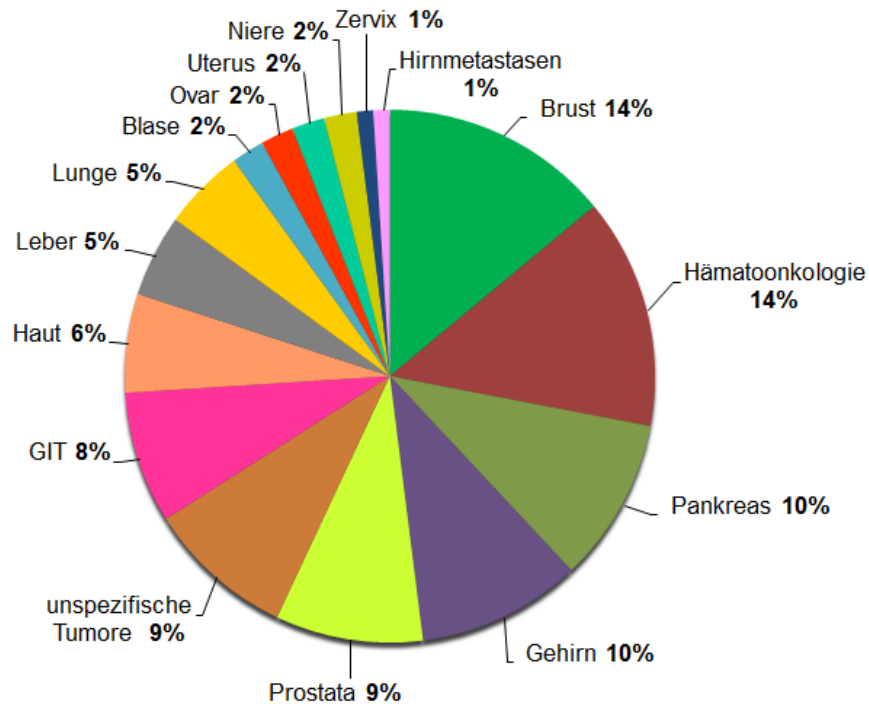


Abbildung 6: aktuelle klinische Studien zur Beeinflussung der Autophagie in der Therapie unterschiedlicher Tumorentitäten (n=76). Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil einzelner Tumorentitäten an allen auf *www.clinialtrials.gov* registrierten klinischen Studien, die den Einfluss auf das klinische Ergebnis von Krebspatienten durch therapeutische Beeinflussung der Autophagie untersuchen (abgerufen am 28.12.2020). In 56 von insgesamt 76 Studien wurden entweder Chloroquin oder Hydroxychloroquin verwendet.

Es existieren eine Reihe spezifischer Autophagie-Inhibitoren, die an ganz unterschiedlichen Stellen im Mechanismus eingreifen und in der Laborforschung genutzt werden. Klinisch relevant sind hauptsächlich das Chloroquin und das Hydroxychloroquin (95,96), die auch in über 70% der aktuellen klinischen Studien zur Autophagieinhibition genutzt werden.

1.3.1 Autophagieinhibition

Einige präklinische Studien wurden bereits durchgeführt, um therapeutisch einsetzbare Autophagie-Inhibitoren zu entwickeln. Die meisten Autophagie-Inhibitoren wirken jedoch recht unselektiv, was die Möglichkeit einer klinischen Anwendung limitiert und hauptsächlich die Anwendung in der Forschung bei *in vitro* Untersuchungen ermöglicht. Eines der Hauptprobleme bei der Entwicklung solcher Inhibitoren ist die Messung und Quantifizierung der Autophagie als einen dynamischen Prozess. So bedeutet zum Beispiel die Akkumulation von Autophagosomen nicht unbedingt eine verstärkt ablaufende Autophagie, sondern kann auch Ausdruck einer Inhibition späterer Stadien des Mechanismus sein (97).

In der vorliegenden Arbeit wird der Fokus auf die Gruppe der lysosomalen Autophagie-Inhibitoren gelegt, deren Hauptvertreter Chloroquin und Hydroxychloroquin zurzeit die Einzigen sind, die sich in klinischer Anwendung befinden (95). Zusätzlich wird das hauptsächlich in der Forschung angewandte Bafilomycin A1 als weiterer Inhibitor eingesetzt und mit Rapamycin als Vertreter eines Autophagie-Induktors eine Gegenkontrolle verwendet.

1.3.1.1 Chloroquin und Hydroxychloroquin

Die Wirkung von Chloroquin und Hydroxychloroquin auf die Autophagie wird indirekt über das Lysosom vermittelt. Bei neutralem pH diffundieren sie ungeladen durch die Plasmamembran des Lysosoms. Durch die sauren pH-Bedingungen im Lysosom werden sie protoniert, was die Diffusion zurück in das Zytosol verhindert und zu einem Anstieg des lysosomalen pH-Wertes führt. Die fehlende Azidifizierung des Lysosoms führt dazu, dass die Aktivität der degradativen Enzyme inhibiert und die lysosomale Funktion blockiert wird (98,99). Neuere Forschungen legen nahe, dass der Effekt von Chloroquin und Hydroxychloroquin auf die Autophagie weniger durch den Einfluss auf die lysosomale Azidifizierung entsteht als vielmehr durch die direkte Inhibition der Fusion von Lysosom und Autophagosom, indem sie die Assoziation von STX17 mit LC3-positiven Strukturen blockieren (100). Chloroquin-Derivate werden klinisch schon lange in der Malariatherapie angewandt (99), fanden mit der Zeit aber auch Einzug in die Therapie anderer Erkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis (101) oder dem Lupus erythematosus (102). Positive Effekte wurden auch bei der

Behandlung von Patienten mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) gefunden (103). Dass Chloroquin antineoplastische Effekte aufweisen kann, wurde zuerst in einer Studie in Tansania beobachtet, bei der die Gabe von Chloroquin zur Malariaphylaxe zu einer reduzierten Inzidenz von Burkitt-Lymphomen führte (104). Später wurde aufgezeigt, dass Hydroxychloroquin in malignen B-Zellen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie durch die Aktivierung von Caspase-3 und der Modulation des Bcl-2/bax Verhältnisses Apoptose induzieren kann (105). Auch auf solide Tumore anderer Entitäten zeigten sich antineoplastische Effekte, zum Beispiel bei Brustkrebs (106), Darmkrebs (107) und Glioblastomen (108). In Kombination mit Akt-Inhibitoren führt Chloroquin zu einer effektiven Chemosensitivierung von Tumorzellen, was sein vielversprechendes Potenzial bei der Behandlung resistenter Tumore verdeutlicht (109). Chloroquin und Hydroxychloroquin sind in der Regel sehr gut verträglich, Chloroquin kann jedoch in wenigen Fällen ototoxisch oder retinotoxisch wirken (110,111). Hydroxychloroquin wurde daraufhin entwickelt und unterscheidet sich von Chloroquin durch die Addition einer Hydroxylgruppe am beta-C-Atom der tertiären Aminoethylgruppe. Das Risiko von Nebenwirkungen, vor allem auf die Retina, wurde damit reduziert und die Verträglichkeit gesteigert (112), sodass in den meisten aktuellen klinischen Studien Hydroxychloroquin das Mittel der Wahl ist.

Die Datenlage zur Anwendung von Chloroquin und Hydroxychloroquin bei HNSCC ist eher schwach, auch wenn diese bereits vielversprechende Ergebnisse liefert. Bernard et al. konnten zeigen, dass der Einsatz von PI3K-Inhibitoren zu einer verstärkt ablaufenden Autophagie führt und dass diese durch die Anwendung von Chloroquin blockiert wird. Der kombinierte Einsatz von PI3K-Inhibitoren und Chloroquin weist einen synergistischen Effekt auf, der zu einer verringerten Zellproliferationsrate *in vitro* führt (113). In einem Xenograft Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Chloroquin die Effektivität einer auf Cisplatin basierten Chemotherapie erhöht und zu einer Reduzierung der Tumorgroße mit verlängertem mittlerem Überleben der Mäuse führt (114). Chloroquin kann das Tumorstadium aber nicht nur allein durch seine Wirkung auf die Tumorzelle beeinflussen, sondern auch durch seine Effekte auf Tumor-assoziierte Fibroblasten, die sowohl für das Wachstum als auch für die Metastasierung von enormer Bedeutung sind (115,116). Eine Studie von New et al. konnten aufzeigen, dass die Inhibition der Autophagie in Tumor-assoziierten Fibroblasten die Zellproliferationsrate von HNSCC reduzierte (117).

1.3.1.2 Bafilomycin A1

Bafilomycine sind eine Familie aus der Gruppe der Makrolidantibiotika, die aus einer Reihe von *Streptomyces* hergestellt werden (118). Bafilomycin A1 (im Folgenden Bafilomycin) blockiert spezifisch V-ATPasen (vacuolar-type H⁺-ATPasen), eine Membranpumpe die H⁺-Ionen durch die Hydrolyse von ATP in membranumhüllte Organellen schleust und so ein saures Milieu gegenüber dem Rest der Zelle aufbaut. In Lysosomen dient das saure Milieu der Aktivierung hydrolysierender Enzyme (119). Erste Hinweise, dass Bafilomycin Einfluss auf die Autophagie hat, ergaben Untersuchungen an der Zelllinie H-4-II-E, bei denen der Einsatz von Bafilomycin zu einer Akkumulation von Autophagosomen und einer verringerten Anzahl von Autophagolysosomen führte (120). Diese Ergebnisse legten nahe, dass die lysosomale Azidifizierung durch die V-ATPase ein wichtiger Schritt bei der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen ist. Andere Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Fusionsprozess unabhängig von der Aktivität der V-ATPase abläuft und der Effekt von Bafilomycin zeitabhängig unterschiedlich ist (121,122), sodass Bafilomycin die Autophagie noch über andere Mechanismen beeinflussen könnte. Mit der Inhibition der Kalziumpumpe Ca-P60A/SERCA wurden in einer Studie von Mauvezin und Neufeld an genetisch veränderten *Drosophila* erste Hinweise für den V-ATPase-unabhängigen Effekt von Bafilomycin auf die Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom gefunden (123). Als Autophagie-Inhibitor wird Bafilomycin vor allem zur *in vitro* Forschung an unterschiedlichen Tumorzelllinien verwendet und zeigt vielversprechende Ergebnisse (124,125). Ein synergistischer Effekt von Bafilomycin und Cisplatin auf das Wachstum von TSCC konnte, wenn auch über einen anderen Mechanismus als die Autophagie nachgewiesen werden (126).

1.3.2 Autophagieinduktion

Das Prinzip der Autophagieinduktion geht vor allem von Krebs als einer systemischen Erkrankung aus, bei der die Tumorzellen der Immunantwort des Körpers entgehen und so ungehindert proliferieren können (127). Das Ziel dieser Therapie ist es also, das Immunsystem so weit zu stärken, dass es Tumorzellen wieder effizient eliminieren und die Tumorregression fördern kann (128). Ein weiterer Aspekt der Autophagieinduktion in Tumorzellen ist die Aktivierung des autophagischen Zelltodes, einem Zelltodmechanismus, der sich von der Apoptose durch eine erhöhte Anzahl an

Autophagosomen sowie seiner Caspase-Unabhängigkeit unterscheidet (129) und durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden kann (130-132). Wie genau die Autophagie das Überleben oder den Tod der Zelle reguliert und wie die Verbindungen zur Apoptose sind, ist heute noch größtenteils ungeklärt. Die Induktion der Autophagie könnte vor allem bei herunterregulierter Apoptose (einem der von Hannahan und Weinberg postulierten Merkmale von Tumorzellen) zu einer anderen, Apoptose-unabhängigen Form des Zelltodes führen und eine zusätzliche Therapiemöglichkeit bieten. Den positiven Effekt der Autophagieinduktion auf die Proliferationsrate und die Resistenzentwicklung in unterschiedlichen Tumorentitäten zeigen bereits diverse Studien (133-135).

1.3.2.1 Rapamycin

Rapamycin, oder auch Sirolimus, ist ein Wirkstoff, der erstmals in Bakterien aus Bodenproben der Osterinseln entdeckt und dem ursprünglich eine antimykotische Wirkung zugeschrieben wurde (136). Später entdeckte man seine immunsuppressiven Eigenschaften, indem es die Proliferation von T-Zellen inhibiert (137). Klinisch wird Sirolimus heutzutage eingesetzt in der Transplantationsmedizin zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen und in der Kardiologie, wobei mit Sirolimus beschichtete Stents weniger Re-Stenosen im Vergleich zu konventionellen Metallstents aufweisen (138,139). In diversen Zelllinien und Xenograft Mausmodellen zeigte Rapamycin antineoplastische Eigenschaften und erhielt so Einzug in die Tumorforschung (140,141). In humanen Rhabdomyosarkomzellen induziert Rapamycin p53-unabhängige Apoptose (142). Ein positiver Effekt auf die Wirkung anderer Chemotherapeutika konnte in den Tumorzelllinien HL-60 und SKOV3 gezeigt werden, in denen die Apoptose-induzierende Wirkung von Cisplatin verstärkt wurde (143). Die schlechte Löslichkeit und schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften von Rapamycin gaben den Anstoß zur Entwicklung einiger Rapamycin-Derivate, wie zum Beispiel Temsirolimus oder Everolimus, wovon einige in klinischen Studien untersucht und später zur Behandlung bestimmter Tumorentitäten zugelassen wurden (144-146). Seine Wirkung auf die Autophagie beruht vor allem auf der Komplexbildung mit mTOR, das dadurch inhibiert wird. mTOR nimmt wie bereits beschrieben eine zentrale Rolle in der Regulation der Autophagie ein, sodass eine Inhibition von mTOR zu einer verstärkt ablaufenden Autophagie führt. Da die Inhibition von mTOR aber

weitreichende Auswirkungen auf unterschiedlichste Signalwege in der Zelle hat, bleibt die Frage zu klären, ob und inwieweit die Effekte auf die Autophagie zu den antineoplastischen Wirkungen von Rapamycin beitragen oder ob diese Auswirkungen hauptsächlich durch die Effekte auf andere Signalwege zu erklären sind.

1.3.2.2 Methioninrestriktion

Basierend auf der Abhängigkeit von Tumorzellen von der exogenen Zufuhr der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin (147,148), stellt das Prinzip der Methioninrestriktion (MR) einen interessanten Ansatz in der Erforschung neuartiger Therapiemöglichkeiten für Tumorerkrankungen dar. Methionin ist eine essenzielle Aminosäure, deren Zufuhr durch die Nahrung unerlässlich für die Erhaltung des Lebens ist (149). Im Körper ist Methionin Bestandteil schwefelhaltiger Stoffwechselwege, wie zum Beispiel der Synthese von S-Adenosylmethionin. Die Remethylierung von Homocystein durch die Methioninsynthase ist für die Synthese von Tetrahydrofolat und damit der Purin- und Pyrimidinsynthese essenziell (150). Durch seine aufwändige Synthese stellt Methionin eine wertvolle Energieressource dar (151), sodass ein hohes Level an Methionin der Zelle ein hohes Energielevel anzeigt und den Wechsel in eine anabole Stoffwechsellage möglich macht. Viele Studien lieferten Hinweise darauf, dass eine limitierte Aufnahme von Methionin positive Effekte auf den Metabolismus hat und sogar zur Verlängerung der Lebensspanne führt (152). In Tiermodellen und Versuchen mit Zellkulturen zeigen sich Effekte wie eine erhöhte Insulinsensitivität (153), eine verringerte Fettleibigkeit (154,155), ein verringerter Inflammationsstatus (156) und verringerter oxidativer Stress (157). Der lebensverlängernde Effekt der MR wird den Auswirkungen auf unterschiedliche Mechanismen zugeschrieben, neben den oben beschriebenen auch den Auswirkungen auf die Autophagie (158). Durch die Restriktion von Methionin wird die Aktivität von mTOR, bedingt durch seine Funktion als zellulärer Energiesensor, inhibiert und die Autophagie effektiv induziert (159).

Eine erste Studie zeigte bereits 1959, dass die Restriktion einzelner Aminosäuren einen Einfluss auf das Tumorwachstum haben kann (160). 1974 folgte schließlich eine Studie, die spezifisch die Auswirkungen einer MR auf das Proliferationsverhalten normaler und maligner Zellen beobachtete. Obwohl die Zellmedien andere

Methylgruppendonatoren beinhalteten (Homocystein), wurde das Tumorwachstum signifikant beeinträchtigt, während das Wachstumsverhalten normaler Zellen keine Beeinträchtigung zeigte (161). Dieser Effekt wurde damit erklärt, dass normale Zellen durch die Remethylierung von Homocystein mit Hilfe der Methioninsynthase Methionin selbst synthetisieren können. In Tumorzellen fehlt jedoch häufig dieses Enzym, sodass die MR einen interessanten Ansatzpunkt bietet, um auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen Einfluss zu nehmen und gleichzeitig die Funktion normaler Zellen zu erhalten (162,163). Es existieren auch Ergebnisse aus *in vivo* Studien, die das enorme Potenzial der Proteinrestriktion als Strategie in der Tumorthherapie verdeutlichen (164). Trotz der wachsenden Evidenz der Effektivität der MR bei der Therapie unterschiedlicher Tumore, gibt es bisher wenige Studien, die das Potenzial der MR in Menschen untersuchen. Eine Studie von Epner und Kollegen zeigte, dass die enterale, diätetische MR von Patienten mit metastasierenden Tumoren über 17 Wochen sicher und gut tolerabel ist und zu einer signifikanten Reduktion der Plasma-Methionin Level führt (165). Andere Daten zeigen einen positiven Effekt der MR auf die Effektivität von 5-Fluoruracil bei Magenkarzinomen (166). Zum Einfluss der MR auf das Proliferationsverhalten von HNSCC existieren aktuell keine Daten. Eine Erforschung erscheint aber, unterstützt von der Evidenz aus vielen präklinischen *in vitro* und *in vivo* Studien zum Einfluss einer MR auf das Proliferationsverhalten verschiedener Tumore, vielversprechend für die Erweiterung möglicher Strategien in der Antitumorthherapie.

1.4 Karzinome der Mundhöhle und des Rachens

Karzinome der Mundhöhle und des Rachens (HNSCC) stellen einen Oberbegriff für Tumore unterschiedlicher Lokalisationen dar. Hierzu zählen Malignome der Lippe und Mundhöhle (ICD-10-Schlüssel C00-C06), des Oropharynx (C09.C10), des Nasopharynx (C11), des Hypopharynx (C12-C13), des Larynx (C32) und der Speicheldrüsen (C07-C08). Weltweit lag die Inzidenz für HNSCC 2018 bei über 880.000 Neuerkrankungen, womit sie die siebthäufigste Tumorerkrankung (knapp 5% aller Tumorerkrankungen) darstellt. Im selben Jahr starben über 450.000 Menschen an diesem Tumorleiden. Malignome der Lippe und Mundhöhle machen mit Abstand den größten Anteil der HNSCC aus (ca. 40%), gefolgt von Malignomen des Larynx (ca. 20%) und des Nasopharynx (14%). Wie auch schon in der Vergangenheit beobachtet,

lag ein Ungleichgewicht in der Inzidenz bei Männern und Frauen vor. So erkrankten 2018 etwa 3-mal so viele Männer an HNSCC, wie Frauen (666.037 Männer/ 221.622 Frauen) (167). Dieses Ungleichgewicht spiegelt sich auch in den Inzidenzzahlen für Deutschland wider. Im „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016“ des RKI wird von 12.992 Neuerkrankungen bei Männern und 4.532 Neuerkrankungen bei Frauen berichtet. Das mittlere Erkrankungsalter unterschied sich ebenfalls. So erkrankten Männer in Deutschland im Schnitt im 64. Lebensjahr, während Frauen im 67. Lebensjahr erkranken. Neben den Unterschieden in der Inzidenz und dem Erkrankungsgipfel zwischen Männern und Frauen, gibt es auch signifikante Unterschiede in der relativen 5-Jahres-Überlebensrate. Diese liegt für Frauen bei 61%, während im selben Beobachtungszeitraum lediglich 51% der Männer überlebten. Insgesamt ist die Inzidenz für Männer seit Ende der 1980er Jahre relativ stabil geblieben, wohingegen die Inzidenz für Frauen langfristig über die letzten Jahrzehnte deutlich zugenommen hat (168).

Die Karzinogenese von HNSCC ist ein Mehrstufenprozess und gliedert sich in die vier Phasen Initiation, Promotion, Progression und Invasion. Vor allem exogene Karzinogene wie Tabak oder Alkohol bewirken in der Phase der Initiation DNA-Alterationen, die zu einer Epithelschädigung im Sinne einer hyper- bzw. metaplastischen Veränderung führen (169). Bei chronischer Einwirkung dieser karzinogenen Noxen auf die Epithelzellen steigt die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung dysplastischer Veränderungen, die sich letztendlich zu einem Carcinoma in Situ (intraepitheliale Neoplasie) entwickeln können. Mit Durchbruch der Basalmembran entsteht aus dem Carcinoma in Situ ein invasives Karzinom mit Potenzial zur Metastasierung. Damit aus einer normalen Epithelzelle des oberen Aerodigestivtraktes eine invasive Karzinomzelle entstehen kann, müssen etwa 6-10 unterschiedliche, genetische Ereignisse auftreten, die charakteristisch für die jeweilige Phase des Tumorwachstums und diese Tumorentität sind (170). Die genetischen Alterationen unterscheiden sich nicht nur in den jeweiligen Phasen des Tumorwachstums, sondern auch zwischen einzelnen Tumoren eines Patienten, sodass der genetischen Sequenzierung eines Tumors eine bedeutende Rolle für das Verständnis dessen Wachstums zukommt (171).

Mehr als 95% der malignen Erkrankungen der Mundhöhle und des Rachens stellen Plattenepithelkarzinome dar (79), deren Entstehung durch eine Reihe von

Risikofaktoren begünstigt wird. Die beiden wichtigsten Risikofaktoren sind langjähriger Tabakgenuss und exzessiver Alkoholkonsum, die einen synergistischen Effekt auf die Entstehung von Tumoren haben (172-174). Ebenfalls ein bedeutsamer Risikofaktor ist die Infektion mit HPV, wobei besonders die HP-Viren 16, 18, 31 und 45 ein hohes onkogenes Potenzial besitzen (175). In den letzten Jahrzehnten ist die Inzidenz verschiedener Arten von HNSCC in den USA und auch vielen anderen Teilen der Erde gesunken, während die Inzidenz von OSCC zugenommen hat (176). Diese Entwicklung wird zum einen mit einem allgemein geringeren Genuss von Tabak erklärt, und zum anderen mit einer höheren Infektionsrate mit HP-Viren. Besonders das HP-Virus 16 spielt eine Rolle in der Entwicklung von OSCC und gilt als unabhängiger Risikofaktor und prognostischer Marker (177,178). Der Anstieg der Inzidenz von OSCC betraf hierbei vor allem junge Patienten, wofür steigende Infektionszahlen mit HP-Viren als Ursache ausgemacht wurden (179,180). Der Anteil HPV-positiver HNSCC lag in derselben Studie bei etwa 50%. Patienten mit HPV-positiven Tumoren haben kleinere Primärtumore im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren und eine bessere Prognose (178). Der stärkste prognostische Faktor für die Überlebensrate bleibt jedoch der Tabakkonsum (181,182). Weitere Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCC sind unter anderem eine schlechte Mundhygiene und die Ernährung (172,183). Vor allem eine unausgewogene Ernährungsweise, gekennzeichnet durch hohe Kalorienzufuhr, der Zufuhr einfach-gesättigter Fettsäuren und dem Verzehr von rotem und verarbeitetem Fleisch, wird als ein wesentlicher kanzerogener Faktor bei bis zu 25% der HNSCC in Industrienationen diskutiert (184).

Ein wichtiger Faktor für die Heilungschancen ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung beziehungsweise die Ausdehnung des Tumors. Weit über die Hälfte der Patienten werden erst mit einem fortgeschrittenen Stadium des Tumors diagnostiziert, was einerseits die Therapie erschwert und andererseits die Prognose deutlich verschlechtert (185). Auch die hohe Rezidivrate stellt ein Problem für die Behandlung und die Betroffenen dar.

Für die Therapie von HNSCC stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, die, abhängig von verschiedenen Faktoren wie dem Tumor-Staging und eventuellen Komorbiditäten der Patienten, einzeln oder in Kombination angewandt werden. Der Goldstandard ist sicherlich die operative Entfernung des Tumors und der regionalen Lymphabflusswege (186). Neben der Resektion des Primärtumors zielt diese

Behandlung auch auf die Entfernung von klinisch oder durch Bildgebung diagnostizierten Metastasen und der prophylaktischen Entfernung eventueller Mikrometastasen ab. Die chirurgische Therapie wurde in den letzten Jahrzehnten dramatisch verbessert, was positive Auswirkungen auf die Resektion des Tumors und den Funktionserhalt hat (187).

In Addition zur chirurgischen Therapie findet vor allem die adjuvante Radiotherapie des Operationsgebietes breite Anwendung (188). Technologische Fortschritte erlaubten eine präzisere Anwendung der Radiotherapie, womit das nichtmaligne Gewebe geschont und Morbiditäten durch die Therapie reduziert werden konnten. Durch diese intensitätsmodulierte Radiotherapie konnten zum Beispiel Nebenwirkungen wie Xerostomie reduziert (189) und die Überlebensraten gesteigert werden (190).

Zusätzlich zur Radiotherapie wird insbesondere bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder Rezidiven eine systemische Chemotherapie mit Cisplatin angewandt, die zu einer Verbesserung der Überlebensrate, jedoch verbunden mit mehr Morbiditäten bei den Patienten führt (191). Für Patienten, für die der Einsatz von Cisplatin nicht in Frage kommt, gibt es in 5-Fluoruracil und Taxanen wie Docetaxel oder Paclitaxel sinnvolle Alternativen (192-194). Eine Metaanalyse von 93 randomisierten Studien ergibt einen 5-Jahres-Überlebensvorteil von 6,5% für die kombinierte Radiochemotherapie im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie (195).

Einen alternativen Therapieansatz für fortgeschrittene maligne Tumoren stellen die zielgerichteten Immuntherapien dar. Therapeutische monoklonale Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren fanden bereits den Weg in die klinische Praxis. Der gegen den EGFR gerichtete Antikörper Cetuximab ist bereits seit 2006 zur Behandlung fortgeschrittener HNSCC in Kombination mit einer Radiotherapie in der EU zugelassen (196). Das größte Entwicklungspotenzial wird derzeit der Immuncheckpointmodulation beigemessen. Ziel dieses Therapieansatzes ist es, die Immunevasion der Tumorzellen zu verhindern und so wieder angreifbar für das körpereigene Immunsystem zu machen (197). Ein Problem dabei ist, dass Tumore durch Mutationen genetische Varianten entwickeln, die erneut eine Immunevasion begünstigen und so der Wirkung der Immuncheckpointmodulatoren entgehen (198).

Trotz all der Innovationen und Verbesserungen von Diagnostik und Therapie hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate seit Jahrzehnten kaum signifikant verändert, sodass die Erforschung neuer Ansätze in der Tumorthherapie dringend notwendig ist.

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss Autophagie-modulierender Wirkstoffe auf die Proliferation und das Überleben von HNSCC-Zelllinien in einem *in vitro* Modell analysiert werden. Dabei soll zusätzlich überprüft werden, ob durch eine Autophagiemodulation in Kombination mit Fas-Ligand (FasL), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Cisplatin eine gesteigerte Zytotoxizität induzierbar ist. Neben der pharmakologischen Modulation der Autophagie mit Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin wird mit der MR ebenfalls eine nicht-pharmakologische Methode der Autophagiemodulation als alternative Therapieoption untersucht. Zur Validierung möglicher Sensitivierungseffekte werden auch hier unterschiedliche Kombinationstherapien mit FasL, TNF α und den Autophagie-modulierenden Wirkstoffen analysiert. Darüber hinaus wird neben dem Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der Zelllinien, der Einfluss Autophagie-modulierender Wirkstoffe auf Proteinebene analysiert. Mögliche Sensitivierungseffekte könnten sich positiv auf Nebenwirkungen antitumoraler Systemtherapien auswirken. Außerdem könnten synergistische Effekte zu einem besseren Ansprechen therapieresistenter Tumore führen und so die Grundlage für eine erfolgreichere Therapie dieser Tumore in Zukunft bilden.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräteliste. Auflistung der verwendeten Geräte mit Artikelbezeichnung, Hersteller und Herkunft.

Gerät	Artikelbezeichnung	Hersteller	Herkunft
Absaugpumpe	HLC	DITABIS Digital Biomedical Imaging Systems AG	Pforzheim
Brutschrank	Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Heidelberg
Elektroblotter	PerfectBlue™ Semi-Dry´-Blotter	Sedec™ Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Elektrophoresegerät	PerfectBlue™ Twin S 45-1010-C	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Gefrierschrank	7084 311-00	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach an der Riss
Großsterilisator	Selectomat PL	MMM Münchener Medizin Mechanik GmbH	Planegg
Kühlschrank	7084 311-00	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach an der Riss
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg
Mikroskopkamera	Leica EC3	Leica Camera AG	Wetzlar
Netzgerät	PeqPOWER E250	VWR International GmbH	Darmstadt
pH-Meter	Inolab pH Level 1	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG	Weilheim
Pipetten	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro	BRAND GmbH + CO KG	Wertheim
Photometer	Tecan Infinite® F50 Absorbance Microplate Reader	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim

Präzisionswaage	KB 2400-2N	KERN & SOHN GmbH	Dürrwangen
Rollenmischer	RM 5	VWR International GmbH	Darmstadt
Scanner	Officejet Pro 8500A	HP Deutschland GmbH	Böblingen
Sicherheitswerkbank	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Ultraschall-Homogenisator	Branson™ Ultrasonics	Emerson Technologies GmbH	Dietzenbach
Umwälzthermostat	MB-5	Julabo GmbH	Seelbach
Vakuumpumpe	N 816.3 KT.18	KNF Neuberger GmbH	Freiburg
Vortexgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.	Karlsruhe
Wasserbad	VWB 26	VWR International GmbH	Darmstadt
Wippschüttler	Rocking Platform	VWR International GmbH	Darmstadt
Zellkulturmikroskop	CK40	Olympus Europa SE & Co. KG	Hamburg
Zellzähler	CASY® TT Cell Counter + Analyzer	Roche Innovatis AG	Reutlingen
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> • 5427 R • Universal 320 R 	Eppendorf AG Andreas Hettrich GmbH & Co. KG	Hamburg Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Materialliste. Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Artikelbezeichnung, Hersteller und Herkunft.

Artikel	Bezeichnung	Hersteller	Herkunft
Blotpapier	Gel-Blotting Papiere	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
FACS Röhrchen	5ml Tubes, 75 x 12 mm, PS	Sarstedt AG & Co	Nürnberg
Falcons	50mm Polypropylene Conical Tube 30 x 115 mm style	Corning GmbH	Kaiserslautern
Messgefäße	CASY cups 22x65	Omni Life Science GmbH	Bremen
Mikroreaktionsgefäß	Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG	Hamburg
Nitrozellulosemembran	Amersham™ Protran™ 0,2 m NC	GE Healthcare GmbH	München

Pasteurpipette	Kimble Chase Glass Pasteur Pipettes	Kimble Chase Germany	Meiningen
Petrischalen	Nunc™	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Pipetten	Cellstar Serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.	Eppendorf AG	Hamburg
Zellkulturflaschen	Nunc™ EasYFlask™ 75 cm ²	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Zellschaber	Cell Scraper	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
6-Well-Platten	Nunc™ Zellkultur-Multischalen	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
96-Well-Platten	Nunc™ MicroWell™ 96 Well Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt

2.1.3 Zellkulturmedien

Tabelle 3: Zellkulturmedien. Auflistung der verwendeten Nährmedien mit Angabe der jeweiligen Supplemente wie fetal calf serum (FCS) und Penicillin/Streptomycin (P/S).

Medium	Supplemente	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
DMEM	10% FCS 1% P/S	41965-039	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
DMEM/F-12, HEPES	10% FCS 1% P/S 5µl Hydrocortison	31885-023	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
McCoy's 5A	10% FCS 1% P/S	31330-038	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
MEM Alpha	10% FCS 1% P/S	26600-023	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt

2.1.4 Reagenzien

Tabelle 4: Reagenzien. Auflistung der verwendeten Wirkstoffe und Reagenzien mit Angabe von Produktnummer, Hersteller und Herkunft.

Reagenz	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
Ammoniumperoxodisulfat	9592.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Bafilomycin A1 160 µM	S 1413	Selleckchem	München
CASYton	177603	Omni Life Science GmbH	Bremen
Chloroquinphosphat 10 mM	S 4157	Selleckchem	München
Cisplatin	S 1166	Selleckchem	München
ColorPlus™ Prestained Protein Ladder	P7712S	New England BioLabs GmbH	Frankfurt/Main
Kristallviolett 42555	42555	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
DMSO	RNBD9128	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Fc-FLAG-FasL FLAG-TNFα		Eigenproduktion	(199)
FCS	10270	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Gel-Blotting-Papier Roti- PVDF	A147.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Hydrocortison	H4001- 10G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Isopropanol	6752.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Milchpulver	T145.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
L-Glutamin	K 0283	Biochrom GmbH	Berlin
Glycin	3908.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Methanol (> 99,8%)	8045	Mallinckrodt Baker B.V.	Deventer, NL
Nitrozellulose Blotting Membran NCA2		GE Healthcare	Solingen
Penicillin-Streptomycin	15140-122	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Rapamycin 10 mM	S1039	Selleckchem	München
Rotiphorese® Gel (37,5:1)	3029.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Roti®-Free-Stripping Puffer 2.2 plus	3337.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Röntgen-Entwickler G153 Röntgen-Fixierer G354	HT536 EFBBM	Agfa Health Care GmbH	Bonn
Salzsäure rauchend 37%	1.00317.10 00	Merck	Darmstadt
SDS ultra pure > 99,5%	2326.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	34095	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
TEMED	2367.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Tris (Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan)	5429.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	L2143	Biochrom GmbH	Berlin

Tween 20	02040162	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
----------	----------	-------------------------	-----------

2.1.5 Puffer & Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen. Auflistung der eigens hergestellten Puffer und Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
Kristallviolettlösung	0,5 g Kristallviolett 100 ml Methanol 400 ml dH ₂ O
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris 0,015 M Natriumdodecylphosphat (SDS) pH 6,8 mit HCL 500 ml dH ₂ O
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris 0,015 M SDS ph 8,8 mit HCL 500 ml dH ₂ O
Lämmli-Probenpuffer (4x)	8% SDS 0,1 M Dithiothreitol 40% Glycerol 0,2 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 0,04% Bromophenol
Western-Puffer (10x)	144 g Glycin 30,3 g Tris 1000 ml dH ₂ O
Blot-Puffer (1x)	100 ml Western-Puffer (10x) 700 ml dH ₂ O 200 ml Methanol 1,5 ml 20% SDS
Laufpuffer (1x)	100 ml Western-Puffer (10x) 900 ml dH ₂ O 5 ml 20% SDS
Tris-buffered saline (TBS) (10x)	121 g Tris-Base 400 g NaCl 5000 ml H ₂ O mit pH 7,6 (ca. 74 ml HCL)
Phosphate-buffered saline (PBS) (10x)	133,25 g Na ₂ HPO ₄ 15,6 g NaH ₂ PO ₄ 409,5 g NaCl 5000 ml H ₂ O
Milch (5%) in TBS (1x)	5 g Magermilchpulver 100 ml TBS (1x)

2.1.6 Software

Tabelle 6: Software. Auflistung der für die Auswertung verwendeten Softwareprogramme mit Herkunft.

Software	Herkunft
Microsoft Office 2013	Redmond, WA, USA
Graphpad Prism 6.05	La Jolla, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden fünf immortalisierte Plattenepithelkarzinomzelllinien (FaDu, Detroit562, A253, SCC9, SCC25) aus dem Kopf-Hals-Bereich und eine immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie (HaCaT) als Referenzzelllinie verwendet. Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter keimfreien Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Als Kulturmedien wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Medien verwendet (siehe Tabelle). Den unterschiedlichen Kulturmedien wurde 10% FCS und 1% P/S zugesetzt. Die Medien der Zelllinien SCC9 und SCC25 enthielten zusätzlich 5 µl Hydrocortison (50 mg/ml) und HEPES als Puffersubstanz. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Kulturflaschen (25 cm² Fläche) unter standardisierten Bedingungen (37°C, 5% CO₂, unter H₂O gesättigte Atmosphäre) durch zweimal wöchentliches Passagieren. Hierbei wurden die adhärent gewachsenen Zellen zunächst mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit Hilfe von 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C gelöst wurden. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden anschließend 7 ml Kulturmedium hinzugegeben. Eine bestimmte Menge der Zellsuspension wurde in einem für jede Zelllinie definiertem Verhältnis entsprechend ihrer Wachstumsraten in eine neue Kulturflasche überführt und weitere 25 ml frisches Kulturmedium hinzugegeben. Die übrige Menge der Zellsuspension wurde für Versuche verwendet. Dafür erfolgte mit Hilfe der volumenbasierten Aggregationsmessung im Coulter Counter-System CASY® die Bestimmung der Zellzahl. Dieses Verfahren beruht auf Impedanzmessung mit Pulsflächenanalyse. Zur Analyse wurden 10 µl der Zellsuspension in 10 ml Casyton verdünnt analysiert (200).

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Zelllinien inklusive deren Lokalisation und Kulturmedium.

Zelllinie	Lokalisation	Kulturmedium
FaDu	pharyngeales Plattenepithelkarzinom eines männlichen Patienten	MEM Alpha
Detroit562	pharyngeales Plattenepithelkarzinom eines männlichen Patienten	MEM Alpha
A253	epidermoides Karzinom der submaxillären Speicheldrüse eines männlichen Patienten	McCoy's 5 A
SCC9	primäres Zungengrundkarzinom eines männlichen Patienten	DMEM/F12
SCC25	primäres Zungengrundkarzinom eines männlichen Patienten	DMEM/F12
HaCaT	humane Keratinozyten	DMEM

2.2.2 Zytotoxizitätsassay

Angewendet wurde die Kristallviolettmethod nach *Gillies* (201), das über spektrophotometrische Verfahren die optische Dichte (OD) angefärbter Zellen misst und so eine Quantifizierung ermöglicht. Kristallviolett bindet als basischer Farbstoff an die DNA der Zellen. Die Menge gebundenen Kristallvioletts ist direkt proportional zur Menge der DNA (202). Für die Versuche wurden 1×10^4 Zellen in 100µl/Well als Triplikate auf Mikrotiter-Platten im 96-Well-Format ausgesät. Am nächsten Tag wurde der Überstand entfernt und durch frisches Zellmedium ersetzt. Die Monotherapien mit Chloroquin und die Kombinationstherapien der Wirkstoffe mit FasL, TNF α und Cisplatin erfolgten in log₂-Verdünnungsstufen. Die Monotherapien mit Bafilomycin und Rapamycin erfolgten in log₃-Verdünnungsstufen. Die Assays wurden für 72 h im Brutschrank inkubiert. Für die Versuche zur MR wurde den Zellen zunächst Methionin-armes Kulturmedium (Methioningehalt 1 mg/L) zugesetzt und für 5 Tage unter

regelmäßiger visueller Kontrolle der Zellkulturen hinsichtlich Kontamination und Proliferation im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und frisches Kulturmedium hinzugegeben. Danach erfolgten die Mono- bzw. Kombinationstherapien der Wirkstoffe mit FasL oder TNF α und anschließender Inkubation im Brutschrank für 72 h. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 50 μ l Kristallviolett für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Darauf folgte die mehrfache Waschung mit dH $_2$ O und anschließender Lufttrocknung für 24 Stunden. Die photometrische Messung erfolgte im Absorptions-Mikroplatten-Reader Tecan infinite F50 bei einer Wellenlänge von 595 nm (OD $_{595\text{nm}}$) nach Zugabe von 100 μ l Methanol pro Well. Zur Reproduktion der Ergebnisse wurde jeder Versuch pro Wirkstoffkombination und Zelllinie dreifach unabhängig voneinander wiederholt (n=3). Für die Kombinationsversuche der Wirkstoffe mit FasL, TNF α und Cisplatin und für die Versuche zur MR wurde für jeden Wirkstoff spezifisch die IC $_{10}$ (inhibitory concentration of 10%) graphisch aus den Daten und den entsprechenden Diagrammen der Monotherapieassays bestimmt und als Versuchskonzentration verwendet. Die IC $_{10}$ entspricht der inhibitorischen Konzentration der Wirkstoffe, bei der die relative Zellzahl um 10% reduziert wurde. Die Zellzahl der Kontrolle diente dabei als Referenz und wurde als 100% festgelegt.

2.2.2.1 Datenanalyse

Die Auswertung und Speicherung der Daten aus dem Zytotoxizitätsassay erfolgte mit Microsoft Excel. Hierbei wurden die ermittelten Extinktionswerte der stimulierten Zellen zu Mittelwerten (MW) zusammengefasst und mit den MW der Kontrollen, in prozentuale Relation gesetzt, wobei der MW des Standards als 100% definiert wurde. Diese Formel erlaubt die Berechnung der Zellzahl, relativ zum Standard:

$$\left(\frac{\text{MW}_{\text{OD}595\text{nm}}(\text{stimulierte Zellen})}{\text{MW}_{\text{OD}595\text{nm}}(\text{Standard})} \right) \times 100 = \text{rel. Zellzahl (\%)}$$

Die Standardabweichung (SD) ist ein Maß für die Streuung der Extinktionswerte um ihren MW. Zur Berechnung der prozentualen SD wurden die Triplikate der $MW_{OD595nm}$ (stimulierte Zellen) verwendet:

$$\left(\frac{SD_{OD595nm} (stimulierte Zellen)}{MW_{OD595nm} (stimulierte Zellen)} \right) \times \text{rel. Zellzahl (\%)} = SD (\%)$$

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte graphisch mit Graphpad Prism 6.05. Aus den graphischen Darstellungen wurden schließlich die IC_{10} -Werte der einzelnen Wirkstoffe bestimmt. Hierzu wurde an der Stelle der Proliferationskurve, an der noch 90% der Zellen vital waren, eine Gerade parallel zur x-Achse gezogen. Am Schnittpunkt der Geraden mit der Proliferationskurve wurde senkrecht zur Geraden ein Lot gefällt und die entsprechende Wirkstoffkonzentration am Schnittpunkt mit der x-Achse abgelesen. Diese Konzentration wurde als IC_{10} definiert.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) reagieren die in der Probe enthaltenen Proteine mit dem anionischen Detergens SDS und formen negativ geladene, denaturierte Komplexe. Die Menge an gebundenem SDS und dementsprechend die Ladung der Komplexe ist proportional zur Größe der Proteine. Bei der anschließenden Elektrophorese wird ein Molekularsiebeffekt durch die unterschiedlich großen Poren des Polyacrylamidgels erzeugt, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle aus der Probe sowohl durch die Ladung, als auch durch deren Größe bestimmt wird. Mit Hilfe einer Standardproteinbande kann nach Fixierung und Anfärbung der Proteine eine Beurteilung der Proteingröße erfolgen (203). Die hier verwendeten Polyacrylamidgele wurden nach folgendem Schema gegossen:

Tabelle 8: Polyacrylamid-Gele. Zusammensetzung der eigens hergestellten Polyacrylamidgele für die SDS-Page.

Trenngel	Sammelgel
17,6 ml Acrylamid	5,6 ml Acrylamid
11 ml Trenngelpuffer	7 ml Sammelgelpuffer
15,6 ml Millipore	15,2 ml Millipore
748 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)	336 µl APS
61,6 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)	28 µl TEMED

Für die Probenherstellung wurden 2×10^6 Zellen/Well mit der IC_{10} -Konzentration von Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin auf einer 6-Well-Platte für 24 h stimuliert. Als Kontrollen dienten Zellen, die ausschließlich mit Kulturmedium stimuliert wurden. Um den Versuch zu stoppen, wurden die Platten auf Eis gestellt. Danach erfolgte die zweifache Spülung mit 1 ml PBS um das restliche Kulturmedium auszuwaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die adhärennten Zellen vorsichtig vom Boden abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zentrifugation und Pelletierung wurde den Proben 110 µl Lämmli-Probenpuffer beigefügt und damit homogenisiert. Anschließend wurden die Vollzelllysate mittels Sonicator (10 Pulse) aufgeschlossen. Die Denaturierung der Lysate im Wasserbad erfolgte bei 95 °C für 3 Minuten und anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 13200 rpm. Die Gele wurden mit 12 µl Proteinmarker (11 bis 254 kDa) als Größenstandard und 25 µl Lysat je Proben tasche befüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte standardmäßig in Laufpuffer bei 3,8 mA/cm² pro Gel für 90 Minuten. Der anschließende Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurde mit Blotpuffer bei konstant 60 mA pro Gel für 90 Minuten durchgeführt. Die Membranen wurden daraufhin für mindestens 1 Stunde in 5%iger Milchpulverlösung eingelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu reduzieren. Die Inkubation der Membranen mit dem Primärantikörper (LC3B Antibody, Cell Signalling, #2775) erfolgte über Nacht bei 4 °C unter permanenten Rollbewegungen. Am Folgetag wurden die Membran dreimal für je 5 Minuten mit 0,1%igem TBS-T gewaschen, bevor die Membranen mit dem Sekundärantikörper (Anti-Rabbit Immunglobulin HRP, Ref. P0448, Dako Denmark A/S) für 1 Stunde

inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine erneute, dreimalige Waschung für je 10 Minuten mit 0,1%igem TBS-T. Nach Austausch des Puffers und Behandlung der Membranen mit Substrat A und B (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, #32106) für je 1 Minute wurden die Membranen belichtet und entwickelt. Dies diente der Darstellung der Proteinbanden durch Chemolumineszenz.

3. Ergebnisse

Für den Einfluss der Autophagie auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise. Dabei zeigen sowohl eine Inhibition als auch eine Induktion der Autophagie vielversprechende Ergebnisse. Um quantitativ die Wirksamkeit von Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin analysieren zu können, wurde in den folgenden Versuchen die Chemosensitivität der einzelnen Zelllinien auf die unterschiedlichen Wirkstoffe untersucht. Dazu wurden Wirkstoffkurven zur graphischen Bestimmung der IC_{10} erstellt, also der Wirkstoffkonzentration, bei der 10% des Tumorwachstums inhibiert sind.

3.1 Analyse der IC_{10} von Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin

Chloroquin zeigte bei der Analyse eine klassisch-inhibitorische Sättigungskinetik mit sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurven. Diese waren bei Detroit562, FaDu und HaCaT vollständig ausgeprägt, während sich bei SCC9, SCC25 und A253 im untersuchten Konzentrationsbereich kein vollständiges Plateau bildete (vgl. Abb. 7). Dieser Unterschied zwischen den Zelllinien fand sich auch bei den Konzentrationen der IC_{10} wieder. Die stärkste Responsivität gegenüber Chloroquin zeigte HaCaT, bei der bereits bei einer Konzentration von 1,84 μM die IC_{10} erreicht wurde. Detroit562 und FaDu zeigten sich weniger responsiv mit einer IC_{10} von 26,8 μM (Detroit562) bzw. 36,8 μM (FaDu). Die maximale Wachstumshemmung befand sich bei einer Konzentration von 200 μM und lag zwischen 18% (HaCaT) und 27,5% (FaDu) bzw. 28,5% (Detroit562). Die anderen drei Zelllinien SCC9, SCC25 und A253 zeigten in den Versuchen die schwächste Ansprechrate auf Chloroquin. Aufgrund der nicht vollständig ausgebildeten Dosis-Wirkungs-Kurven konnten keine maximalen Hemmkonzentrationen bestimmt werden, da sie oberhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs lagen. Die IC_{10} dieser Zelllinien lag bei 53,75 μM (A253), 68,3 μM (SCC9) und 75 μM (SCC25) und damit im Mittel um etwa das 2fache höher als bei den anderen beiden HNSCC-Zelllinien und sogar um das 35fache höher als bei der Referenzzelllinie.

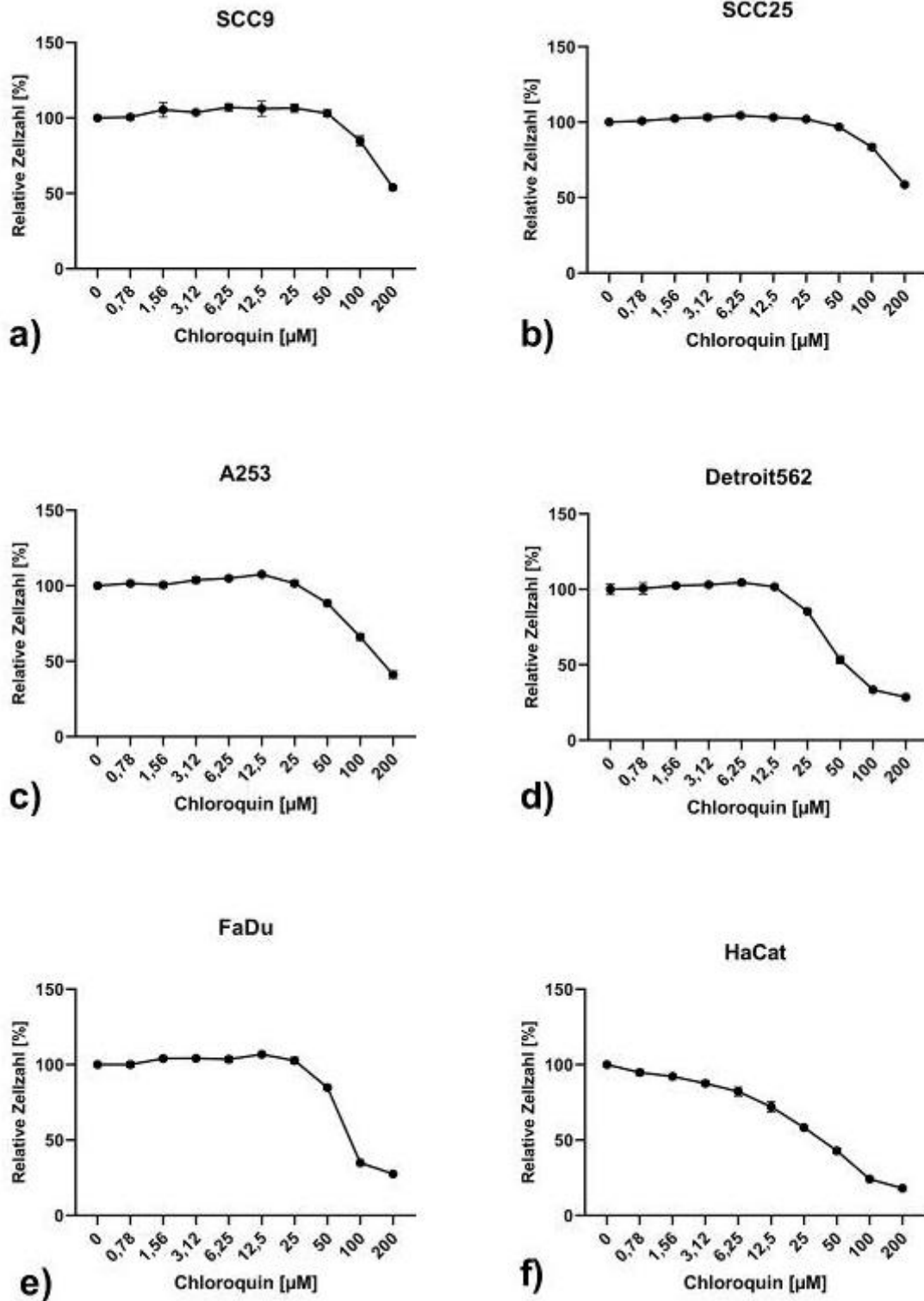


Abbildung 7: inhibitorische Effekte von Chloroquin. Zellregressionsanalyse nach Chloroquin-Monotherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. Chloroquin wurde mit log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 µM und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

Ergebnisse

Auch bei Bafilomycin zeigten sich klassische Sättigungskinetiken mit unterschiedlicher Responsivität. Das Ausmaß der maximalen Hemmung variierte jedoch stark zwischen den einzelnen Zelllinien (vgl. Abb. 8).

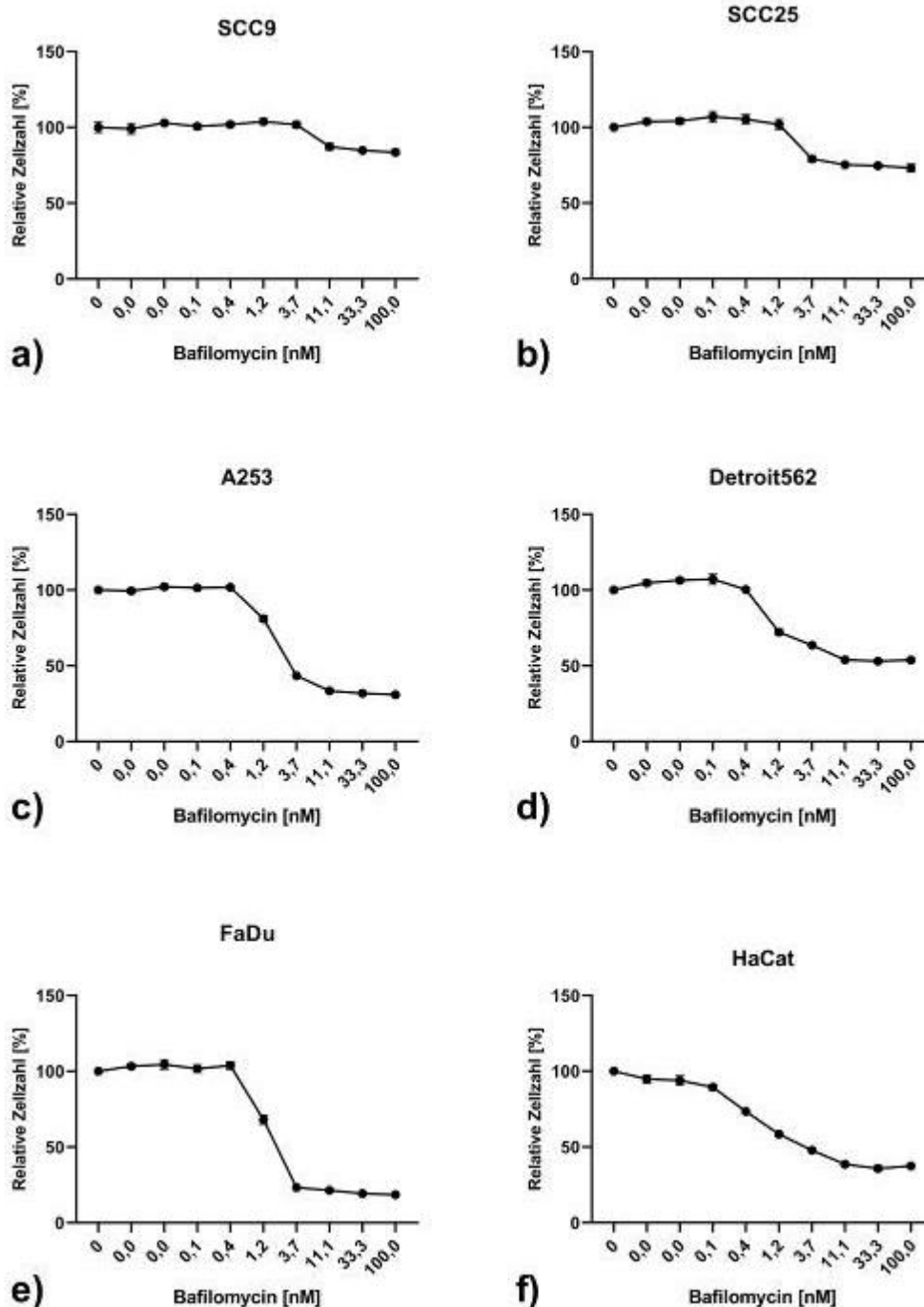


Abbildung 8: inhibitorische Effekte von Bafilomycin. Zellregressionsanalyse nach Bafilomycin-Monotherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. Bafilomycin wurde in \log_3 -Verdünnungsstufen ausgehend von 100 nM appliziert und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1×10^4 Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt ($n=3$). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

Am sensitivsten reagierte FaDu mit einer Senkung der relativen Zellzahl auf 18,6%. Die Zelllinien A253, HaCaT und Detroit562 reagierten mäßig bis schwach responsiv auf den Einfluss von Bafilomycin mit einer Senkung der relativen Zellzahl auf 30,9%, 37,4% bzw. 53,8%. Die schwächste Responsivität zeigte sich bei den Zelllinien SCC9 und SCC25 (83,6% und 73,1%). Die IC_{10} lag bei 7,25 nM für SCC9 und bei 1,75 nM für SCC25. Um vergleichbare inhibitorische Effekte in den anderen Zelllinien zu induzieren waren weitaus geringere Konzentrationen ausreichend. So lagen die IC_{10} für Detroit562, A253 und FaDu im Bereich zwischen 0,48 nM, 0,67 nM und 0,75 nM. Auffällig ist die Tatsache, dass die IC_{10} von HaCaT (0,1 nM) deutlich geringer ist im Vergleich zu den anderen Zelllinien, obwohl die maximale Wachstumshemmung bei 37,4% lebender Zellen nicht die höchste war. Dies ergibt sich aus der flach verlaufenden Dosis-Wirkungs-Kurve und ist auch bei den Versuchen mit Chloroquin zu beobachten. Auffällig ist bei Bafilomycin die im Vergleich zu den beiden anderen Wirkstoffen deutlich niedrigere Dosis, die zum Erreichen der IC_{10} notwendig war.

Der Autophagie-Induktor Rapamycin erzeugte in den Zellen unterschiedliche, aber insgesamt schwache zellregressive Effekte (vgl. Abb. 9). Die Zelllinien FaDu und SCC9 reagierten mit keiner signifikanten Reduktion der Zellzahl auf Rapamycin. Die IC_{10} -Werte der Zelllinien SCC25, A253 und HaCaT waren im untersuchten Konzentrationsbereich nicht bestimmbar und lagen hier unterhalb der kleinsten durchgeführten Verdünnung. Die durchschnittliche maximale Wachstumshemmung lag in diesen Zelllinien bei 1 μ M und 76,3% lebender Zellen. Lediglich Detroit562 reagierte in diesen Versuchen mäßig responsiv auf den Wirkstoff Rapamycin mit einer Zellregression von 31,5%. Der Kurvenverlauf zeigt keine klassisch-inhibitorische Sättigungskinetik und lässt eher auf unspezifische Effekte als Ursache für die mäßig starke Zellregression schließen. Hier konnte kein IC_{10} -Wert sicher bestimmt werden. Da dies für die meisten Zelllinien der Fall war und zwei weitere sich wie beschrieben als resistent herausstellten, wurde für die folgenden Versuchsreihen nach Literaturrecherche ein einheitlicher IC_{10} -Wert von 100 nM festgelegt (204).

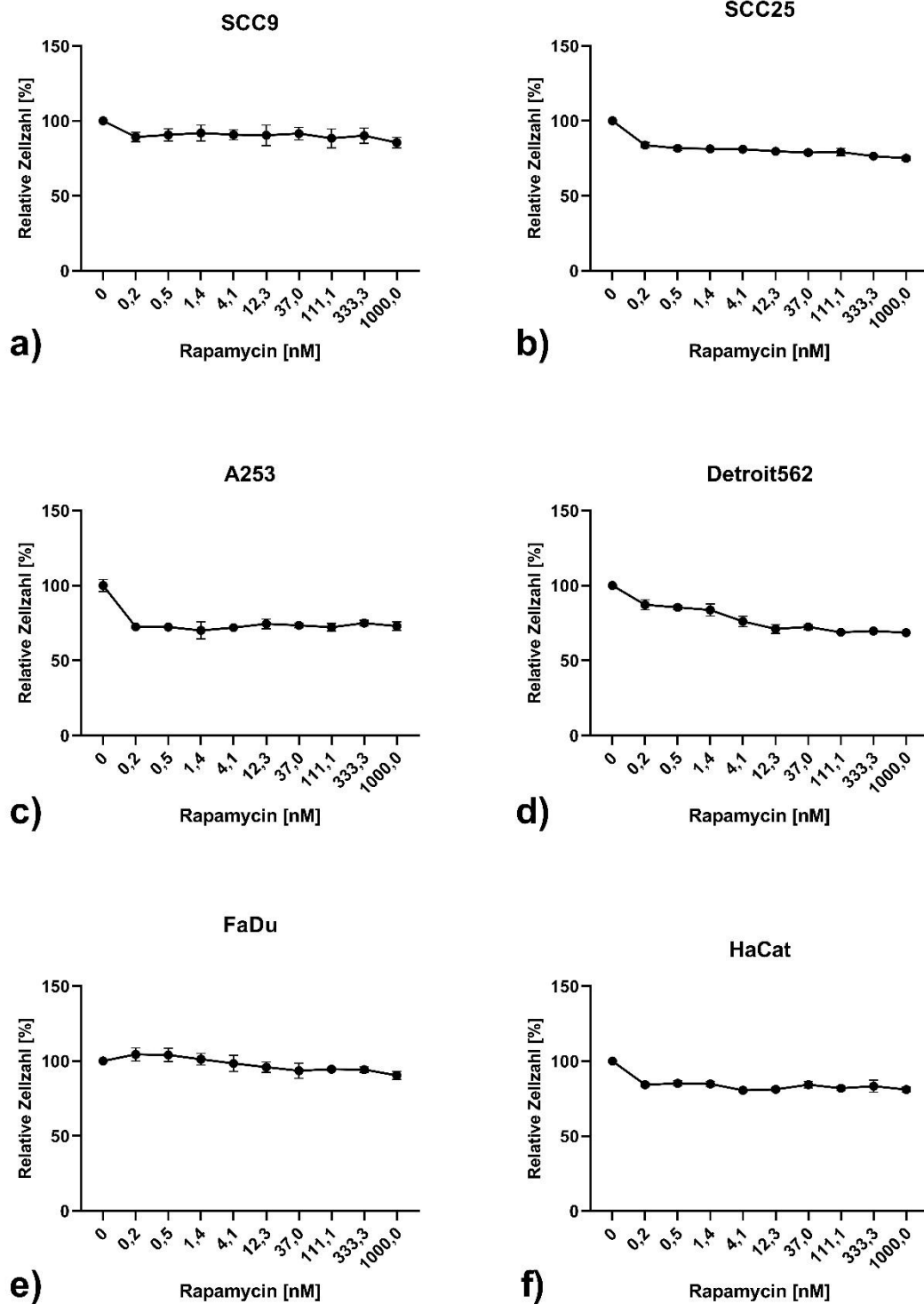


Abbildung 9: inhibitorische Effekte von Rapamycin. Zellregressionsanalyse nach Rapamycin-Monotherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. Rapamycin wurde in log₃-Verdünnungsstufen ausgehend von 1000 nM appliziert und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm. Vergleicht man die IC₁₀-Werte der Autophagie-Inhibitoren (s. Tab. 9), so zeigen sich Wirkstoff- und Zelllinien-spezifisch deutliche Unterschiede. So waren für

Chloroquin im Vergleich zu Bafilomycin deutlich höhere Wirkstoffkonzentrationen für eine 10%ige Wachstumshemmung notwendig. Signifikante Unterschiede konnten auch zwischen den Zelllinien für denselben Wirkstoff festgestellt werden.

Tabelle 9: Chloroquin/Bafilomycin IC₁₀. Darstellung der IC₁₀-Werte von Chloroquin und Bafilomycin für die einzelnen Zelllinien (n=3).

Zelllinie	Chloroquin (IC ₁₀)	Bafilomycin (IC ₁₀)
SCC9	68,3 µM	7,25 nM
SCC25	75 µM	1,75 nM
A253	53,75 µM	0,67 nM
Detroit562	26,8 µM	0,48 nM
FaDu	36,8 µM	0,75 nM
HaCaT	1,84 µM	0,1 nM

3.2 Analyse der Responsivität auf FasL, TNF α und Cisplatin

FasL und TNF α spielen als Mitglieder der TNF-Familie im Organismus eine bedeutende Rolle bei der Einleitung der Apoptose sowie vor allem TNF α auch bei der Inflammation. Cisplatin ist als zytostatisches Medikament in der klinischen Therapie von HNSCC von großer Bedeutung. Ziel der Versuche war es, die Responsivität der Zelllinien auf die Proteinliganden FasL und TNF α sowie das Zytostatikum Cisplatin zu analysieren. Die Auswertung erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen mit Hilfe des Zytotoxizitätsassays.

FasL zeigte in den Zelllinien Detroit562 und FaDu im untersuchten Konzentrationsbereich nur eine sehr schwache Wirkung ab > 100 ng/ml (vgl. Abb. 10). Die weiteren HNSCC-Zelllinien A253, SCC9 und SCC25 zeigten keine signifikante apoptotische Reaktivität auf FasL. Lediglich die Referenzzelllinie HaCaT zeigte einen sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Verlauf bei einer maximalen Wachstumshemmung bei 200 ng/ml und 21,2% lebender Zellen.

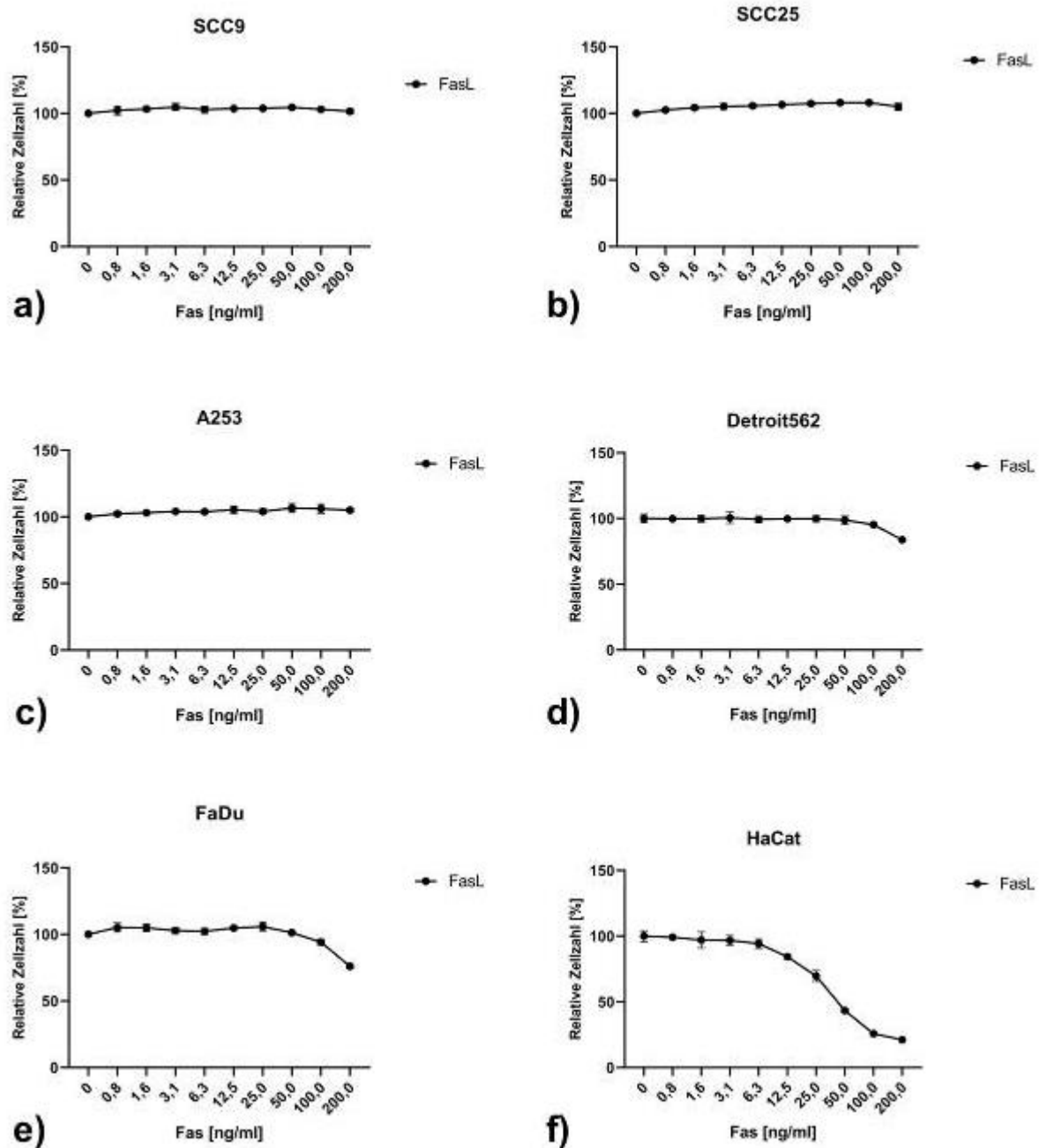


Abbildung 10: Einfluss von FasL auf die Zellproliferationsrate im HNSCC. Zellregressionsanalyse nach FasL-Monotherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. FasL wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

Auch TNF α konnte bei den meisten HNSCC-Zelllinien im untersuchten Konzentrationsbereich von 200 ng/ml keine signifikante Wachstumshemmung erzeugen. Lediglich Detroit562 zeigte bei hohen Konzentrationen von 200 ng/ml eine sehr schwache Responsivität bei immer noch > 90% lebenden Zellen. Etwas stärker,

Ergebnisse

aber immer noch schwach responsiv, erwies sich HaCaT, die erst ab einer Konzentration von > 100 ng/ml mit einer signifikanten Zellregression reagierte. Jedoch war auch hier die maximale Wachstumshemmung relativ schwach ausgeprägt bei immer noch > 70% lebenden Zellen (vgl. Abb. 11).

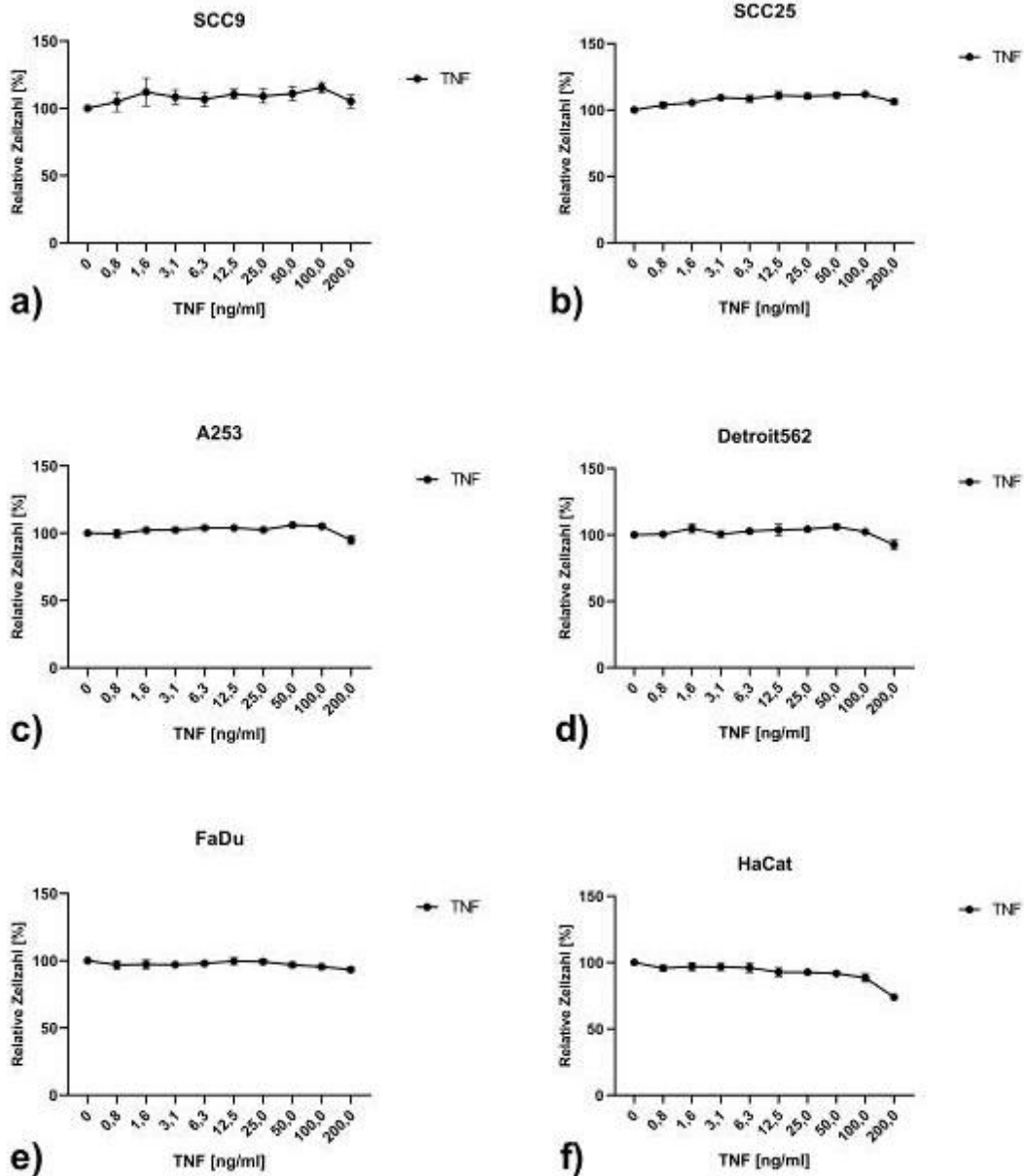


Abbildung 11: Einfluss von TNFα auf die Zellproliferationsrate im HNSCC. Zellregressionsanalyse nach TNF-Monotherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. TNFα wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm. Cisplatin hingegen führte in allen Zelllinien zu einer signifikanten Zellregression, jedoch mit unterschiedlich starker Responsivität (vgl. Abb. 12).

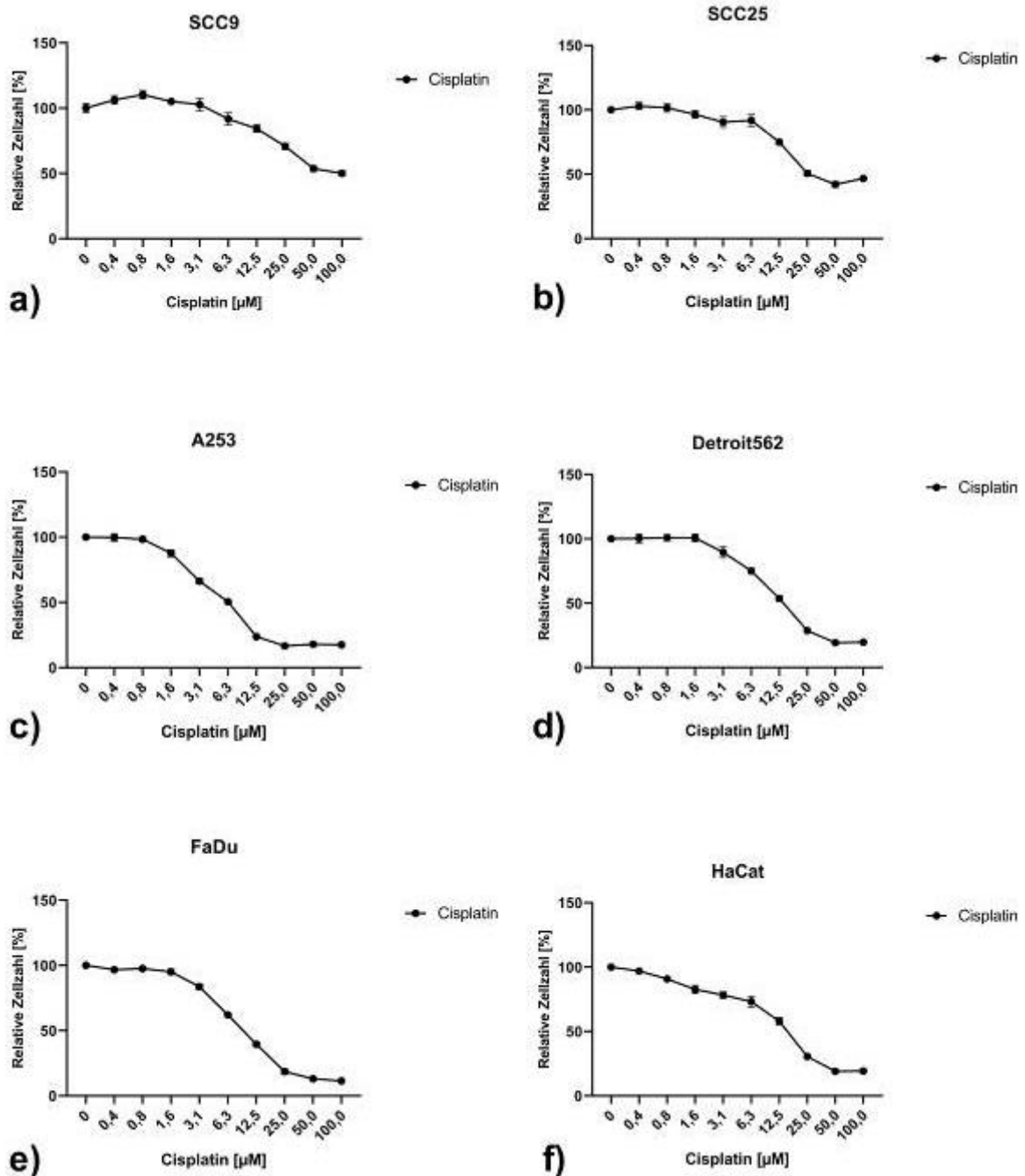


Abbildung 12: Einfluss von Cisplatin auf die Zellproliferationsrate im HNSCC. Zellregressionsanalyse nach Cisplatin-Monotherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. Cisplatin wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 100 µM appliziert und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

Mäßig stark reagierten die Zelllinien SCC9 und SCC25 mit einer Zellregression bei maximaler Wachstumshemmung mit noch 50,1% bzw. 46,8% lebenden Zellen. Bei den anderen Zelllinien kam es durchschnittlich zu einer Zellregression von etwa 80%. Auffällig war vor allem, dass bei Detroit562, FaDu und HaCaT die maximale

Hemmkonzentration im Gegensatz zu den anderen Zelllinien des Zellpanels bereits bei 100 μM lag.

3.3 Kombinationstherapie von FasL, TNF α und Cisplatin mit Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin

Wie bereits beschrieben, vermitteln Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin ihre Effekte auf die Autophagie über ganz unterschiedliche Wege. Grundsätzlich bleibt die Frage zu klären, wie genau die Autophagiemodulation zur Apoptose in den Zellen führt. In den Kombinationstherapien wurde diese Frage dahingehend untersucht, ob der Einsatz der autophagiemodulierenden Wirkstoffe zu einer Chemosensitivierung gegenüber FasL, TNF α und Cisplatin führt. Die IC₁₀-Werte von Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin aus den vorangegangenen Versuchen wurden in konstanter Konzentration für die Kombinationstherapie in log₂- bzw. log₃-Verdünnungsreihen mit FasL, TNF α und Cisplatin angewendet. Um Sensitivierungseffekte ermitteln zu können, wurden die in den Monotherapien ermittelten Kurven mit denen der parallel durchgeführten Kombinationstherapien verglichen. Verschiebungen im Kurvenverlauf deuten hier auf eine Veränderung der Wirksamkeit hin.

Chloroquin zeigte in Kombination mit FasL je nach Zelllinie sehr unterschiedliche Effekte. Während die Kombination beider Wirkstoffe auf SCC9 und SCC25 keinerlei Effekte hatte, zeigte sich ein sogar schwach desensitivierender Effekt auf A253 und HaCaT. Die Resistenz von A253 gegenüber FasL wurde durch die Wirkung von Chloroquin leicht verstärkt, ablesbar an der erhöhten, relativen Zellzahl bei maximaler FasL-Konzentration von 200 ng/ml. Hier lagen 11% mehr Zellen vor als bei der FasL-Monotherapie (vgl. Abb. 13).

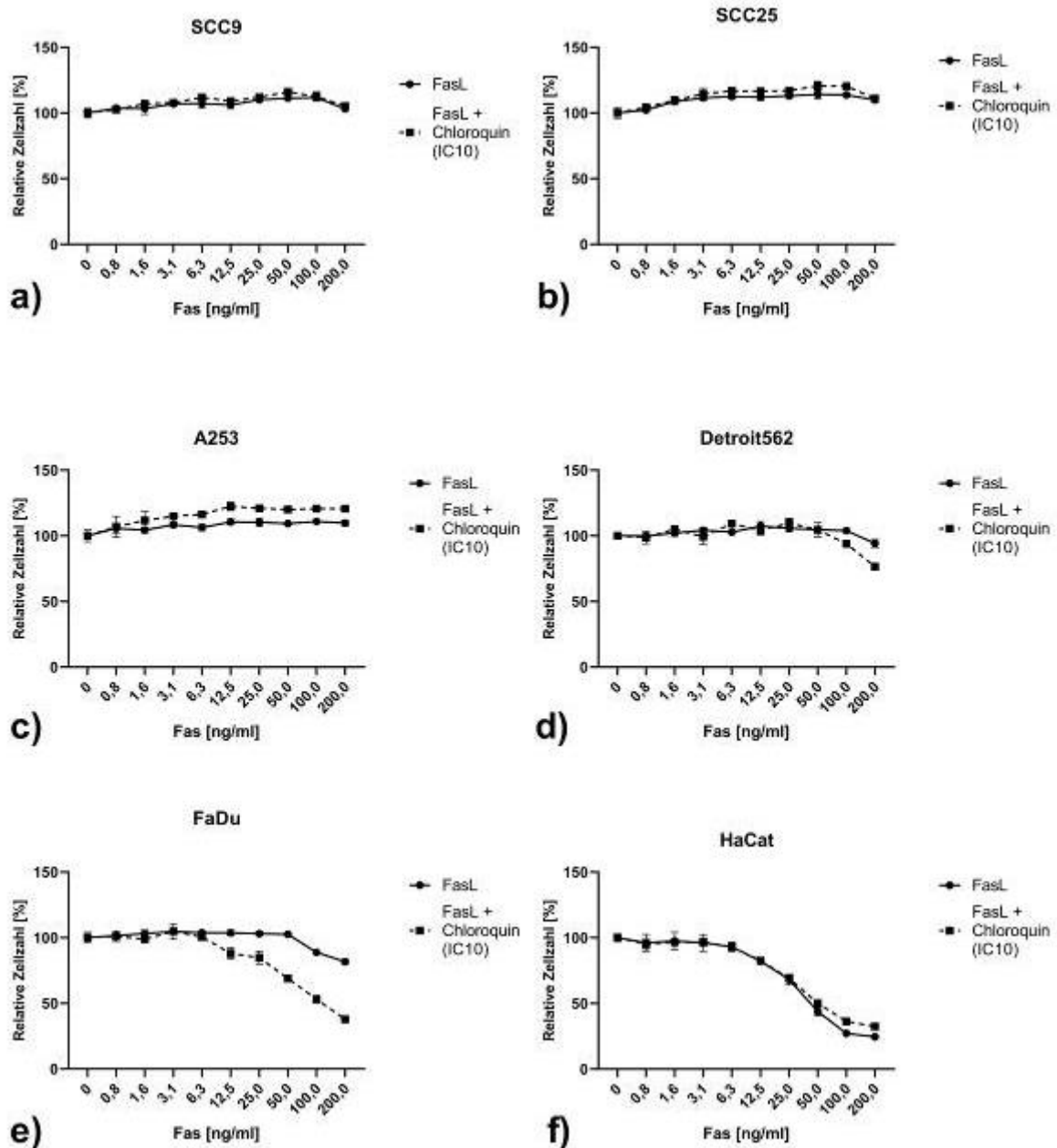


Abbildung 13: Kombinationstherapie FasL und Chloroquin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. FasL wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und in Kombination mit konstanter IC₁₀-Konzentration Chloroquin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

In den HaCaT-Zellen erzeugte die Kombinationstherapie eine verminderte maximale Wachstumshemmung von 32,4% lebenden Zellen (zum Vergleich Monotherapie mit FasL: 24,5%). Interessanterweise tritt der desensitivierende Effekt erst ab einer FasL-Konzentration von 50 ng/ml auf. Auf FaDu und Detroit562 wirkte die Kombinationstherapie sensitivierend, jedoch in unterschiedlich starkem Ausmaß. Bei Detroit562 trat der leicht sensitivierende Effekt ab einer FasL-Konzentration von > 50

ng/ml auf und führte zu einer Reduktion überlebender Zellen auf 76,5 % bei maximaler Wachstumshemmung (bei Monotherapie mit FasL: 94,1%) im untersuchten Konzentrationsbereich. Die stärkste sensitivierende Wirkung hatte die Kombinationstherapie auf FaDu. Stellte sich diese Zelllinie in der Monotherapie mit FasL noch als nahezu resistent dar, so sank die Anzahl überlebender Zellen bei maximaler Hemmkonzentration auf 37,8% lebende Zellen. Dies entspricht einer Reduktion überlebender Zellen um 43,8% oder das 3,4fache der maximalen Zellregression bei FasL-Monotherapie. Der sensitivierende Effekt begann ab einer FasL-Konzentration > 6,3 ng/ml.

In der Kombinationstherapie mit TNF α zeigte Chloroquin in den meisten Zelllinien keine signifikanten, sensitivierenden Effekte im Sinne einer Proliferationshemmung. Leicht desensitivierende Effekte zeigten sich bei SCC25, mit einer durchschnittlich erhöhten Anzahl lebender Zellen um 8,5%, und bei HaCaT, bei der die maximale Wachstumshemmung in Kombinationstherapie auf 88,2% lebende Zellen im Vergleich zu 73,8% bei TNF α -Monotherapie sank. Sensitivierende Effekte fanden sich auch hier nur bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien Detroit562 und FaDu. Sehr schwach sensitivierend wirkte sich die Kombinationstherapie auf die maximale Wachstumshemmung von Detroit562 aus, die um 10,5% im Vergleich zur TNF α -Monotherapie sank. Die größten Veränderungen waren analog zu den Ergebnissen der FasL-Kombinationstherapie mit Chloroquin bei FaDu zu beobachten, jedoch weniger stark ausgeprägt. Zeigte sich die Zellzahl bei FaDu in der TNF α -Monotherapie noch unverändert gegenüber dem Einfluss von TNF α , so reduzierte sich die Zellzahl bei maximaler Hemmkonzentration von 200 ng/ml auf 70,7% lebende Zellen. Der sensitivierende Effekt trat ab einer TNF α -Konzentration > 25 ng/ml auf (s. Abb. 14).

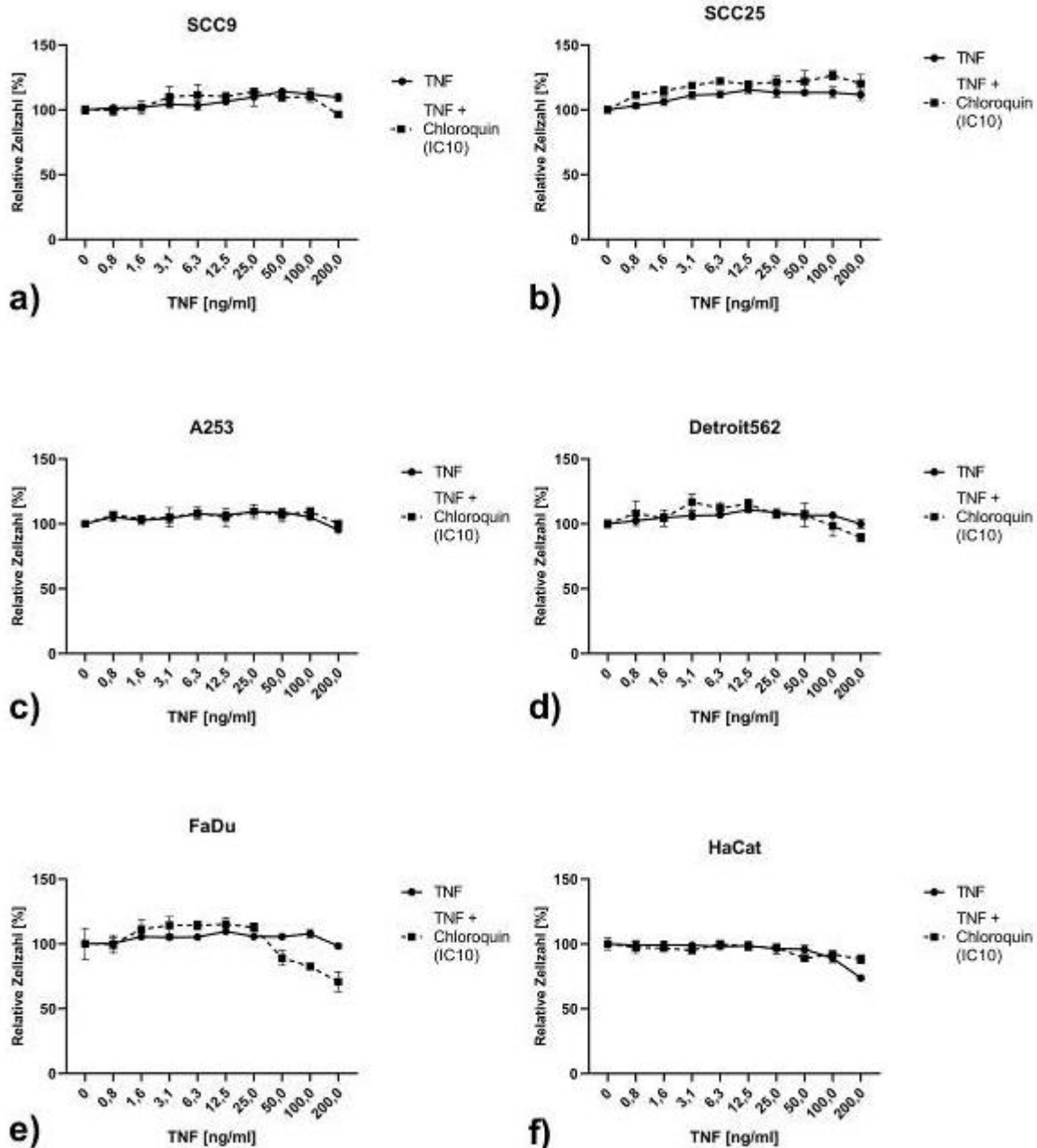


Abbildung 14: Kombinationstherapie TNF α und Chloroquin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. TNF α wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und in Kombination mit konstanter IC₁₀-Konzentration Chloroquin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

In Monotherapie reagierten alle Zelllinien auf Cisplatin in unterschiedlichem Maße sensitiv. Die Kostimulation mit Chloroquin veränderte die Zellviabilität bei den Zelllinien A253, Detroit562, FaDu und HaCaT nicht und blieb weitestgehend unverändert, sodass hier keine signifikanten sensitivierenden Effekte festgestellt werden konnten. Bei den beiden SCC9 und SCC25 führte die kombinatorische Applikation von

Chloroquin und Cisplatin zu einer leicht erhöhten relativen Zellzahl bei maximaler Hemmkonzentration von 100 μM Cisplatin. Bei beiden Zelllinien erreichte die Wachstumshemmung der Kombinationstherapie bereits bei 50 μM ihr Maximum und lag um 15,2% (SCC9) bzw. 12,9% (SCC25) höher als das jeweilige Maximum der Cisplatin-Monotherapie (s. Abb. 15)

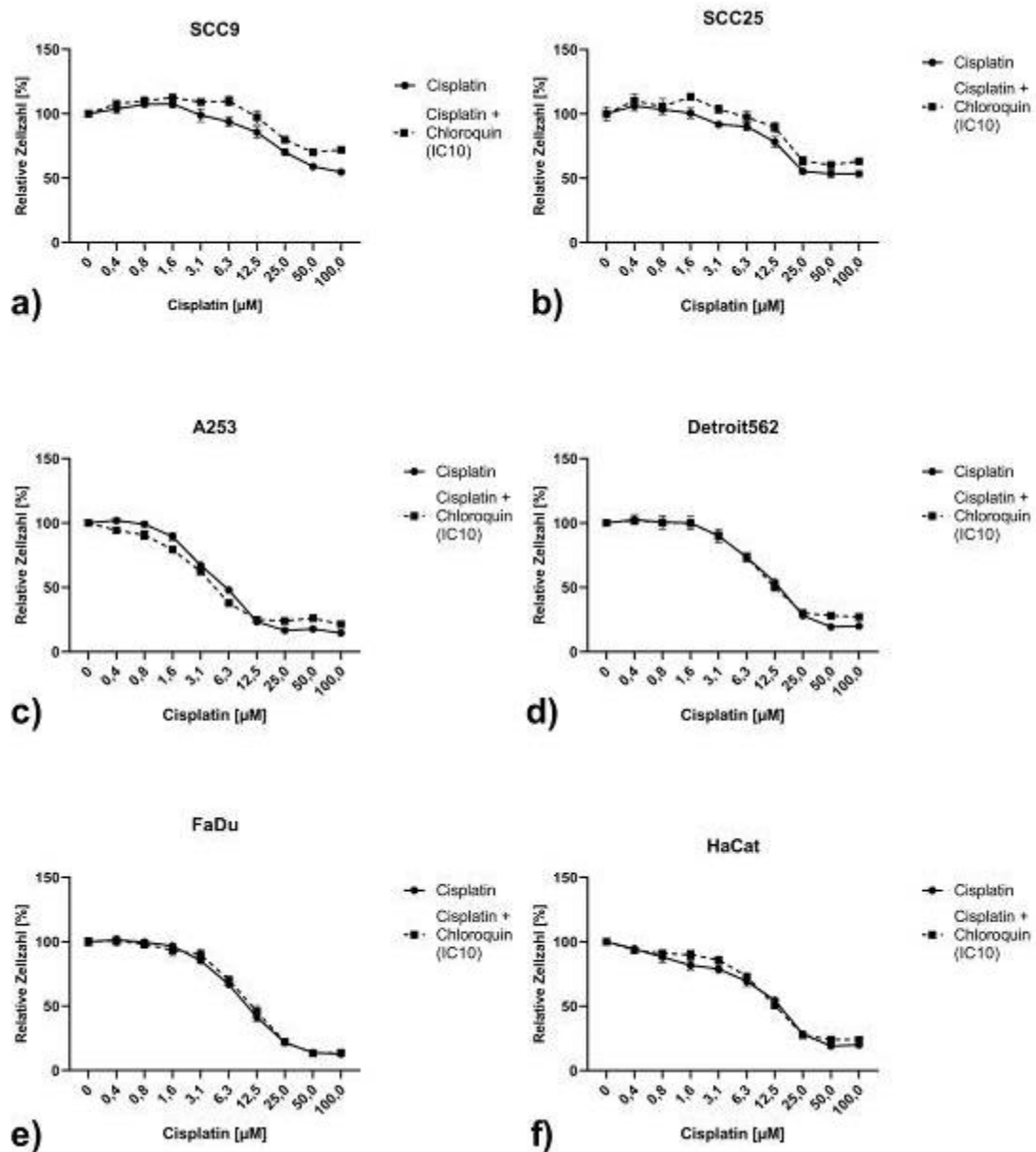


Abbildung 15: Kombinationstherapie Cisplatin und Chloroquin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. Cisplatin wurde in \log_2 -Verdünnungsstufen ausgehend von 200 μM appliziert und in Kombination mit konstanter IC_{10} -Konzentration Chloroquin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1×10^4 Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet ($n=3$). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm. Der kombinierte Einsatz von Bafilomycin und FasL zeigte in den meisten Zelllinien keine signifikante Wirkung auf die Zellzahl (s. Abb. 16).

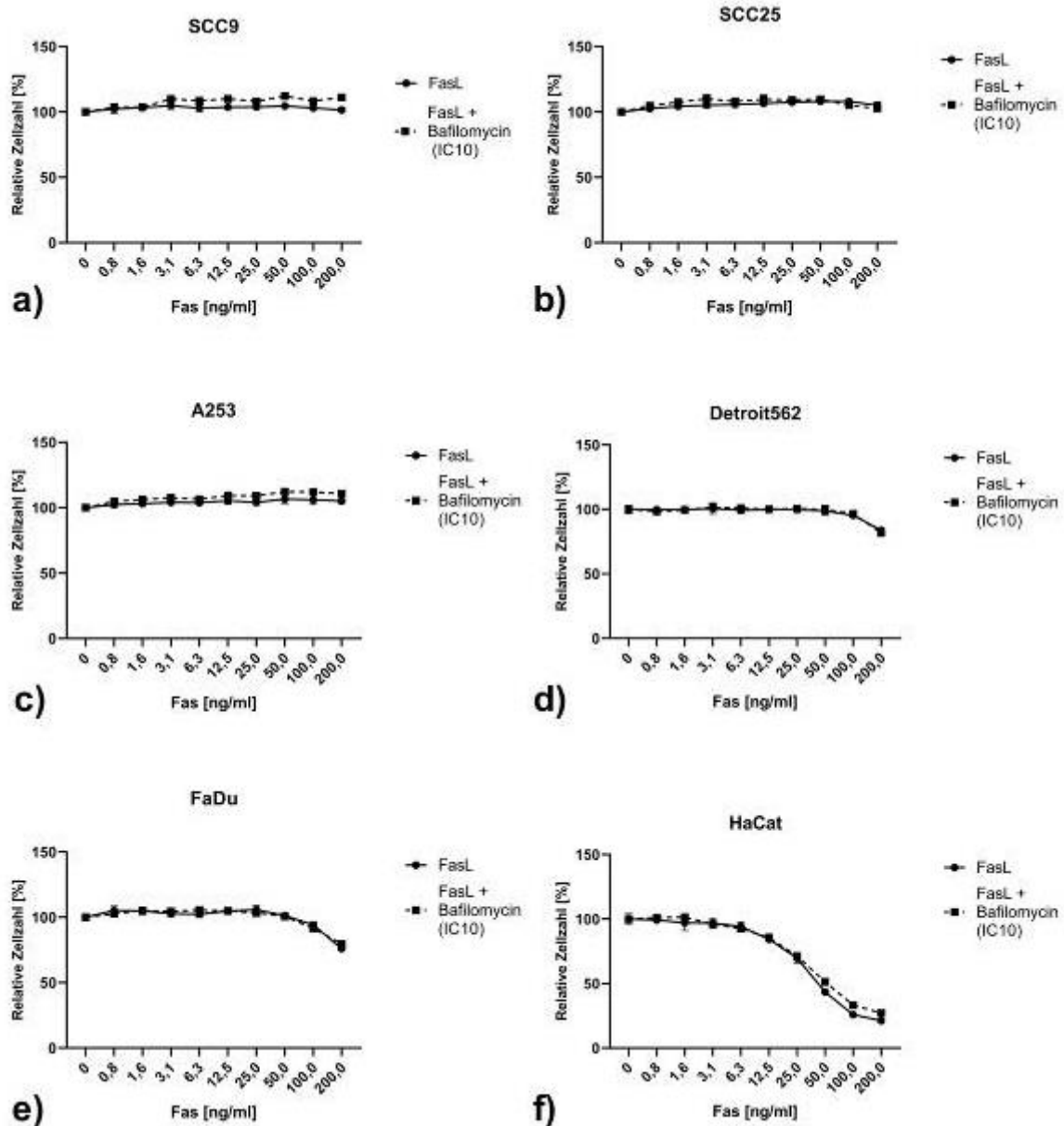


Abbildung 16: Kombinationstherapie FasL und Bafilomycin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. FasL wurde in \log_2 -Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und in Kombination mit konstanter IC_{10} -Konzentration Bafilomycin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1×10^4 Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet ($n=3$). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm. In Kombination mit FasL führte Bafilomycin lediglich bei SCC9 und HaCaT zu leichten Veränderungen. Bei maximaler Hemmkonzentration von 200 ng/ml FasL erhöhte sich die Zellzahl um 9,4% in Kombination mit Bafilomycin. Noch geringer fiel der Effekt bei HaCaT aus, die in Monotherapie als einzige der untersuchten Zelllinien sensitiv auf FasL reagierte. Hier lagen im Vergleich zur FasL-Monotherapie rund 6% mehr lebende Zellen bei maximaler Wachstumshemmung vor. Dieser marginale Effekt trat erst ab einer Konzentration von > 25 ng/ml FasL auf. Die Resistenzen der restlichen

untersuchten Zelllinien gegenüber FasL konnte der Einsatz von Bafilomycin in diesen Versuchen nicht verändern.

Die Kombinationstherapie mit TNF α zeigte analog zu den Ergebnissen der FasL-Kombinationstherapie keine signifikanten Veränderungen im Proliferationsverhalten der Zelllinien. Reagierte HaCaT in der TNF α -Monotherapie am oberen Ende des untersuchten Konzentrationsbereiches ab > 100 ng/ml mit einer zellregressiven Tendenz, so verringerte sich dieser Effekt durch den kombinierten Einsatz von TNF α mit Bafilomycin um 14,1% bei maximaler Hemmkonzentration (s. Abb. 17).

Auch die Kostimulation von Bafilomycin mit Cisplatin brachte bei vier von sechs Zelllinien (SCC25, Detroit562, FaDu und HaCaT) keine signifikanten Veränderungen der relativen Zellzahl. Bei A253 äußerte sich ein leichter Effekt mit niedrigerer halbmaximaler Wachstumshemmung im Vergleich zur Cisplatin-Monotherapie, während die maximale Wachstumshemmung gleich blieb. So erforderte eine halbmaximale Wachstumshemmung bei der Kombinationstherapie etwa eine Konzentration von 6,3 μ M Cisplatin. Im Vergleich dazu liegt die halbmaximale Wachstumshemmung der Cisplatin-Monotherapie um etwa 3 μ M oder das 1,5fache höher. Bei SCC9 bewirkte die Kostimulation eine Desensitivierung mit einer erhöhten relativen Zellzahl bei maximaler Wachstumshemmung um 15,3% im Vergleich zur Cisplatin-Monotherapie. Der desensitivierende Effekt trat bereits bei sehr niedrigen Verdünnungsstufen im Bereich von > 1 μ M Cisplatin auf (s. Abb. 18).

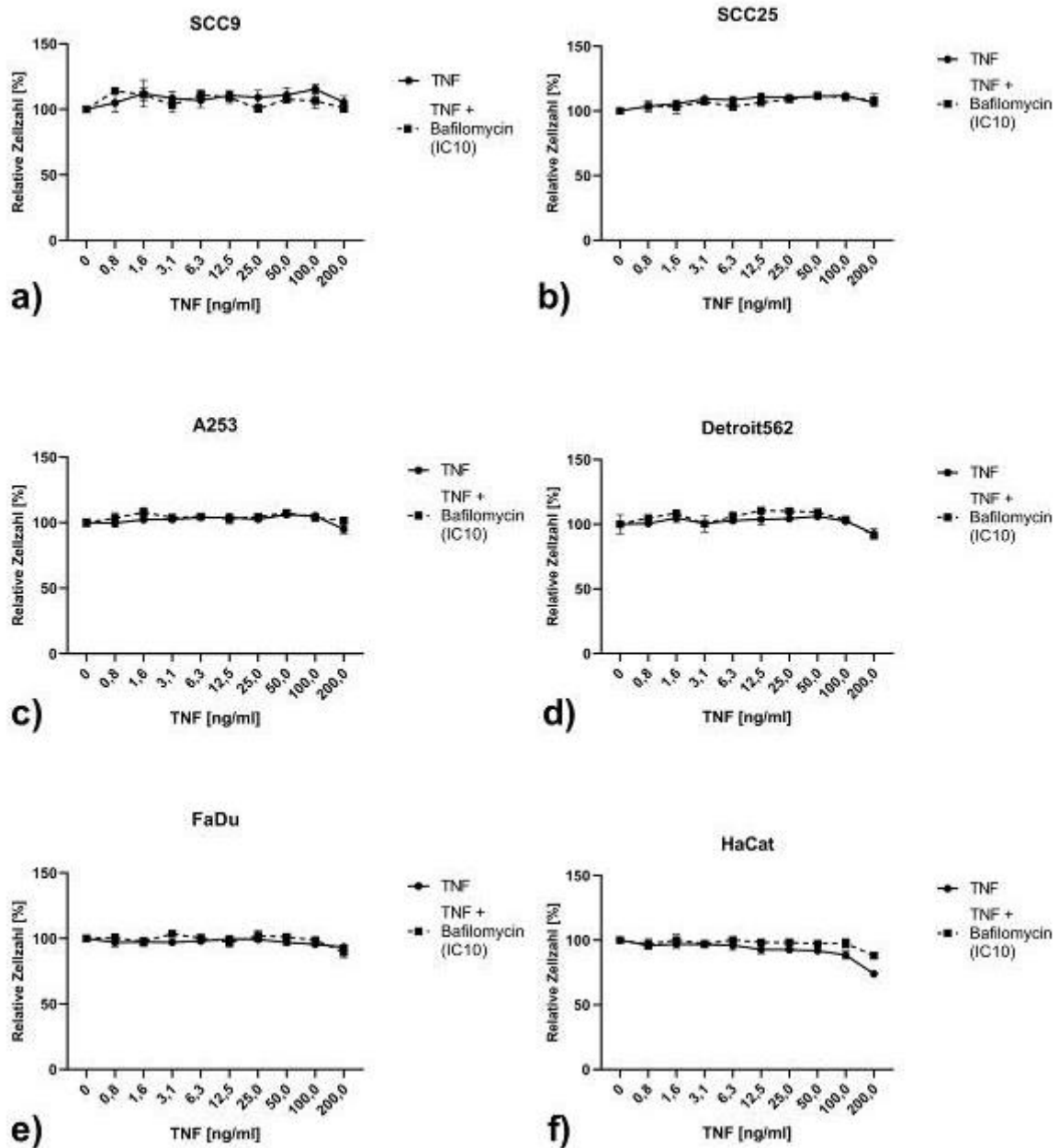


Abbildung 17: Kombinationstherapie TNF α und Bafilomycin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. TNF α wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und in Kombination mit konstanter IC₁₀-Konzentration Bafilomycin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

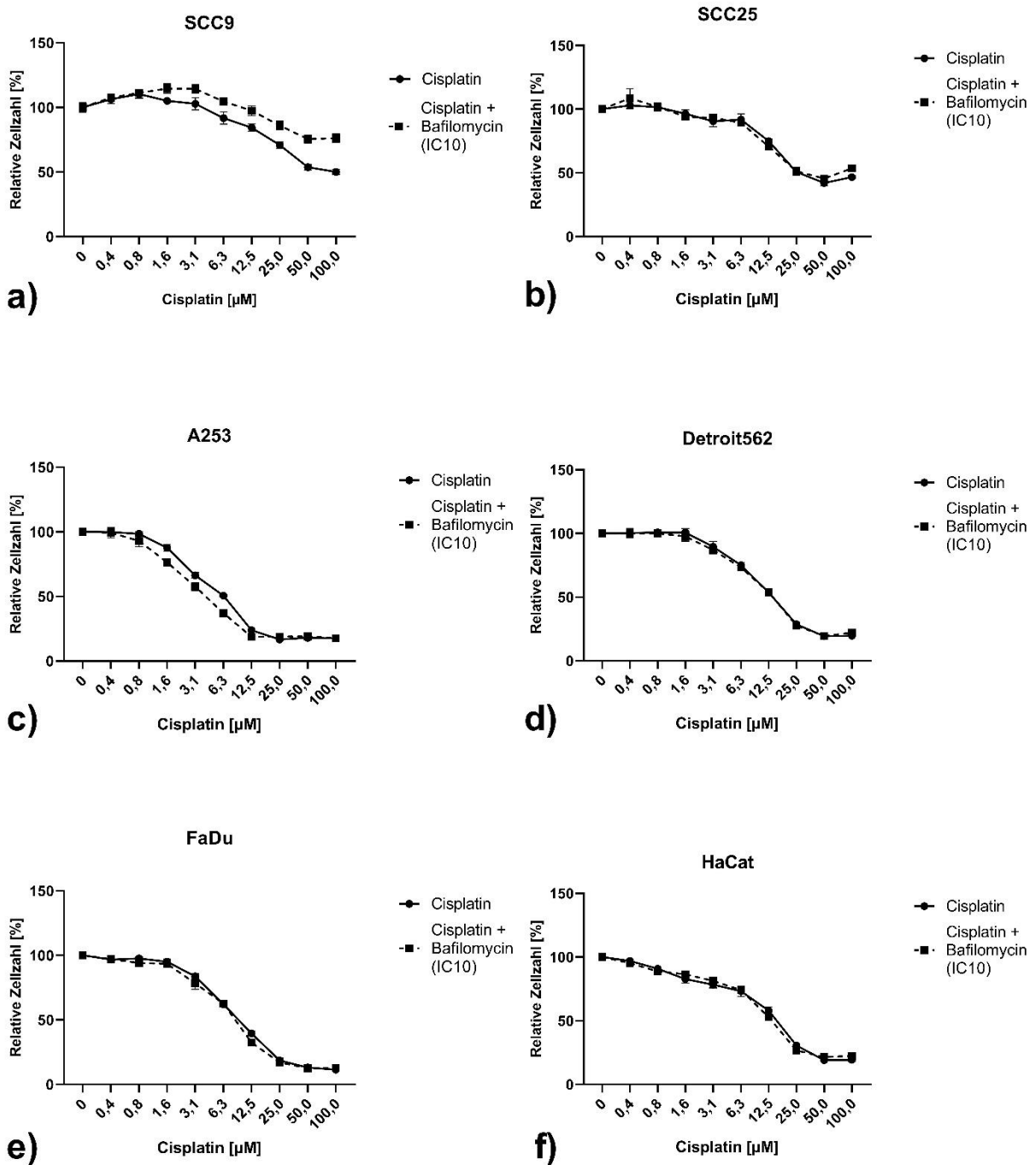


Abbildung 18: Kombinationstherapie Cisplatin und Bafilomycin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. Cisplatin wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 µM appliziert und in Kombination mit konstanter IC₁₀-Konzentration Bafilomycin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

Rapamycin spiegelt als Autophagie-induzierender Wirkstoff im Gegensatz zu den beiden bisher untersuchten inhibitorischen Wirkstoffen Chloroquin und Bafilomycin

den entgegengesetzten Therapieansatz wider. In Kombination mit FasL konnte man schwache bzw. keine signifikanten Effekte auf die relative Zellzahl beobachten (s. Abb. 19).

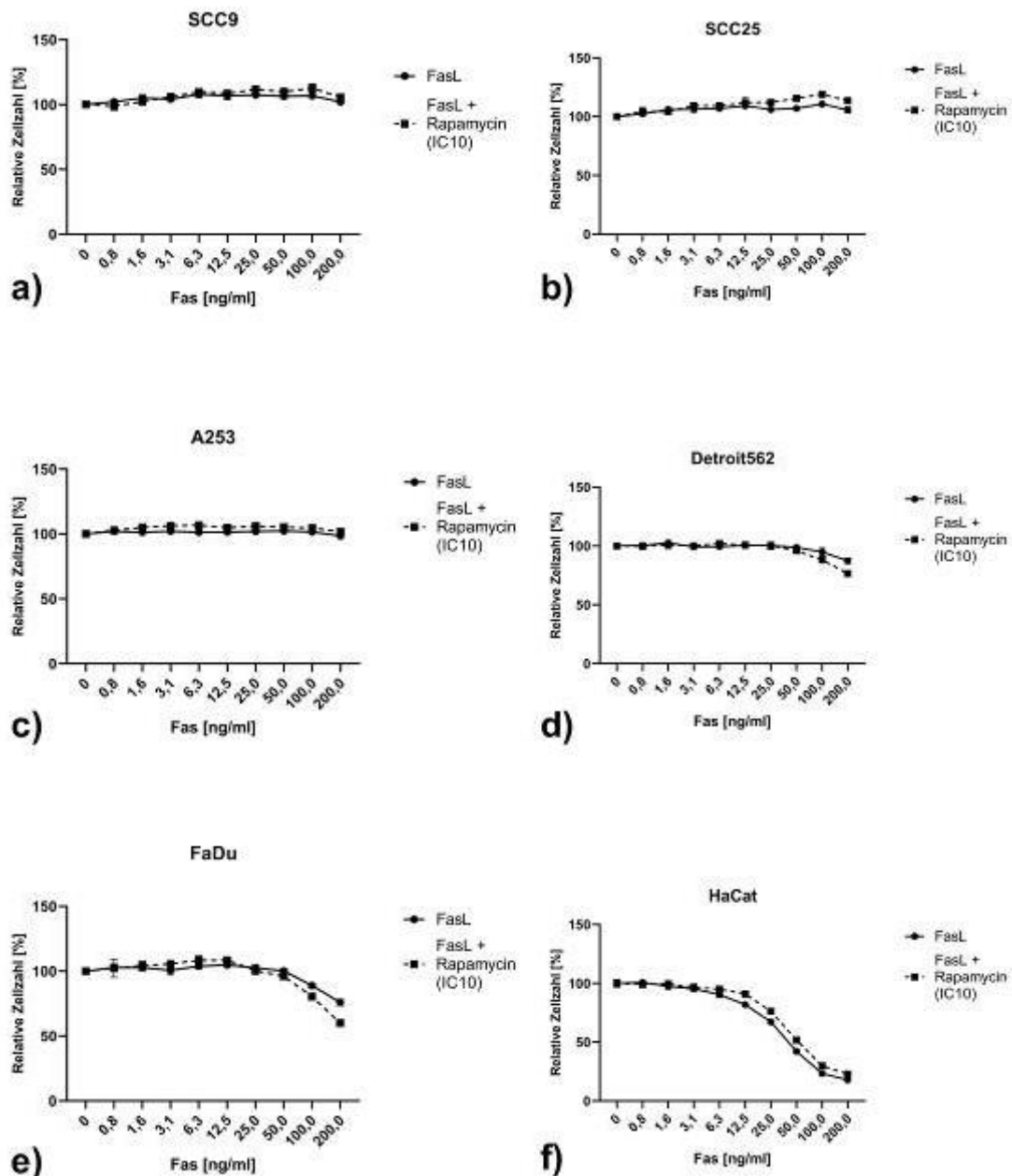


Abbildung 19: Kombinationstherapie FasL und Rapamycin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. FasL wurde in \log_2 -Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und in Kombination mit konstanter IC_{10} -Konzentration Rapamycin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1×10^4 Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet ($n=3$). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm. So reagierten die Zelllinien SCC9 und A253 mit keiner signifikanten Veränderung der Zellzahl auf FasL nach Kostimulation mit 100 nM Rapamycin und blieben weiterhin

resistent. Bei SCC25 erhöhte sich die relative Zellzahl ab einer FasL-Konzentration von $> 12,5$ ng/ml konstant um durchschnittlich etwa 8% bis zum Maximum des untersuchten Konzentrationsbereiches. Auch auf HaCaT zeigte sich ein ähnlich desensitivierender Effekt mit einer im Vergleich zur Monotherapie erhöhten halbmaximalen Wachstumshemmung von etwa 10 ng/ml und einer um 4,9% erhöhten Anzahl lebender Zellen bei maximaler Wachstumshemmung. FaDu und Detroit562 reagierten am oberen Ende des untersuchten Konzentrationsbereiches > 50 ng/ml mit einer stärkeren Zellregression im Vergleich zur FasL-Monotherapie. Da bei beiden Zelllinien die maximale Wachstumshemmung oberhalb der initial applizierten Konzentration von 200 ng/ml FasL und damit außerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches lag, können keine Aussagen über diese getroffen werden. Bei einer FasL-Konzentration von 200 ng/ml konnten die größten Unterschiede in der Reaktivität festgestellt werden. So lagen bei FaDu bei der Kombinationstherapie 15,9% und bei Detroit562 10,8% weniger lebende Zellen vor als bei gleicher Konzentration in FasL-Monotherapie.

Schwache Veränderungen in der relativen Anzahl lebender Zellen konnten auch bei der Kostimulation mit $\text{TNF}\alpha$ in SCC25 und HaCaT festgestellt werden, jedoch hatte dies keinen signifikanten Einfluss auf eine Sensitivierung der Zellen gegenüber $\text{TNF}\alpha$ im Sinne einer Proliferationshemmung. Bei SCC25 erhöhte sich die relative Anzahl lebender Zellen um 8% bei der maximalen $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration von 200 ng/ml, während sie bei HaCaT sogar um 14% stieg. Bei den übrigen untersuchten Zelllinien blieb die relative Zellzahl bei dem kombinierten Einsatz von $\text{TNF}\alpha$ und Rapamycin unverändert (s. Abb. 20).

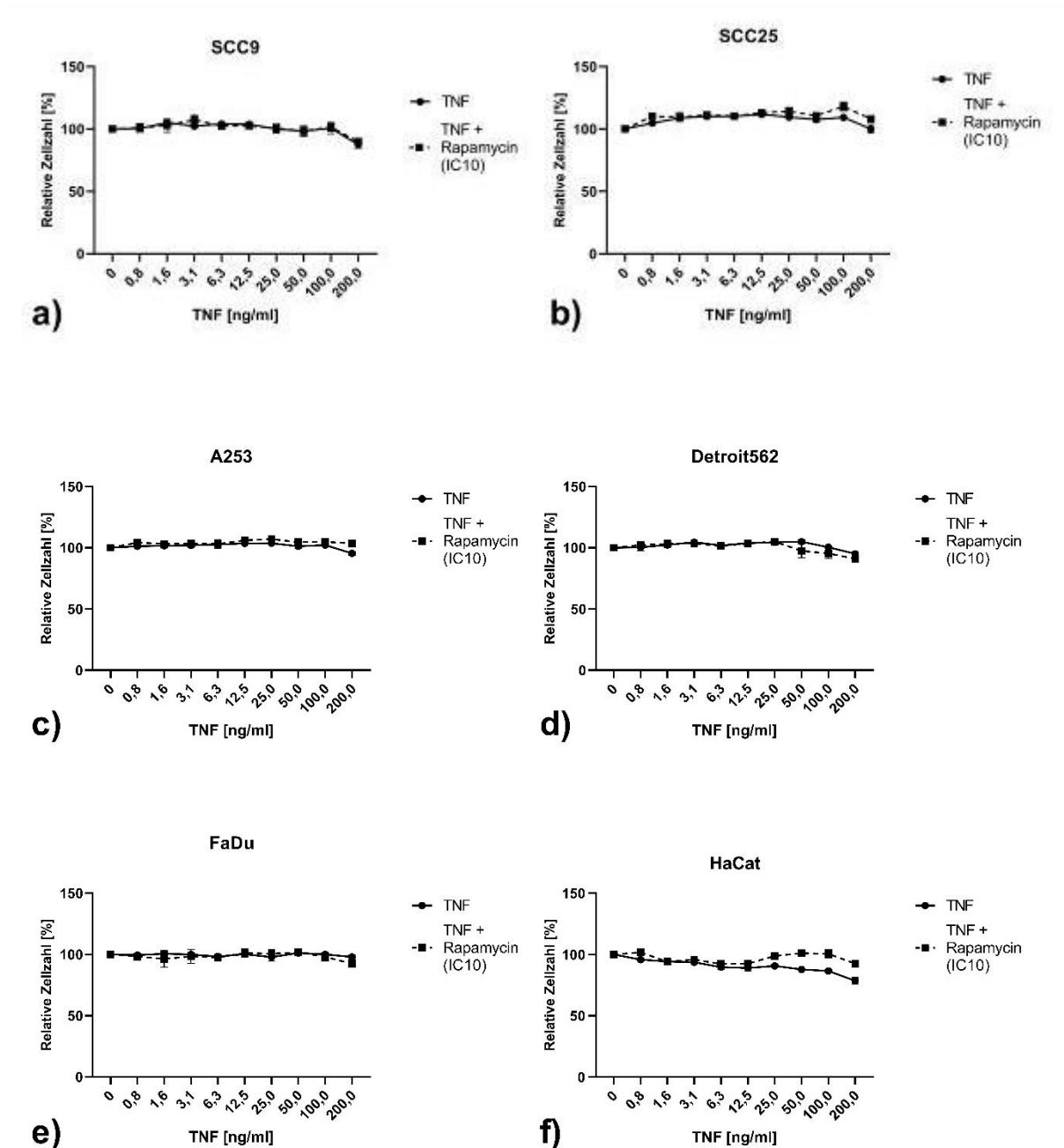


Abbildung 20: Kombinationstherapie TNF α und Rapamycin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. TNF α wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und in Kombination mit konstanter IC₁₀-Konzentration Rapamycin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

In Kombination mit Cisplatin konnte bei zwei Zelllinien (SCC9 und SCC25) eine schwache Veränderung der maximalen Wachstumshemmung beobachtet werden. So lagen bei Konzentrationen von 100 μ M Cisplatin 20,2% mehr lebende SCC9-Zellen vor als bei der Cisplatin-Monotherapie. Dieser desensitivierende Effekt trat bereits ab einer Konzentration von > 1 μ M Cisplatin kontinuierlich auf und vergrößerte sich

konstant bis zu einem durchschnittlichen Unterschied von circa 20% lebender Zellen ab einer Konzentration > 50 μM (s. Abb. 21).

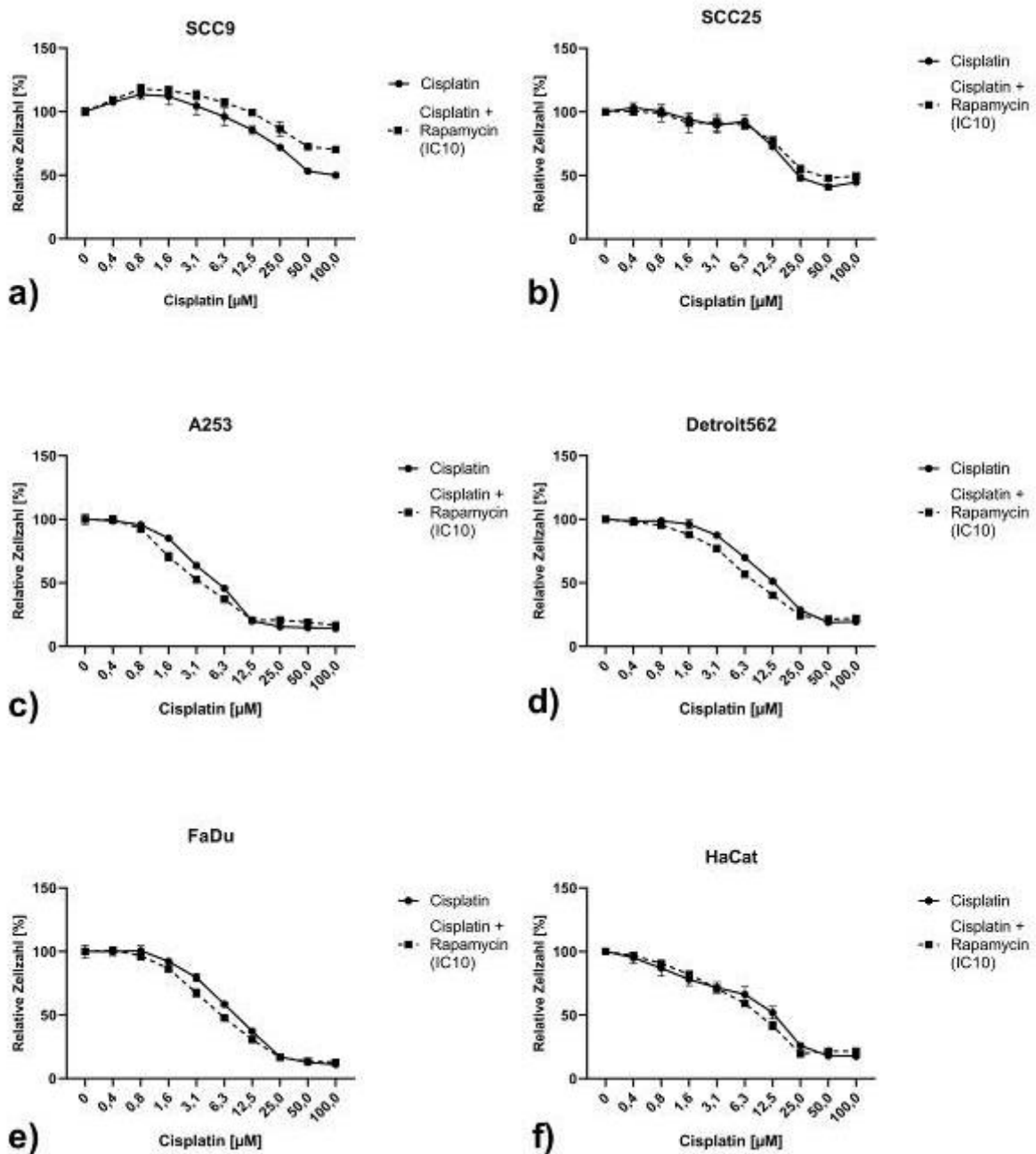


Abbildung 21: Kombinationstherapie Cisplatin und Rapamycin. Zellregressionsanalyse nach Kombinationstherapie im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. Cisplatin wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 μM appliziert und in Kombination mit konstanter IC₁₀-Konzentration Rapamycin für 72 h im Brutschrank inkubiert (1×10^4 Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

Einen ähnlichen, aber deutlich schwächeren Effekt zeigte sich bei SCC25, dessen maximale Wachstumshemmung bei einer Konzentration von 50 μM mit einem

Unterschied von 6,9% lebender Zellen lag. Bei den übrigen untersuchten Zelllinien konnte kein signifikanter Unterschied in der relativen Anzahl lebender Zellen bei maximaler Hemmkonzentration festgestellt werden, jedoch waren bei A253, FaDu und Detroit562 geringere Konzentrationen Cisplatin nötig, um eine halbmaximale Wachstumshemmung zu erreichen. Bei A253 betrug dieser Unterschied etwa 2 μM , bei FaDu etwa 4 μM und bei Detroit562 etwa 8 μM . HaCaT reagierte weitestgehend mit einer unveränderten Zellzahl auf den kombinierten Einsatz von Cisplatin und Rapamycin.

3.4 Analyse des Einflusses der Methioninrestriktion auf die FasL-Sensitivität

Die MR stellt neben dem Einsatz von u.a. Autophagie-Inhibitoren oder -induktoren wie Bafilomycin oder Rapamycin eine weitere Möglichkeit zur Modulation der Autophagie in Zellen dar (s. 1.3.2.2). Ihre antitumoralen Effekte machen sie auch für weitere Forschung im Bereich der HNSCC interessant. In den folgenden Versuchsreihen wurde untersucht, ob es durch die Restriktion der essentiellen Aminosäure Methionin zu einer FasL-Sensitivierung im Sinne einer erhöhten Proliferationshemmung in den Zelllinien FaDu und Detroit562 kommt. Diese Zelllinien reagierten in der Kombinationstherapie mit Chloroquin mit der stärksten Sensitivitätsänderung und in Versuchen unserer Arbeitsgruppe am sensitivsten auf die MR innerhalb der Gruppe der HNSCC-Zelllinien. Die Zellen wurden vor Beginn der Stimulation mit FasL für 72 h in Methionin-armem Kulturmedium (1 mg/l Met.) stimuliert, um eine Umstellung des Zellmetabolismus zu gewährleisten. Die Zellen wurden regelmäßig visuell im Zellmikroskop auf Vitalität geprüft und das Kulturmedium bei Farbumschlag entsprechend gewechselt. Für den Versuch wurde frisches, Methionin-armes Medium verwendet und 200 ng/ml FasL in \log_2 -Verdünnungsreihen aufgetragen sowie für 72 h im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle diente eine FasL-Verdünnungsreihe der Zellen in normalem Kulturmedium. Die Auswertung erfolgte im Zytotoxizitätsassay. FaDu reagierte in der Kontrolle mit einer maximalen Zellreduktion von 34,6% bei maximaler Hemmkonzentration von 200 ng/ml FasL. Die Zellen, die mit Methionin-armem Kulturmedium angesetzt wurden, zeigten keine signifikante Veränderung der maximalen und halbmaximalen Wachstumshemmung im untersuchten Konzentrationsbereich (37,3% bei 200 ng/ml FasL). Detroit562 wurde durch den

Einfluss der MR sensitiver gegenüber einer FasL induzierten Proliferationshemmung. Dies zeigte sich in einer um 30,2% erniedrigten relativen Zellzahl bei maximaler Wachstumshemmung im Vergleich mit dem Kontrollversuch. Auffällig ist außerdem, dass der Effekt bereits bei sehr niedrigen Verdünnungen von < 1 ng/ml FasL auftrat. Auch die Konzentration der halbmaximalen Wachstumshemmung erniedrigte sich um etwa 5 ng/ml im Vergleich zu dem Kontrollversuch (s. Abb. 22).

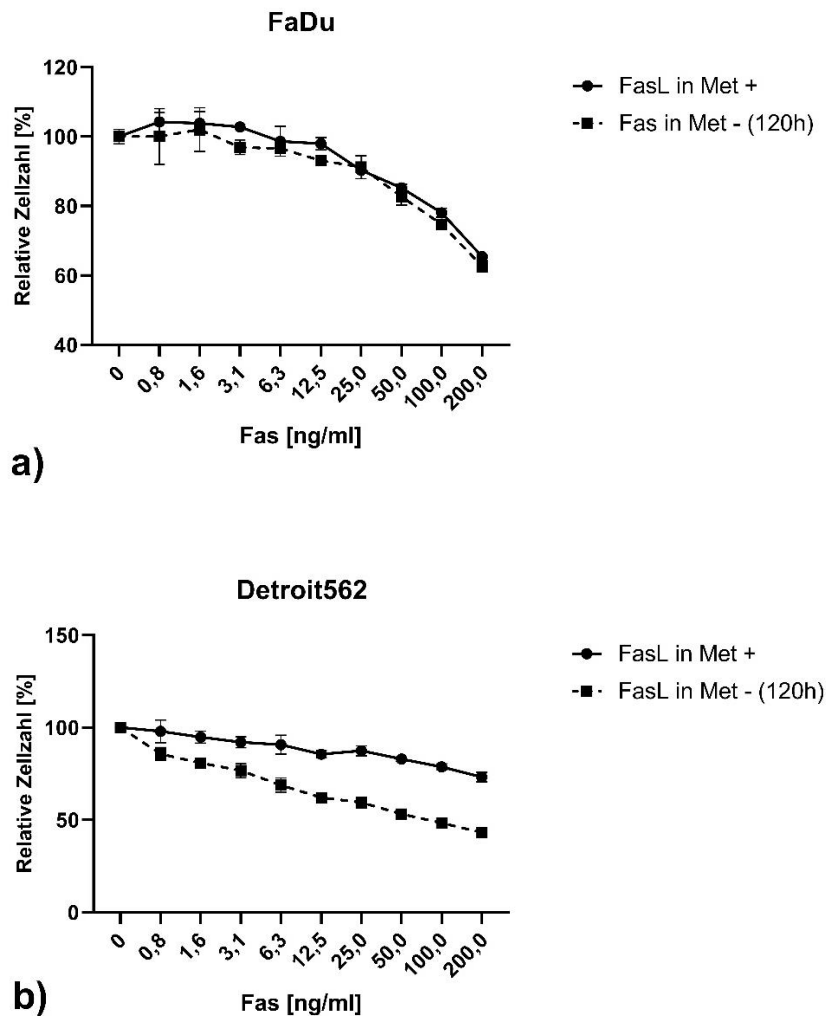


Abbildung 22: Methioninrestriktion und FasL. Zellregressionsanalyse nach MR im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. FasL wurde in log₂-Verdünnungsstufen ausgehend von 200 ng/ml appliziert und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1x10⁴ Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Im Vorlauf wurden die Zellen für den Versuch für 72 h auf Methionin-armes Kulturmedium umgestellt. Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm. **Analyse der TNF α -Sensitivität nach Kostimulation mit Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin unter Methioninrestriktion**

In den Versuchsreihen zur Kostimulation der einzelnen Autophagie-Inhibitoren Chloroquin und Bafilomycin und des Autophagie-Induktors Rapamycin mit TNF α konnte keine signifikante Sensitivierung auf TNF α durch den Einfluss der Autophagiemodulatoren im Sinne einer erhöhten Proliferationshemmung beobachtet werden. In den folgenden Versuchen wurden Wachstumsraten mit Hilfe der maximalen relativen Zellzahl analysiert, um sowohl singuläre Effekte einzelner Autophagiemodulatoren und der MR auf die maximale relative Zellzahl, als auch kombinatorische Effekte im Sinne einer TNF α -Sensitivierung miteinander zu vergleichen. Analog zu den vorherigen Versuchsreihen zum Einfluss der MR auf das Proliferationsverhalten der Zellen unter dem Einfluss von FasL wurden FaDu und Detroit562 für 3 Tage in Methionin-armem Kulturmedium (1 mg/l Met.) kultiviert, bevor die Zellen für die Versuchsreihen verwendet wurden. Als Kontrolle dienten Zellen, die in regulärem Kulturmedium kultiviert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit den autophagiemodulierenden Wirkstoffen Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin. Für Chloroquin und Bafilomycin wurden die vorher ermittelten IC₁₀-Werte, für Rapamycin 100 nM verwendet. Da sowohl FaDu als auch Detroit562 in vorherigen Versuchen weitestgehend ohne signifikante Änderungen der Zellzahl auf die Inkubation mit TNF α reagierten, wurde für diese Versuchsreihe die höchste untersuchte Konzentration von 200 ng/ml verwendet. Zur Auswertung wurden die maximalen Änderungen der relativen Zellzahl der Untersuchungs- und der Kontrollgruppen miteinander verglichen. Die relative Zellzahl in der Kontrollgruppe mit regulärem Kulturmedium ohne applizierten Wirkstoff oder TNF α wurde auf 100% genormt (s. Abb. 23).

FaDu reagierte in der Kontrollgruppe mit regulärem Kulturmedium auf den alleinigen Einfluss von Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin mit einer leichten Änderung der relativen Zellzahl. Die Stimulation mit 200 ng/ml TNF α erbrachte in der Kontrolle, wie in den vorherigen Versuchen ebenfalls beobachtet, keine signifikante Reduktion der relativen Zellzahl. Auch durch die Kostimulation mit Rapamycin konnte keine Sensitivierung auf TNF α erzielt werden. Leichte Sensitivierungen erfolgten bei der Kostimulation mit Chloroquin und Bafilomycin, bei denen die relative Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Applikation von TNF α sank (10,2% bei Chloroquin, 4,9% bei Bafilomycin). Eine deutliche Wachstumshemmung erzielte die MR in allen Untersuchungsgruppen. Während die relative Zellzahl der Kontrolle mit MR im

Vergleich zur Kontrolle mit regulärem Kulturmedium um 24% sank, so konnte der kombinierte Einfluss der MR mit Rapamycin eine gesteigerte Wachstumshemmung um 36,7% erzielen.

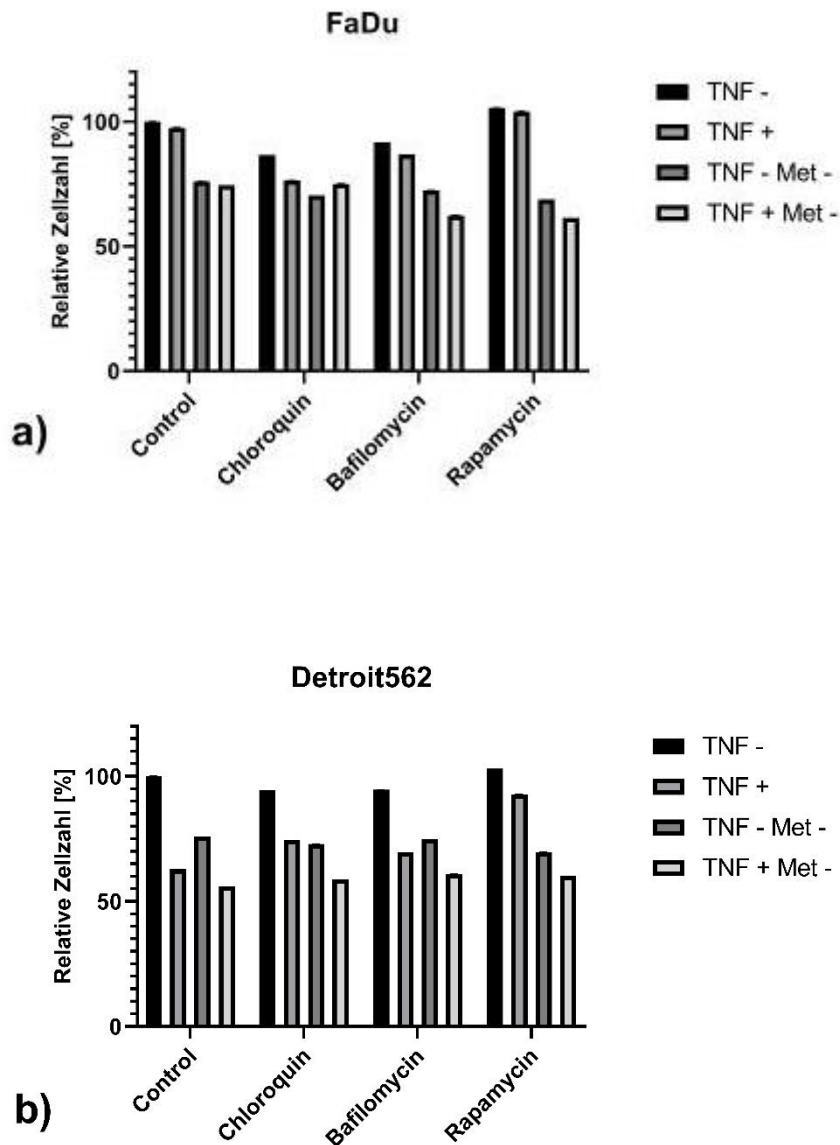


Abbildung 23: Methioninrestriktion in Kombination mit Autophagie-Modulatoren und TNF α . Zellregressionsanalyse nach kombinatorischer MR mit TNF α und Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. 200 ng/ml TNF α wurden pro Well appliziert und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1×10^4 Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Im Vorlauf wurden die Zellen für den Versuch für 72 h auf Methionin-armes Kulturmedium umgestellt. Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

Auch für Chloroquin und Bafilomycin ergab die Kombination mit der MR eine signifikante Reduktion der relativen Zellzahl um 16,2% für Chloroquin bzw. 19,3% für Bafilomycin. Auf die TNF α -Sensitivität hatte diese Kombination allerdings keinen bzw.

einen geringen Einfluss. So reagierten die Zellen in der Kontroll- und in der Chloroquin-Gruppe mit einer nicht signifikant veränderten, relativen Zellzahl auf die TNF α -Stimulation. In der Chloroquin-Gruppe erhöhte sich sogar die relative Zellzahl um 4,6%. Eine leichte Sensitivierung fand in der Bafilomycin- und Rapamycin-Gruppe statt, mit einer reduzierten, relativen Zellzahl um 10% bei Bafilomycin bzw. 7,4% bei Rapamycin. In der Rapamycin-Gruppe konnte auch die insgesamt größte Wachstumshemmung bei noch 61,4% lebender Zellen erzielt werden. Damit lag die relative Zellzahl nach TNF α -Applikation im Vergleich zur Kontrolle um 13,1% niedriger.

Auch Detroit562 reagierte in der Kontroll-Gruppe mit regulärem Kulturmedium auf den alleinigen Einfluss von Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin mit einer leichten Änderung der relativen Zellzahl. Die Zellen reagierten auf die alleinige Applikation von 200 ng/ml TNF α mit einer signifikanten Reduktion der relativen Zellzahl um 37,1%. Dies entsprach der größten Reduktion der relativen Zellzahl bei den Versuchen mit regulärem Kulturmedium. Die Kostimulation mit den einzelnen Wirkstoffen führte ebenfalls zu Proliferationshemmungen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. So konnten bei der Kostimulation mit Chloroquin noch 74,6% lebende Zellen, mit Bafilomycin noch 69,7% lebende Zellen festgestellt werden. Die geringste Reduktion erzeugte die Kombination von TNF α mit Rapamycin bei noch über 92% lebenden Zellen. Wie bei FaDu konnte auch bei Detroit562 unter dem Einfluss der MR eine deutliche Proliferationshemmung beobachtet werden. Im Gegensatz zum regulären Kulturmedium lagen in der Kontrollprobe der MR ohne Applikation weiterer Wirkstoffe bereits knapp 25% weniger Zellen vor. Auch die Kostimulation mit den einzelnen Wirkstoffen führte zu einer Reduktion der relativen Zellzahl mit ähnlichen Werten. Hier konnte Rapamycin mit 69,6% noch lebenden Zellen die größte Reduktion erzeugen, während bei Chloroquin und Bafilomycin mit 72,9% und 74,8% ähnliche Werte wie bei der alleinigen MR beobachtet wurden. Die größte Proliferationshemmung konnte in den Versuchsreihen der kombinatorische Einsatz der MR mit TNF α erzeugen, bei der es zu einer maximalen Reduktion der Zellzahl um ca. 44% kam. Die Kostimulation mit Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin führte zu deutlichen Wachstumshemmungen mit einer um etwa 40% verringerten Anzahl lebender Zellen in allen Gruppen.

3.6 Analyse der IL-8 Expression

Da $\text{TNF}\alpha$ als vielseitiges Zytokin nicht allein Einfluss auf Apoptose und Zelldifferenzierung hat, sondern kontextabhängig vor allem inflammatorisch unter anderem auch die Ausschüttung von anderen Zytokinen anregt, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Expression von Interleukin-8 (IL-8) analysiert. IL-8 spielt eine bedeutende Rolle bei inflammatorischen Prozessen der Tumormikroumgebung und steht im Zusammenhang mit pathogenetisch bestimmenden Faktoren, wie Tumorprogression, Angiogenese und Metastasierung (205). Der Versuchsaufbau und die Durchführung erfolgten analog zur vorherigen Versuchsreihe (s. 3.5). Um die Ergebnisse zu vergleichen, erfolgte eine Normierung der IL-8 Expression der Kontrollgruppe mit regulärem Kulturmedium ohne applizierten Wirkstoff oder $\text{TNF}\alpha$ auf 100%. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit regulärem Kulturmedium zeigte sich bei der alleinigen Stimulation mit den Autophagiemodulatoren signifikant veränderte IL-8 Expressionen in der Zelllinie FaDu. Bei der Chloroquin- und Bafilomycin-Gruppe stieg die Expression um 24,7% bzw. 19,1%, während bei der Rapamycin-Gruppe eine verringerte Expression um etwa 26% im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte. Die zusätzliche Applikation von $\text{TNF}\alpha$ bewirkte in allen Gruppen einen Anstieg der IL-8 Expression, jedoch in unterschiedlich starkem Ausmaß. In der Kontrollgruppe stieg die IL-8 Expression um etwa 37% im Vergleich zum Wert ohne $\text{TNF}\alpha$ Applikation an, genauso wie innerhalb der Rapamycin-Gruppe. Bei den Versuchen mit regulärem Kulturmedium erzielte die Kombination von Rapamycin und $\text{TNF}\alpha$ insgesamt den geringsten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle (11,3%). Bei Chloroquin konnte ein höherer Anstieg um 77,6% beobachtet werden, während bei Bafilomycin die IL-8 Expression um 49,7% anstieg. Die Umstellung auf Methionin-armes Kulturmedium sorgte in allen Gruppen für einen Anstieg der IL-8 Expression (s. Abb 24).

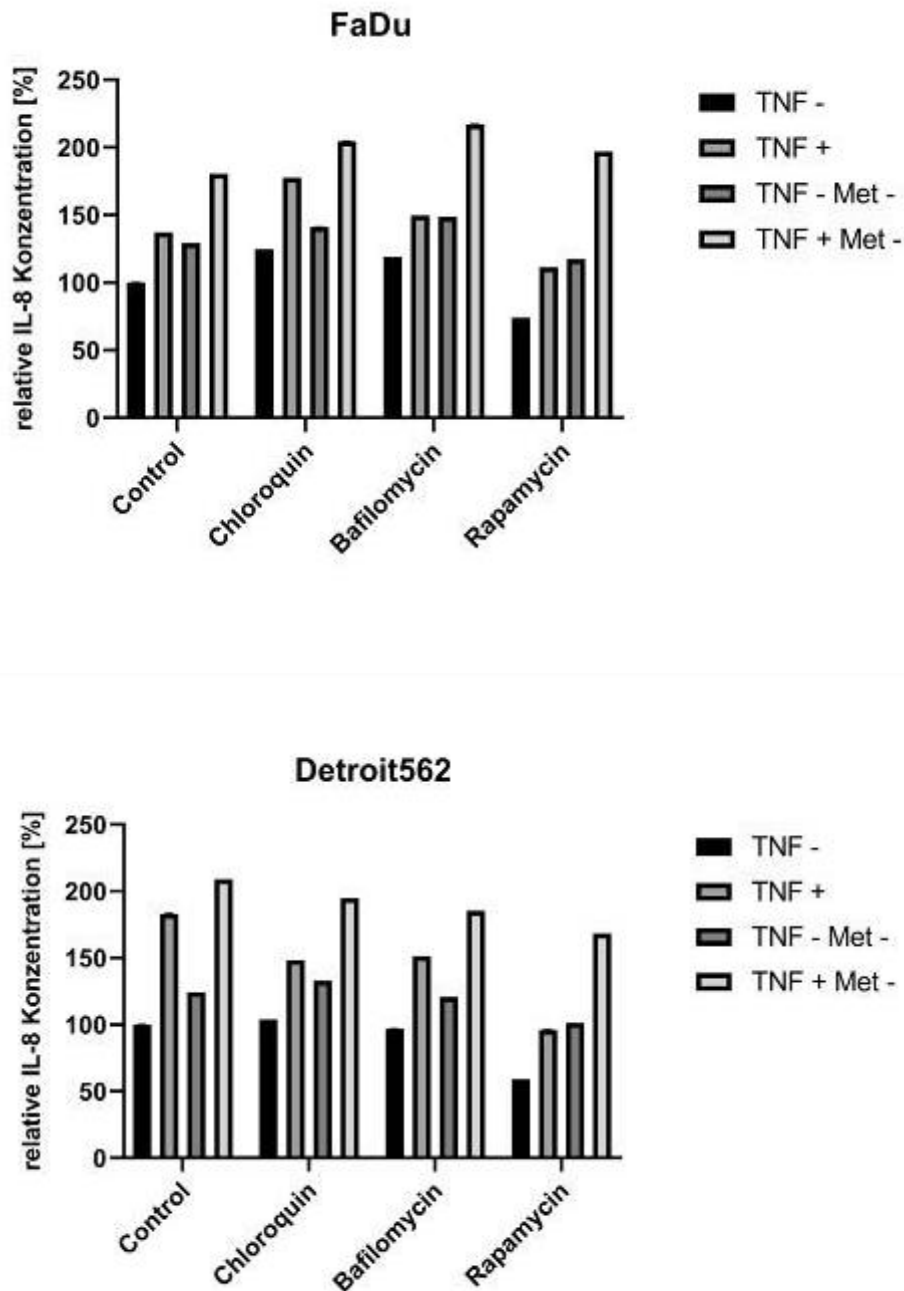


Abbildung 24: Analyse der IL-8 Expression. IL-8-Expressionsanalyse nach kombinatorischer MR mit TNF α und Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin im Kristallviolett-Zytotoxizitätsassay. 200 ng/ml TNF α wurden pro Well appliziert und für 72 h im Brutschrank inkubiert (1×10^4 Zellen/Well, s. Material und Methoden 2.2). Im Vorlauf wurden die Zellen für den Versuch für 72 h auf Methionin-armes Kulturmedium umgestellt. Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt und hieraus Mittelwerte berechnet (n=3). Dargestellt ist die Zusammenfassung der Experimente in jeweils einem Diagramm.

Die höchsten Anstiege konnten auch hier in der Chloroquin- und Bafilomycin-Gruppe beobachtet werden mit einer erhöhten Expression um etwa 41% bzw. 48,7%. In der Kontroll-Gruppe wurde ein Anstieg um 29,3% verzeichnet. Auch hier bewirkte die Stimulation mit Rapamycin die insgesamt geringste IL-8 Expression im Vergleich mit

allen Gruppen. Im Unterschied zur Expression bei regulärem Kulturmedium stieg jedoch bei der MR die Expression um 17,3%. Analog zu den Ergebnissen mit regulärem Kulturmedium stieg auch bei der MR nach zusätzlicher Stimulation mit TNF α die IL-8 Expression in allen Gruppen an. Auffällig sind hier vor allem die höheren Maximalanstiege im Vergleich zu den Versuchen mit regulärem Kulturmedium. In der Kontrollgruppe stieg die IL-8 Expression unter MR nach Stimulation mit TNF α um 80,5% an. Bei den Wirkstoffgruppen konnten höhere Anstiege festgestellt werden. Bei der Rapamycin-Gruppe stieg die Expression um 96,9%, bei der Chloroquin-Gruppe um 104,5% und bei der Bafilomycin-Gruppe um 117,1% im Vergleich zur Kontrolle.

Die bei FaDu beobachteten Tendenzen der unterschiedlichen IL-8 Expression bei den einzelnen Versuchsgruppen zeigten sich auch so bei Detroit562. Auffällig sind vor allem Unterschiede in den Versuchen mit regulärem Kulturmedium ohne TNF α . Hier bewirkten Chloroquin und Bafilomycin keine signifikanten Expressionsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Analog zu den Ergebnissen bei FaDu konnte bei Rapamycin auch hier eine deutlich verringerte IL-8 Expression um 40,8% beobachtet werden. Dieser Wert stieg durch die zusätzliche Stimulation mit TNF α zwar um etwa 37% an, blieb aber immer noch unter dem auf 100% normierten Expressionswert der Kontrolle. In der Kontroll-Gruppe hingegen konnte der höchste Anstieg um 83,1% verzeichnet werden. Auch Chloroquin und Bafilomycin sorgten für eine erhöhte Expression, jedoch in geringerem Ausmaß (48,4% bzw. 51,4%). Die Umstellung auf die MR bewirkte wie bei FaDu ebenfalls einen Anstieg der IL-8 Expression. Während sowohl in der Kontroll- als auch in der Chloroquin- und Bafilomycin-Gruppe ähnlich erhöhte Expressionswerte beobachtet werden konnten (Kontroll-Gruppe: 24,4%, Chloroquin-Gruppe: 33%, Bafilomycin-Gruppe: 20,7%), änderte sich in der Rapamycin-Gruppe die Expression im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant. Auffällig ist hier allerdings der Anstieg innerhalb der Rapamycin-Gruppe im Vergleich zum Expressionswert bei regulärem Kulturmedium (etwa 42%), was dem höchsten relativen Anstieg innerhalb der einzelnen Gruppen entspricht. Die zusätzliche Applikation von TNF α bei der MR sorgte ebenfalls für einen deutlichen Anstieg der IL-8 Expression. Der höchste Anstieg konnte in der Kontroll-Gruppe beobachtet werden (109,1%). In der Chloroquin- und Bafilomycin-Gruppe konnten ebenfalls deutliche Anstiege verzeichnet werden (94,9% bzw. 85,3%). Die geringste Expressionserhöhung ließ sich bei der Rapamycin-Gruppe beobachten, bei der die IL-8 Expression um 68,4% im Vergleich zur Kontrolle anstieg.

3.7 Analyse der Autophagiemodulation auf Proteinebene

Zur Analyse des Einflusses der eingesetzten Wirkstoffe auf die Autophagie wurde eine SDS-Page durchgeführt. Ein geeigneter und ubiquitär eingesetzter Marker ist LC3-II, da sich die Menge an LC3-II proportional zu der Menge an Autophagosomen und Autophagie-bezogenen Strukturen in der Zelle verhält (206). Dabei ist zu beachten, dass sowohl induzierende als auch inhibierende Wirkstoffe zu einem Anstieg der LC3-II-Konzentration führen können. Läuft die Autophagie verstärkt ab, wird mehr LC3-II von der Zelle exprimiert. Rapamycin, als autophagieinduzierender Wirkstoff, diente als Positivkontrolle nach 24 Stunden. Eine Inhibition vor allem später Stadien der Autophagie führt zu einer Akkumulation von Autophagosomen und damit verbunden ebenfalls erhöhten LC3-II-Konzentrationen. Die LC3-II-Expression nach Anwendung der Autophagie-inhibierenden Wirkstoffe Chloroquin und Bafilomycin wurde nach 6 Stunden sowie 24 Stunden gemessen und mit der jeweiligen Kontrolle verglichen. Zur Standardisierung des Proteinauftrags wurde Tubulin- α detektiert. LC3-II wurde unter Kontrollbedingungen von allen untersuchten Zelllinien exprimiert. Auffällig war hierbei, dass vor allem bei FaDu und Detroit562 ein stärkeres Signal detektiert wurde, als bei SCC9, SCC25 und der Referenzzelllinie HaCaT. Rapamycin führte in allen Zelllinien zu einem verstärkten LC3-II-Signal im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle. Bei den Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und HaCaT konnten zeitliche Unterschiede nach 6 Stunden und 24 Stunden unter Kontrollbedingungen festgestellt werden, wobei nach 24 Stunden die Signalstärke im Vergleich erhöht war. Lediglich bei SCC25 ließen sich keine zeitlichen Unterschiede in der LC3-II-Expression sicher feststellen. Auch die Autophagie-Inhibitoren Chloroquin und Bafilomycin bewirkten in allen Zelllinien eine LC3-II-Expression mit Detektion eines Signals. Vor allem in der Referenzzelllinie HaCaT konnten nach 24 Stunden deutlich erhöhte Signalstärken detektiert werden. Auch bei FaDu und Detroit562 konnten erhöhte Signalstärken bei der Anwendung von Chloroquin und Bafilomycin festgestellt werden. Einen quantitativen Unterschied zur Kontrolle ließ sich allerdings nicht sicher feststellen. Dies gilt auch für die Zelllinien SCC9 und SCC25, wobei sich deren Signale insgesamt schwächer darstellten (vgl. Abb. 25).

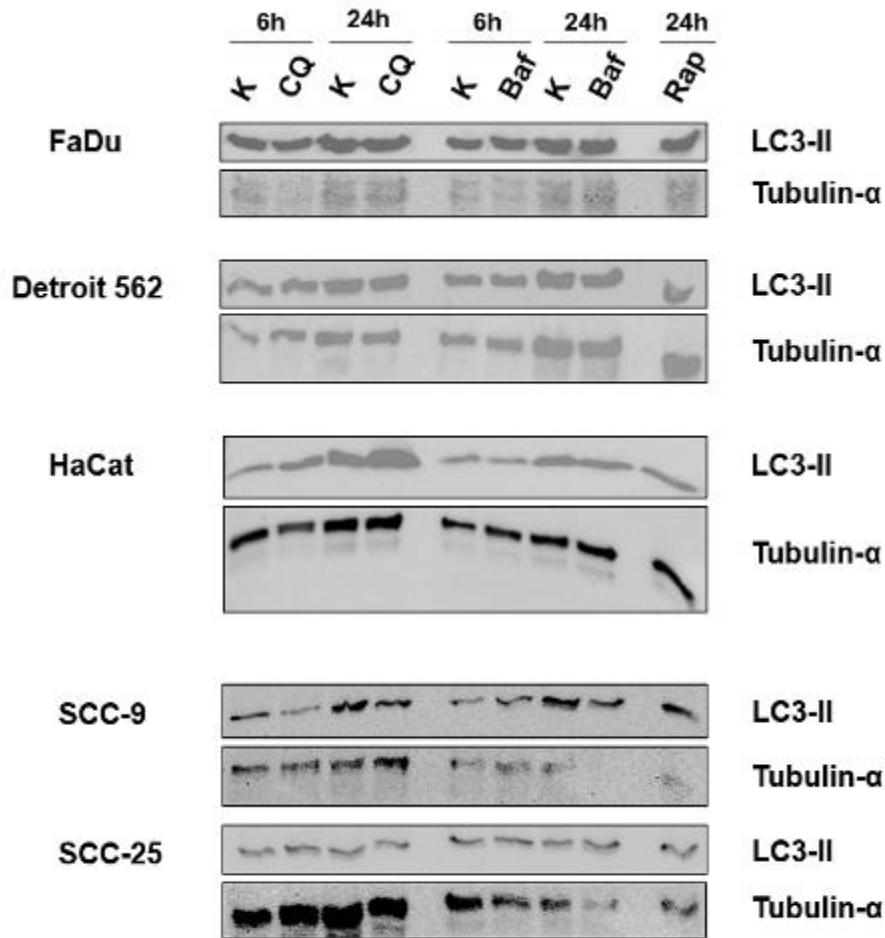


Abbildung 25: Analyse der LC3-II-Expression nach Stimulation mit autophagiemodulierenden Wirkstoffen. Die Zellen wurden mit der IC_{10} -Konzentration von Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin stimuliert. LC3-II wurde aus Vollzelllysaten mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Detektion von LC3-II und Tubulin- α als Ladungskontrolle erfolgte durch den Immunoblot. Konstitutive LC3-II-Expression konnte unter Kontrollbedingungen bei allen Zelllinien detektiert werden. Rapamycin diente als Positivkontrolle. Bei der Anwendung von Chloroquin und Bafilomycin konnten zeit- und zelllinienabhängig erhöhte LC3-II-Expressionslevel festgestellt werden.

4. Diskussion

Die kontextabhängige Wirkung der Autophagie auf die Proliferation von Tumorzellen resultiert aus den notwendigen, erhöhten metabolischen Anforderungen und kann je nach Stadium vor einer Tumorentstehung schützen oder das Wachstum solider Tumore fördern. So hat die Autophagie direkten Einfluss auf die von Hannahan und Weinberg postulierten Merkmale einer Tumorzelle, indem sie unter anderem eine kritische Rolle bei der Replikation und Metastasierung spielt (207). Die ambivalente Funktion der Autophagie stellt außerdem eine Herausforderung für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und deren potenziellen Einsatz im klinischen Kontext dar. Ein besseres Verständnis darüber, ob die Autophagie präventiv der Entstehung von HNSCC entgegenwirkt oder ursächlich für dessen Wachstum ist, wird eine entscheidende Rolle bei der Frage spielen, wie Patienten mit HNSCC in Zukunft von einer Modulation der Autophagie profitieren können. Diverse Autophagie-modulierende Pharmazeutika befinden sich bereits in präklinischer und klinischer Anwendung und wurden an anderer Stelle ausführlich beschrieben (s. 1.3.1 und 1.3.2).

Die HNSCC-Zelllinien wiesen in der vorliegenden Arbeit insgesamt eine schwache apoptotische Responsivität gegenüber der Anwendung des extrinsischen Todesliganden FasL auf. Während bei Detroit562 und FaDu im oberen Konzentrationsbereich zwischen 100 ng/ml und 200 ng/ml zellregressive Effekte beobachtet werden konnten, waren die Zelllinien SCC9, SCC25 und A253 resistent. Lediglich die Referenzzelllinie HaCaT zeigte ein sensibles Verhalten mit effektiver Zellzahlreduktion. In der Tat zeigen auch andere Studien, dass die meisten Tumorzellen resistent gegenüber FasL-induzierter Apoptose sind, selbst wenn sie hohe Expressionslevel an Fas-Rezeptoren (FasR) auf ihrer Zelloberfläche vorweisen (208). FasL bindet an FasR auf der Zelloberfläche und führt zur Ausbildung des Multiproteinkomplexes DISC (death-inducing signaling complex) und ist essentiell für die Einleitung der Apoptose (209). Die physiologische Relevanz bleibt jedoch weiter unklar, denn auch Tumorzellen exprimieren FasR und FasL, was bereits eine mögliche Resistenz gegenüber FasL-induzierter Apoptose vermuten lässt. Eine Strategie der Resistenzentwicklung ist die Regulierung der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche (210). Die Ergebnisse einer FACS-Analyse der FasR-Expression aus unserer Arbeitsgruppe konnten bei den hier verwendeten Zelllinien hohe Expressionslevel nachweisen und lassen darauf schließen, dass die geringe

apoptotische Responsivität der Zellen auf FasL nicht mit einer verminderten Rezeptorexpression zu erklären ist. Insofern ist es wahrscheinlich, dass intrazelluläre Mechanismen eine Induktion des apoptotischen Zelltodes verhindern. Eine mögliche Ursache könnte in dem komplexen Zusammenspiel von Apoptose und Autophagie liegen, die über viele gemeinsame Regulatoren miteinander interagieren. Dabei können Apoptose und Autophagie synergistische, aber auch antagonistische Effekte aufweisen und sowohl eine Zelltodinduktion fördern als auch verhindern (211). Auf Basis dessen wurden in den Kombinationsversuchen mögliche Sensitivierungseffekte der einzelnen Autophagiemodulatoren auf die Responsivität gegenüber FasL untersucht.

Auf die Anwendung des Zytokins TNF α reagierten die Zelllinien in dieser Arbeit mit keiner signifikant veränderten Zellzahlreduktion. Lediglich HaCaT und Detroit562 zeigten bei der höchsten angewandten Konzentration leichte zellregressive Tendenzen in den Monotherapien. Auffällig war eine erhöhte Zellzahlreduktion von Detroit562 in den Kombinationsversuchen mit MR, Autophagiemodulation und TNF α . Diese abweichenden Ergebnisse lassen sich hier vor allem auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen beider Versuchsreihen zurückführen, durch die es zu Abweichungen kommen kann. TNF α besitzt vielfältige Funktionen, die sich kontextabhängig unterscheiden, über zwei unterschiedliche Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt werden und sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken können. Neben den zellulären Auswirkungen spielen TNF-Signalwege eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der inflammatorischen Immunantwort und der Etablierung einer inflammatorischen Tumormikroumgebung. Deswegen wurde außerdem der Einfluss von TNF α auf das Inflammasom durch beispielsweise Ausschüttung anderer Zytokine mit der Analyse der IL-8 Expression untersucht. Die IL-8 Expression korreliert mit Angiogenese und Metastasierung bei Tumoren und wirkt als ein zentraler, regulatorischer Faktor in der Tumormikroumgebung (212). In dieser Arbeit bewirkte TNF α eine deutliche Erhöhung der IL-8 Konzentration in den Zelllinien FaDu und Detroit562, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Damit konnte der Nachweis nicht-apoptotischer, TNF α induzierter Effekte auf die Zellen dieser Tumorzelllinien erbracht werden. TNF-Signalwege können in HNSCC-Tumorzellen über die Aktivierung von NF- κ B das Überleben und die Proliferation der Tumorzelle fördern, indem sie die Expression anti-apoptotischer Gene regulieren. Als potenter

Tumorsuppressor kann TNF α jedoch auch Apoptose in HNSCC-Tumorzellen über den FADD-Caspase8-Caspase3-Signalweg induzieren (213). Durch die enge Verknüpfung apoptotischer und autophagischer Proteine erscheint es wahrscheinlich, dass TNF α -vermittelte Effekte ebenfalls direkt oder indirekt Einfluss auf die Autophagie nehmen. Tatsächlich konnte die Autophagie als wichtiger, protektiver Mechanismus von Tumorzellen gegenüber TNF α -vermittelter Apoptoseinduktion durch T-Zellen ausgemacht werden (214). Aus diesem Grund erscheint eine Untersuchung des Einflusses der Autophagiemodulation auf TNF α -vermittelte Effekte sinnvoll. Dieser Frage wurde in den Kombinationstherapien mit den autophagiemodulierenden Wirkstoffen nachgegangen und wird in den jeweiligen Abschnitten diskutiert.

Essenzieller Bestandteil eines umfassenden Therapiekonzeptes für Patienten mit HNSCC-Tumoren ist die Chemotherapie. Als zytotoxisches Chemotherapeutikum wird Cisplatin bereits seit den 1970ern allein oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika oder einer Radiotherapie standardmäßig angewendet, sodass dessen Wirksamkeit bei HNSCC-Tumoren durch die langjährige Anwendung belegt ist (215). Dennoch ist die klinische Anwendung von Cisplatin durch Resistenzen limitiert und es wurden zahlreiche Versuche unternommen durch potenziell chemosensitivierende Wirkstoffe die antineoplastische Effektivität von Cisplatin zu steigern. Resistenzen gegen Cisplatin werden durch eine ganze Reihe unterschiedlicher Mechanismen erzeugt, wobei auch die Autophagie in den Tumorzellen durch eine Behandlung mit Cisplatin stark induziert wird. Unter anderem wurden Zellen dadurch vermehrt zur Apoptose gezwungen (216). Dies verdeutlicht das Potenzial autophagiemodulierender Wirkstoffe, die Wirksamkeit von Cisplatin zu steigern und dadurch möglicherweise Resistenzen zu überwinden. Auch in dieser Arbeit konnte durch die Anwendung von Cisplatin in allen Zelllinien dosisabhängige Zellzahlreduktionen erreicht werden, die sich untereinander in der maximalen Wachstumshemmung unterschieden. In der Kombination mit Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin wurde daraufhin ein möglicher, sensitivierender Effekt autophagiemodulierender Wirkstoffe auf die antineoplastische Aktivität von Cisplatin untersucht.

Die MR führt zu zahlreichen zellulären und metabolischen Veränderungen, unter anderem zu einer effektiven Induktion der Autophagie über die Regulierung der mTOR-Aktivität (159). Viele Studien belegen außerdem die antineoplastischen Effekte

der MR auf unterschiedliche Tumorentitäten. Die Datenlage zu den Auswirkungen der MR auf HNSCC-Tumore ist allerdings sehr schwach. In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter, proliferationsinhibierender Effekt der MR auf zwei HNSCC-Zelllinien bereits nach wenigen Tagen nachgewiesen werden. Interessanterweise führte die Umstellung der Tumorzellen in Kultur auf Methionin-armes Kulturmedium allein zu einem signifikanten Anstieg der IL-8 Expression in den Zellen. Die erhöhte Expression eines proinflammatorischen Faktors wie IL-8 könnte der Tumorzelle somit als Schutzmechanismus dienen, da es unter anderem über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zu Zellüberleben, Angiogenese und Immunresistenz führt (217). Über welchen Mechanismus die MR zu einer erhöhten IL-8 Expression führt, bleibt bis dato unbekannt. Interessant wäre jedoch zum Beispiel herauszufinden, ob eine Inhibition der IL-8 Signalkaskade zu einer erhöhten antiproliferativen Wirkung der MR führt. Damit ließe sich die Verbindung von MR und IL-8 Expression besser verstehen und die antiproliferativen Eigenschaften der MR unter Umständen verbessern. In der kombinatorischen Anwendung mit Chloroquin, Bafilomycin, Rapamycin und TNF α konnte die MR keine signifikanten, additiven Effekte erzeugen, sodass eine synergistische Wirkung über den Mechanismus der Autophagie zumindest in Frage gestellt werden kann. In der Tat konnten für die antiproliferativen Effekte der MR bereits unterschiedliche Ursachen ausgemacht werden, die eine Autophagiemodulation durch die MR als deren alleiniger Auslöser unwahrscheinlich werden lässt (218). Hierbei ist in Zukunft weitere Forschung an Zellkulturen und Tiermodellen notwendig, um die Zusammenhänge besser zu verstehen. In der Kombination mit FasL zeigte sich eine Sensitivierung der Detroit562-Zellen auf das extrinsische Todessignal. Dass die MR effektiv Apoptose induzieren kann, wurde bereits in anderen Studien nachgewiesen (219,220). Da dieser Effekt bei den FaDu-Zellen nicht beobachtet werden konnte, bleibt die Frage nach den mechanistischen Hintergründen zu klären. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen insgesamt die antineoplastischen Wirkungen der MR und zeigen dessen Wirksamkeit auch bei HNSCC-Tumorzellen auf. Für eine Implementierung der MR in der Therapie von Patienten mit HNSCC-Tumoren werden jedoch weitere Untersuchungen notwendig sein, um herauszufinden, welche Patienten von einer adjuvanten MR profitieren können.

4.1 Bewertung der Autophagieinhibition in HNSCC

Durch den Einsatz der Autophagie-Inhibitoren Chloroquin und Bafilomycin konnten in allen Zelllinien des verwendeten Panels dosisabhängige Zellzahlreduktionen beobachtet werden. Die einzelnen Zelllinien unterschieden sich dabei vor allem in der maximalen Reduktion der Zellzahl und somit der Sensitivität gegenüber den Wirkstoffen. Ursächlich hierfür könnten intrinsische Resistenzmechanismen und Unterschiede in der Autophagieabhängigkeit sein. Vor allem das Konzept der Autophagieabhängigkeit ist von besonderer Bedeutung, da in anderen *in vivo* Studien ausschließlich autophagieabhängige Tumore auf eine pharmakologische Autophagieinhibition effektiv im Sinne einer Tumorreduktion reagierten. Bei autophagieunabhängigen Tumoren hingegen konnten Kombinationstherapien von Autophagie-Inhibitoren mit anderen Antitumormedikamenten sogar antagonistische Effekte erzeugen (221,222). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in diesem Kontext, dass eine Evaluation einzelner Tumore auf deren Autophagieabhängigkeit bei der Erforschung neuer Therapeutika, vor allem auch im Hinblick auf die individuelle Tumorthherapie, von zentraler Bedeutung sein wird. Ein weiterer Aspekt in der Beurteilung der Autophagie-Inhibitoren ist die Spezifität, mit der diese die Autophagie inhibieren. Im SDS-Page konnte ein hinreichender Effekt der Inhibitoren auf die Autophagie durch erhöhte Level an LC3-II nachgewiesen werden, sodass anzunehmen ist, dass die Inhibition der Autophagie durch die Wirkstoffe einen Beitrag zur Tumorreduktion leistet. Da die Wirkstoffe aber keine reinen, autophagiespezifischen Inhibitoren sind, sondern ebenfalls autophagieunabhängige Effekte aufweisen, bleibt weiterhin die Frage zu klären, inwieweit diese Effekte, neben dem Einfluss auf die Autophagie, für die Proliferationshemmung verantwortlich sind. Neue autophagiespezifische Inhibitoren finden sich bereits in präklinischer Anwendung und könnten in Zukunft eine Möglichkeit darstellen, den Autophagieprozess spezifischer therapeutisch zu beeinflussen und mögliche Limitationen bei der klinischen Anwendung unspezifischer Wirkstoffe zu reduzieren (223). Durch die Anwendung von Chloroquin konnten keine resistenten Zelllinien für FasL sensitiviert werden. Auch bei der responsiven Zelllinie HaCaT konnte kein Unterschied bei der FasL-induzierten Zellregression festgestellt werden. Interessanterweise führte die Kombinationstherapie mit Chloroquin zu einer signifikanten Sensitivierung bei den Zelllinien Detroit562 und FaDu, die sich im Gegensatz zu den anderen untersuchten, resistenten Tumorzelllinien bei den FasL-

Monotherapieversuchen responsiv zeigten. Auffällig war zudem, dass FaDu und Detroit562 im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine konstitutiv erhöhte LC3-II-Expression zeigten, woraus sich ableiten lässt, dass die Autophagie in diesen Zellen von größerer Bedeutung zu sein scheint als bei anderen Zellen. Bei diesen Zelllinien führen extrinsische Todesignale effektiver zum Zelltod als bei den resistenten Zelllinien, sodass von einer regulär ablaufenden, extrinsischen Apoptose ausgegangen werden kann. Eine mögliche Erklärung für den Sensitivierungseffekt von Chloroquin auf diese Tumorzellen liegt neben der Autophagieinhibition auch in der direkten und indirekten Interaktion von Chloroquin mit Proteinen der apoptotischen Signalkaskade. Chloroquin zeigte bereits in anderen Studien direkten Einfluss auf die Apoptose durch eine Erhöhung der Caspase-Aktivität (105). Caspasen nehmen auch eine Schlüsselrolle in der Verbindung von Apoptose und Autophagie ein, denn viele Atg-Proteine werden von Caspasen erkannt und gespalten (224). Doch auch Autophagosomen können durch direkte Aktivierung von Caspase-8 zu einer alternativen Apoptoseinduktion führen und den Zelltod ermöglichen. Diesen proapoptotischen Effekt könnten vor allem Fusionsinhibitoren wie Chloroquin noch verstärken, da sie zu einer Akkumulierung von Autophagosomen in der Zelle führen. Dies könnte auch für HNSCC-Tumorzellen, bei denen oftmals hohe Level an c-FLIP_L die Aktivierung der Procaspase-8 durch den DISC hemmen und damit eine regulär ablaufende Apoptose inhibieren, eine alternative Möglichkeit der Apoptoseinduktion bieten (225,226). Durch die nicht erfolgreiche Sensitivierung resistenter Tumorzellen bleibt dies jedoch für die Tumorzellen in dieser Arbeit zumindest zu hinterfragen. Eine andere Studie fand heraus, dass die proliferationshemmenden Effekte von Chloroquin allein nicht mit einer Induktion der Apoptose zu erklären sind, sondern vielmehr durch eine Reduktion der Expressionslevel von Cyclin D1 und damit verbunden einem Zellzyklusarrest zustande kommen (227). Die Frage, inwieweit die Sensitivierung Apoptose-responsiver Zellen durch Chloroquin durch direkte Autophagieinhibition erfolgt, oder ob dieser Effekt zusätzlich noch über andere Mechanismen vermittelt wird, bleibt somit offen. Jedoch verdeutlicht die erfolgreiche Sensitivierung FasL-responsiver Tumorzellen in dieser Arbeit das Potenzial von Chloroquin für ausgewählte Tumore. Durch weitere Untersuchungen und der Verbesserung des Verständnisses über die zellulären Mechanismen durch die Chloroquin seine Effekte vermittelt, könnte in Zukunft eine adjuvante, antitumorale Therapie mit Chloroquin noch effektiver eingesetzt werden und zusätzlich zur Entwicklung spezifischerer

Chloroquin-Derivate führen. Bafilomycin konnte in der Kombination mit FasL im Gegensatz zu Chloroquin keine signifikante Sensitivierung der Tumorzellen im Sinne einer Zellzahlreduktion erzeugen. Da sowohl Bafilomycin als auch Chloroquin über eine Veränderung der lysosomalen Funktion die Autophagie inhibieren, müssen andere Mechanismen zu den unterschiedlichen Ergebnissen in den Kombinationstherapien der beiden Autophagie-Inhibitoren führen. Mögliche Unterschiede wurden bereits in anderen Untersuchungen gefunden. Zusätzlich zu den Auswirkungen auf lysosomale Funktionen konnten inhibitorische Effekte von Bafilomycin und Chloroquin auf mTORC1 nachgewiesen werden, ohne dass Proteinlevel des mTORC1-Signalweges beeinflusst wurden und unabhängig von ihrer Funktion als Autophagie-Inhibitoren. Dabei konnten Unterschiede zwischen Bafilomycin und Chloroquin bei der Regulierung bestimmter Proteine durch Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel TFEB gefunden werden, einem Substrat von mTORC1, dass die Transkription lysosomaler und Autophagie-bezogener Gene steuert (228). Die Anwendung der beiden Autophagie-Inhibitoren in Kombination mit TNF α führte zu zelllinienabhängig unterschiedlichen Ergebnissen bei der Analyse der IL-8 Expression. Während bei Detroit562 eine signifikant geringere IL-8 Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt wurde, erhöhte sich die IL-8 Expression bei FaDu im Vergleich zur Kontrolle. Im Falle von Chloroquin korrelierte die IL-8 Erhöhung in dieser Zelllinie mit einer Proliferationshemmung bei der kombinatorischen Anwendung mit TNF α . Auch hier bleibt die Frage offen, ob es einen kausalen Zusammenhang gibt oder ob die Erhöhung der IL8-Level ein Ausdruck von Überlebensstrategien der Tumorzelle ist. Dass Chloroquin substantielle Effekte auf TNF-Signalwege hat und dadurch Einfluss auf den zellulären Metabolismus nimmt, wurde bereits an anderer Stelle beschrieben. Hierbei nimmt vor allem die TNF-NF- κ B-Signalachse eine besondere Stellung ein. Es konnte gezeigt werden, dass höhere Dosen Chloroquin (50 μ M) zu einer reduzierten NF- κ B-Aktivierung führten, unter anderem über eine Inhibition der Autophagie (229). Der zellregressive Effekt von Chloroquin trat bei FaDu in den Versuchen dieser Arbeit ab einer Dosis von > 50 μ M auf, sodass hier eine Verbindung vermutet werden kann. Jedoch ist zu hinterfragen, warum dieser Effekt lediglich bei einer Zelllinie auftrat und was diese von den anderen Zelllinien unterscheidet. Auch bei der Kombination mit TNF α konnte Bafilomycin keine proapoptischen Effekte erzielen. Die widersprüchlichen Effekte einer V-ATPase-Inhibition durch Bafilomycin zeigen auf, dass dessen Funktion entscheidend vom

zellulären Kontext abhängt und sowohl pro- als auch anti-apoptotische Auswirkungen haben kann (230). Durch die Anwendung von Chloroquin und Bafilomycin konnte keine Sensitivierung der Zelllinien auf Cisplatin erreicht werden. Chloroquin und Bafilomycin führten in der Zelllinie SCC9 im Gegenteil zu einer verringerten Apoptoserate, Chloroquin zusätzlich noch bei der Zelllinie SCC25. In einer Studie von Magnano et al. konnte gezeigt werden, dass Cisplatin Apoptose und Autophagie gleichermaßen induziert und dass eine Modulation eines der beiden Mechanismen zu einer Veränderung im anderen Mechanismus führt, sodass hier synergistische Effekte angenommen werden können. Interessanterweise bewirkte eine Autophagieinhibition in dieser Studie sowohl eine erhöhte, als auch eine erniedrigte Apoptoserate. Dies war abhängig vom verwendeten Inhibitor und dem damit verbundenen Zeitpunkt der Inhibition (231). Vor diesem Hintergrund lassen sich auch die Ergebnisse dieser Arbeit interpretieren, die für Chloroquin zunächst teils widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Hier wären weitere molekulare Untersuchungen notwendig, um herauszufinden, welche Unterschiede für das unterschiedliche Ansprechen auf denselben Wirkstoff verantwortlich sein können. So könnte eine Autophagieinhibition im Falle der synergistischen Aktivierung von Apoptose und Autophagie durch Chemotherapeutika wie Cisplatin sogar kontraproduktiv im Sinne einer verringerten Apoptoserate wirken. Die Auswirkungen einer Autophagieinhibition scheinen in besonderem Maße von Zelle, Wirkstoff und Zeitpunkt der Inhibition abzuhängen und lassen sich nicht einheitlich für alle Tumorzellen vorhersagen.

4.2 Bewertung der Autophagieinduktion in HNSCC

Rapamycin konnte in anderen Studien mit HNSCC-Zelllinien als Mono- und Kombinationspräparat mit anderen Chemotherapeutika verstärkt antiproliferative Effekte erzeugen. Dabei wurde gleichzeitig aufgezeigt, dass diese Effekte sequenz- und zelllinienspezifisch auftraten und Rapamycin dementsprechend keine universellen, antitumoralen Eigenschaften besitzt. (232). Auf die Anwendung des Autophagie-Induktors Rapamycin reagierten die Zelllinien des Panels in dieser Arbeit schwach responsiv und unspezifisch, was sich mit den eben genannten Beobachtungen deckt, dass Rapamycin nicht auf alle Zelllinien gleich wirkt. Ursächlich hierfür könnten Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien in der Expression von

Schlüsselregulatoren des mTOR-Signalweges wie zum Beispiel Bcl2 sein, die bereits beschrieben wurden (232). Eine Evaluation der Frage, was genau die Unterschiede in der Rapamycin-Sensitivität bedingt und welche Auswirkungen dies auf die basal ablaufende Autophagie hat, wäre ein interessanter Ansatzpunkt weiterer Untersuchungen. Auch wenn die Zelllinien in dieser Arbeit eher schwach sensitiv auf Rapamycin reagierten, erscheint eine weitere Erforschung im Kontext des HNSCC sinnvoll, denn als mTOR-Inhibitor nimmt Rapamycin Einfluss auf einen für HNSCC essentiellen Signalweg. Experimentelle Ergebnisse zeigen, dass von allen dysregulierten Signalwegen in HNSCC vor allem der Akt/mTOR-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Progression und Resistenzentwicklung von HNSCC-Tumoren spielt. Mutationen, die zu einer Überaktivierung in diesem Signalweg führen und unabhängig von einer EGFR-Aktivierung sind, konnten bei 80% der HNSCC-Tumoren gefunden werden und korrelieren oft mit einer schlechten Prognose (233). In Studien konnten durch die Anwendung von mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin radioresistente Tumorzellen signifikant sensitiviert werden (234). mTOR wirkt als molekulare Verknüpfung zwischen Apoptose und Autophagie und mTOR-Inhibitoren können kontextabhängig in manchen Tumorzellen Apoptose induzieren, während es bei anderen Tumorzellen eine verstärkt ablaufende Autophagie induziert (235). Rapamycin inhibiert jedoch nicht alle mTOR-Funktionen, da mTOR in zwei unterschiedlichen Multiproteinkomplexen vorkommt und Rapamycin nur den Rapamycin-sensitiven Komplex mTORC1 inhibiert. Die Entwicklung moderner mTOR-Inhibitoren, die beispielsweise beide mTOR-Komplexe inhibieren, erscheint durch die enorme Bedeutung des mTOR-Signalweges für Wachstum, Proliferation und Metabolismus von Tumorzellen sowohl für die Forschung als auch für den potenziellen klinischen Einsatz sinnvoll und wurde bereits vorangetrieben (236). Der Einsatz von Rapamycin konnte ähnlich wie Chloroquin bei den responsiven Zelllinien FaDu und Detroit562 eine Sensitivierung im oberen FasL-Konzentrationsbereich erzeugen. Dies erscheint mit Blick auf die Auswirkungen der beiden Wirkstoffe auf die Autophagie zunächst paradox, verdeutlicht aber einmal mehr die komplexen Eigenschaften der Autophagie und seiner beteiligten Signalwege auf den Zellstoffwechsel. Auch hier bleibt die Frage zu klären, warum resistente Zellen nicht durch Rapamycin sensitiviert werden konnten und welche Mechanismen dem zugrunde liegen. Eine Ursache kann auch hier eine nicht adäquate Reaktion der Zellen auf extrinsische, apoptotische Signale im Sinne einer Apoptoseinduktion sein. Im Gegensatz dazu scheint

Rapamycin bei adäquat ablaufender Reaktion auf apoptotische Signale zu einem vermehrten Zelltod zu führen. Tatsächlich konnte in anderen Studien nachgewiesen werden, dass die Anwendung eines mTOR-Inhibitors Einfluss auf die Expression apoptotischer Proteine wie Caspase-3 oder dem FasR/FasL-System nimmt (237). Ob es bei den vorliegenden Ergebnissen wirklich zu einer Erhöhung der FasL-Level oder anderer apoptotischer Proteine durch Rapamycin kommt und ob dies ursächlich für die Sensitivierung Apoptose-responsiver Zellen ist, wäre ein Ansatzpunkt weiterer Untersuchungen.

Interessanterweise bewirkte Rapamycin eine verminderte IL-8 Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die zusätzliche Applikation von TNF α führte zwar ebenfalls zu einem Anstieg der IL-8 Expression, blieb jedoch auch am Maximum unter dem Expressionslevel der Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse konnten in Untersuchungen an Makrophagen gefunden werden, bei denen Rapamycin über eine verringerte IL-1 β Produktion und damit verbundene verringerte Aktivierung der p38-MAPK-NF- κ B-Signalwege zu einer Herunterregulierung von unter anderem IL-8 führte (238). In einer Studie zu Stammzellen des Leberkarzinoms konnte die autokrine Expression von IL-8 als kritisches Merkmal für die Karzinogenese ausgemacht werden, wobei Rapamycin eine Reduktion der IL-8 Level bewirkte und eine Kolonisation karzinogener Stammzellen inhibierte (239). In den Versuchen dieser Arbeit konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass Rapamycin die IL-8 Expression in HNSCC-Zellen herunterreguliert und so Einfluss auf inflammatorische Signalwege nimmt. Eine mögliche Erklärung für den anti-inflammatorischen Effekt Rapamycins liegt in der Autophagieinduktion durch konstitutive mTOR-Inhibition. Autophagie beeinflusst NF- κ B-Signalwege und damit inflammatorische Antworten sowohl in Zellen der Tumormikroumgebung, als auch in Tumorzellen (240). Da IL-8 über die Regulierung der inflammatorischen Antwort durch die Modulation von MAPK-NF- κ B-Signalwegen in HNSCC-Tumoren eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression spielt, erscheint eine weitere Erforschung Rapamycins in diesem Kontext sinnvoll (241). Gleichzeitig ist jedoch zu erwähnen, dass durch die Anwendung von Rapamycin keine Sensitivierung auf einen TNF α -induzierten Zelltod erfolgte. In Kombination mit Cisplatin erzeugte Rapamycin eine Desensitivierung auf den Cisplatin-induzierten Zelltod in der Zelllinie SCC9. Solche antagonistischen Effekte, ausgelöst durch eine mTOR-Inhibition, konnten auch in anderen Studien festgestellt werden (242). Jedoch

gibt es auch bei der Autophagieinduktion durch mTOR-Inhibitoren, wie auch bei der Autophagieinhibition, widersprüchliche Ergebnisse bezogen auf die Auswirkungen auf eine Cisplatintherapie (243). Auch hierbei zeigt sich die besondere Abhängigkeit der Autophagiemodulation von Zelle und Wirkstoff, die eine generalisierte Anwendung für alle Tumoren zum jetzigen Zeitpunkt unwahrscheinlich macht.

4.3 Resümee und Ausblick

Die Autophagie nimmt in der Tumorforschung eine immer größer werdende Rolle ein, was die stark wachsende Anzahl an Publikationen in den letzten Jahren verdeutlicht. Allgemein ist ihre enorme Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und Proliferationsfähigkeit nicht nur für Tumorzellen durch zahlreiche Studien belegt. Wie lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in diesem Kontext mit Hinblick auf die Erweiterung möglicher Therapiemaßnahmen für HNSCC-Tumoren einordnen? Die hier verwendeten Wirkstoffe konnten keine positiven, zellregressiven Effekte auf resistente Tumorzellen erzeugen, zeigen aber vor allem das Potenzial bei der Therapie sensibler Tumorzellen auf. Allgemein weist eine große Anzahl unterschiedlicher Studien daraufhin, dass die Autophagie in vielen Tumorentitäten eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Resistenzmechanismen einnimmt (244). Zytotoxische Chemotherapien, Radiotherapien und zielgerichtete Therapien sind dazu in der Lage, zytoprotektive Autophagie in Tumorzellen zu aktivieren und damit einen Überlebensmechanismus zu induzieren. Ein besseres Verständnis über die beteiligten Signalwege wird bei der Frage, wie genau die Autophagie mechanistisch zur Resistenzentwicklung beiträgt, von großer Bedeutung sein. Dennoch bleibt die Autophagiemodulation ein zweiseitiges Schwert und bevor sie generalisiert Einzug in die Therapie solider Tumore wie dem HNSCC erhält, bedarf es einer sehr genauen Evaluation, welche Tumore wie darauf reagieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass eine Autophagiemodulation zell- und kontextspezifisch sehr unterschiedliche Auswirkungen vor allem in Kombination mit unterschiedlichen Wirkstoffen haben kann. Die Aufklärung der mechanistischen Hintergründe für die zellspezifisch unterschiedliche Reaktion auf eine Autophagiemodulation könnte im Mittelpunkt nachfolgender Untersuchungen stehen. Dies würde Hand in Hand gehen mit der Frage nach der Resistenzentwicklung. Unter

Umständen könnten sich so Zusammenhänge zwischen Resistenzen und einer Autophagieabhängigkeit ergeben. Mögliche Ansatzpunkte wären nicht nur Analysen direkter Regulatoren wie AMPK oder mTOR, sondern auch Untersuchungen transkriptionaler Autophagieregulatoren wie p53 oder TFEB (245). Besonders die Frage nach der Autophagieabhängigkeit wird in Zukunft zu beantworten sein. So konnten Gensequenzen festgestellt werden, die prädiktiv eine Einschätzung der Sensitivität von Tumorzellen auf lysosomale Autophagie-Inhibitoren wie Chloroquin möglich machte (246). Solche Untersuchungen sind elementar um eine Autophagiemodulation im Zuge der personalisierten Tumorthherapie in Zukunft implementieren zu können und Patientenkollektive zu identifizieren, die von einer solchen Therapie profitieren würden. Die Erfolge von Immuntherapien nicht nur bei HNSCC-Tumoren werfen die Frage auf, welchen Effekt eine Autophagiemodulation auf die systemische Immunität hat. In Untersuchungen zum malignen Melanom konnte festgestellt werden, dass eine hypoxische Tumormikroumgebung Autophagie in Tumorzellen hochreguliert und so die Effektivität von T-Zellen des Immunsystems limitiert (247). Doch auch für Immunzellen selbst scheint die Autophagie essentiell für deren antitumorale Wirkungen zu sein, wie unterschiedliche Studien andeuten (248,249). Das feine Zusammenspiel von Tumorzelle, Tumormikroumgebung und Immunsystem wird auch durch die Autophagie dirigiert und sollte dementsprechend als Einheit betrachtet werden, in der eine Autophagiemodulation immer auch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Untereinheiten erzeugt. Dies ist bei der Entwicklung autophagiemodulierender, adjuvanter Therapieoptionen zu beachten. Auch bei HNSCC-Tumoren wächst das Verständnis über die Zusammenhänge der Tumormikroumgebung mit dem Inflammationsstatus, dem Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen und der Rolle der Autophagie. So konnte bereits gezeigt werden, dass tumorassoziierte Fibroblasten die Tumorprogression von HNSCC-Tumoren fördern und vor allem sekretorische Autophagie dabei als Schlüsselmechanismus agiert (117). Auch in dieser Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine Autophagiemodulation Einfluss nimmt auf die Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-8. Hieran könnten sich weitere Untersuchungen anschließen, die inflammatorische Signalwege wie den NF- κ B-Signalweg näher untersuchen und dessen Verbindungen zur Autophagie weiter aufklären. Ebenfalls elementar für die Entwicklung autophagiemodulierender Therapieoptionen wird die weitere Erforschung des „Crosstalks“ zwischen Apoptose und Autophagie sein. Ein besseres Verständnis

könnte dabei die Entwicklung neuer Wirkstoffe fördern, die zum Beispiel über die Beeinflussung beider Signalwege synergistische Effekte erzielen und Tumorzellen leichter in den Zelltod zwingen könnten. Generell erscheint die Autophagieinhibition am vielversprechendsten für die Tumorthherapie zu sein, wie die große Mehrheit an aktuellen Studien zeigt. Auch in dieser Arbeit zeigte Chloroquin den größten adjuvanten Effekt, während Bafilomycin keine additiven Zellregressionen erzeugte. Chloroquin ist bisher der einzig zugelassene, autophagieinhibierende Wirkstoff. Seine systemischen Nebenwirkungen und Limitationen für den klinischen Einsatz machen jedoch die Entwicklung neuer Inhibitoren erforderlich. Eine Reihe unterschiedlicher, neuartiger Inhibitoren befindet sich derzeit in der Erforschung und zeigen vielversprechende Ergebnisse (245).

Die MR konnte vielversprechende Ergebnisse in dieser Arbeit erzeugen. So bewirkte die MR nicht nur eine Proliferationshemmung der untersuchten Tumorzellen, sondern konnte auch eine Zelllinie auf FasL-induzierte Apoptose signifikant sensitivieren. Da eine MR vielfältige metabolische Auswirkungen nicht nur auf die Autophagie ausübt, erscheint eine weitere Erforschung der beteiligten Mechanismen und Signalwege sinnvoll. Hierbei konnten bereits einige solcher Signalwege in Studien identifiziert werden (218). Um genauere Einblicke in die metabolischen Auswirkungen der MR zu erhalten, konnte unsere Arbeitsgruppe beispielsweise ein Modellsystem an einer Zelllinie etablieren (199). Die Kombination mit autophagiemodulierenden Wirkstoffen erscheint den Ergebnissen dieser Arbeit nach allerdings wenig vielversprechend. Inwiefern die MR molekular Einfluss auf die Autophagie nimmt, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht, sodass dahingehend Fragen offenbleiben und Raum für weitere Untersuchungen bietet. Präklinische Studien zeigen auf, dass die MR die Effektivität von antitumoralen Standardtherapien verbessert. Auf HNSCC bezogen wäre somit eine Untersuchung der Kombination der MR mit einem chemotherapeutischen Wirkstoff der Standardtherapie wie Cisplatin interessant.

5. Zusammenfassung

Die Autophagie nimmt als ein zentraler Bestandteil des zellulären Metabolismus eine wichtige Rolle für die Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen ein. Dabei zeigt sich, dass sich der Einfluss der Autophagie kontextabhängig zwischen und innerhalb einzelner Tumorentitäten unterscheidet und das Tumorzellwachstum sowohl fördern als auch hemmen kann. Durch den Einsatz der Wirkstoffe Chloroquin, Bafilomycin und Rapamycin konnte effektiv die Autophagie in den untersuchten Zelllinien moduliert und durch Proteinanalyse mit Hilfe der SDS-Page validiert werden. Dosisabhängige Reduktionen der Zellzahlen konnten vor allem bei den inhibitorisch wirkenden Substanzen Chloroquin und Bafilomycin erreicht werden, während Rapamycin als Autophagie-induzierender Wirkstoff keine antiproliferativen Effekte erzeugen konnte. Auch FasL und TNF α konnten in den untersuchten Tumorzelllinien nur zu einer mäßigen Zellzahlreduktion führen. Cisplatin hingegen konnte in allen Zelllinien dosisabhängige Zellzahlreduktionen induzieren. Durch die Kombination von Chloroquin mit FasL konnte in den FasL-responsiven Zelllinien eine signifikante Sensitivierung im Sinne einer Proliferationshemmung induziert werden. Ähnliche Effekte ließen sich bei der Kombination von Rapamycin mit FasL beobachten. Auch für die MR konnte ein proliferationshemmender Effekt in den zwei untersuchten Tumorzelllinien FaDu und Detroit562 validiert werden. In der Kombination mit FasL wurde bei einer Zelllinie eine Sensitivierung auf das extrinsische Todessignal nachgewiesen. Die kombinatorische Anwendung der MR mit TNF α und Autophagiemodulatoren zeigte keine signifikanten, proliferationshemmenden Effekte. Auswirkungen ließen sich dagegen in der IL-8 Expression feststellen, wobei die MR allein zu einem signifikanten Anstieg führte und Rapamycin die Expressionsrate in Kombination mit der MR signifikant senkte. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit das Potenzial der Autophagiemodulation vor allem bei responsiven HNSCC-Tumorzellen auf. Auch die MR konnte *in vitro* vielversprechende Ergebnisse liefern. Die kontextabhängigen Auswirkungen der Autophagie auf das Tumorzellwachstum bedeuten allerdings auch eine Menge offener Fragen, die es in Zukunft zu klären gilt, bevor die Autophagiemodulation Einzug in die klinische Praxis der Tumorthherapie erhalten kann. Ausschlaggebend für die Weiterentwicklung effektiver Therapien wird unter anderem ein verbessertes Verständnis über intrinsische und extrinsische Resistenzmechanismen sein und welche Rolle die Autophagie dabei einnimmt.

6. Literaturverzeichnis

1. Sonnenschein, C., and Soto, A. M. (2016) Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. *Progress in biophysics and molecular biology* **122**, 70-76
2. Chandra, H. S., Heisterkamp, N. C., Hungerford, A., Morrissette, J. J., Nowell, P. C., Rowley, J. D., and Testa, J. R. (2011) Philadelphia Chromosome Symposium: commemoration of the 50th anniversary of the discovery of the Ph chromosome. *Cancer genetics* **204**, 171-179
3. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70
4. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674
5. Bonomi, M., Patsias, A., Posner, M., and Sikora, A. (2014) The role of inflammation in head and neck cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **816**, 107-127
6. Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology* **12**, 814-822
7. Saftig, P., and Klumperman, J. (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 623-635
8. De Duve, C. (1963) The lysosome. *Scientific American* **208**, 64-72
9. Deng, S., Shanmugam, M. K., Kumar, A. P., Yap, C. T., Sethi, G., and Bishayee, A. (2019) Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. *Cancer*
10. Deretic, V., and Levine, B. (2009) Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell host & microbe* **5**, 527-549
11. Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672-676
12. Briceno, E., Reyes, S., and Sotelo, J. (2003) Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine. *Neurosurgical focus* **14**, e3
13. Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036
14. Klionsky, D. J., and Codogno, P. (2013) The mechanism and physiological function of macroautophagy. *Journal of innate immunity* **5**, 427-433
15. Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* **40**, 280-293
16. Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., and Kim, D. H. (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters* **584**, 1287-1295
17. González, A., and Hall, M. N. (2017) Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *The EMBO journal* **36**, 397-408
18. Scott, R. C., Schuldiner, O., and Neufeld, T. P. (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Developmental cell* **7**, 167-178

19. Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology* **27**, 107-132
20. Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D. H. (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell* **20**, 1992-2003
21. Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., and Herman, P. K. (2009) The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17049-17054
22. Lee, J. W., Park, S., Takahashi, Y., and Wang, H. G. (2010) The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS one* **5**, e15394
23. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K. L. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* **13**, 132-141
24. Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2018) The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 10363-10368
25. Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature cell biology* **11**, 1433-1437
26. Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T. K., and Mizushima, N. (2013) Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* **9**, 1491-1499
27. Backer, J. M. (2016) The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34. *The Biochemical journal* **473**, 2251-2271
28. Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell* **19**, 5360-5372
29. Lamb, C. A., Yoshimori, T., and Tooze, S. A. (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 759-774
30. Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., and Guan, K. L. (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology* **15**, 741-750
31. Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939
32. Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N. T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010) Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of cell biology* **190**, 511-521
33. Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N. T. (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **182**, 685-701

34. Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A., and Yoshimori, T. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* **495**, 389-393
35. Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656-667
36. Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *The Journal of biological chemistry* **282**, 37298-37302
37. Dooley, H. C., Razi, M., Polson, H. E., Girardin, S. E., Wilson, M. I., and Tooze, S. A. (2014) WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell* **55**, 238-252
38. Polson, H. E., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M. J., and Tooze, S. A. (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**, 506-522
39. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008) LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **445**, 77-88
40. Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008) An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell* **19**, 4651-4659
41. Weidberg, H., Shpilka, T., Shvets, E., Abada, A., Shimron, F., and Elazar, Z. (2011) LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Developmental cell* **20**, 444-454
42. Johansen, T., and Lamark, T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279-296
43. Köchl, R., Hu, X. W., Chan, E. Y., and Tooze, S. A. (2006) Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **7**, 129-145
44. Jahreiss, L., Menzies, F. M., and Rubinsztein, D. C. (2008) The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **9**, 574-587
45. Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell structure and function* **33**, 109-122
46. Yu, I. M., and Hughson, F. M. (2010) Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annual review of cell and developmental biology* **26**, 137-156
47. Pfeffer, S. R. (2017) Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Molecular biology of the cell* **28**, 712-715
48. Adnan, M., Islam, W., Zhang, J., Zheng, W., and Lu, G. D. (2019) Diverse Role of SNARE Protein Sec22 in Vesicle Trafficking, Membrane Fusion, and Autophagy. *Cells* **8**
49. Gutierrez, M. G., Munafó, D. B., Berón, W., and Colombo, M. I. (2004) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *Journal of cell science* **117**, 2687-2697

50. Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E. L. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science* **117**, 4837-4848
51. Liang, C., Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., and Jung, J. U. (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology* **10**, 776-787
52. Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., and Mizushima, N. (2014) The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular biology of the cell* **25**, 1327-1337
53. Takáts, S., Nagy, P., Varga, Á., Piracs, K., Kárpáti, M., Varga, K., Kovács, A. L., Hegedűs, K., and Juhász, G. (2013) Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila. *The Journal of cell biology* **201**, 531-539
54. Epple, U. D., Suriapranata, I., Eskelinen, E. L., and Thumm, M. (2001) Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *Journal of bacteriology* **183**, 5942-5955
55. Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., and Klionsky, D. J. (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular biology of the cell* **17**, 5094-5104
56. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., and Heintz, N. (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15077-15082
57. Aita, V. M., Liang, X. H., Murty, V. V., Pincus, D. L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T. C., and Levine, B. (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59**, 59-65
58. Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., and Levine, B. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1809-1820
59. Laddha, S. V., Ganesan, S., Chan, C. S., and White, E. (2014) Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers. *Molecular cancer research : MCR* **12**, 485-490
60. Huo, Y., Cai, H., Teplova, I., Bowman-Colin, C., Chen, G., Price, S., Barnard, N., Ganesan, S., Karantza, V., White, E., and Xia, B. (2013) Autophagy opposes p53-mediated tumor barrier to facilitate tumorigenesis in a model of PALB2-associated hereditary breast cancer. *Cancer discovery* **3**, 894-907
61. Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development* **25**, 795-800
62. Strohecker, A. M., Guo, J. Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S. M., Chen, G. J., Mathew, R., McMahon, M., and White, E. (2013) Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer discovery* **3**, 1272-1285
63. Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S., and White, E. (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell* **10**, 51-64

64. Guo, J. Y., Chen, H. Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M., Karantza, V., Collier, H. A., Dipaola, R. S., Gelinas, C., Rabinowitz, J. D., and White, E. (2011) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & development* **25**, 460-470
65. Lock, R., Roy, S., Kenific, C. M., Su, J. S., Salas, E., Ronen, S. M., and Debnath, J. (2011) Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Molecular biology of the cell* **22**, 165-178
66. Lock, R., Kenific, C. M., Leidal, A. M., Salas, E., and Debnath, J. (2014) Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer discovery* **4**, 466-479
67. Ma, X. H., Piao, S., Wang, D., McAfee, Q. W., Nathanson, K. L., Lum, J. J., Li, L. Z., and Amaravadi, R. K. (2011) Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 3478-3489
68. Ma, X. H., Piao, S. F., Dey, S., McAfee, Q., Karakousis, G., Villanueva, J., Hart, L. S., Levi, S., Hu, J., Zhang, G., Lazova, R., Klump, V., Pawelek, J. M., Xu, X., Xu, W., Schuchter, L. M., Davies, M. A., Herlyn, M., Winkler, J., Koumenis, C., and Amaravadi, R. K. (2014) Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *The Journal of clinical investigation* **124**, 1406-1417
69. Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Kawai, K., Hongo, K., Hiyoshi, M., Kaneko, M., Murono, K., Tada, N., Nirei, T., Takahashi, K., and Kitayama, J. (2012) Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with chloroquine, an in vivo study. *Anti-cancer drugs* **23**, 675-682
70. Palacios, C., Martín-Pérez, R., López-Pérez, A. I., Pandiella, A., and López-Rivas, A. (2010) Autophagy inhibition sensitizes multiple myeloma cells to 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin-induced apoptosis. *Leukemia research* **34**, 1533-1538
71. Abedin, M. J., Wang, D., McDonnell, M. A., Lehmann, U., and Kelekar, A. (2007) Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ* **14**, 500-510
72. Sharifi, M. N., Mowers, E. E., Drake, L. E., Collier, C., Chen, H., Zamora, M., Mui, S., and Macleod, K. F. (2016) Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell reports* **15**, 1660-1672
73. Kenific, C. M., Stehbens, S. J., Goldsmith, J., Leidal, A. M., Faure, N., Ye, J., Wittmann, T., and Debnath, J. (2016) NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. *The Journal of cell biology* **212**, 577-590
74. Duran, A., Linares, J. F., Galvez, A. S., Wikenheiser, K., Flores, J. M., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2008) The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell* **13**, 343-354
75. Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., and White, E. (2007) Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes & development* **21**, 1621-1635
76. Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C. M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., and White, E. (2007) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & development* **21**, 1367-1381

77. Mathew, R., Karp, C. M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H. Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., Dipaola, R. S., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**, 1062-1075
78. Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2013) Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science* **126**, 1713-1719
79. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., and Brakenhoff, R. H. (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer* **11**, 9-22
80. (2015) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576-582
81. Rubin Grandis, J., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Tweardy, D. J. (1998) Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 824-832
82. Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., and Mills, G. B. (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **4**, 988-1004
83. Wei, Y., Zou, Z., Becker, N., Anderson, M., Sumpter, R., Xiao, G., Kinch, L., Koduru, P., Christudass, C. S., Veltri, R. W., Grishin, N. V., Peyton, M., Minna, J., Bhagat, G., and Levine, B. (2013) EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell* **154**, 1269-1284
84. Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H. R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., and Hitt, R. (2008) Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England journal of medicine* **359**, 1116-1127
85. Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K., and Ang, K. K. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* **354**, 567-578
86. Li, X., and Fan, Z. (2010) The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1alpha and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex. *Cancer research* **70**, 5942-5952
87. Liu, J. L., Chen, F. F., Lung, J., Lo, C. H., Lee, F. H., Lu, Y. C., and Hung, C. H. (2014) Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* **111**, 944-954
88. Inui, T., Chano, T., Takikita-Suzuki, M., Nishikawa, M., Yamamoto, G., and Okabe, H. (2013) Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. *PloS one* **8**, e74398
89. Wang, Y., Wang, C., Tang, H., Wang, M., Weng, J., Liu, X., Zhang, R., Huang, H., and Hou, J. (2013) Decrease of autophagy activity promotes malignant progression of tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* **42**, 557-564
90. Surviladze, Z., Sterk, R. T., DeHaro, S. A., and Ozbun, M. A. (2013) Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. *Journal of virology* **87**, 2508-2517

91. Brandsma, J. L., and Abramson, A. L. (1989) Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **115**, 621-625
92. Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D. A., Karantza, V., Kimmelman, A., Kumar, S., Levine, B., Maiuri, M. C., Martin, S. J., Penninger, J., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Simon, H. U., Simonsen, A., Thorburn, A. M., Velasco, G., Ryan, K. M., and Kroemer, G. (2015) Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO journal* **34**, 856-880
93. Levy, J. M., and Thorburn, A. (2011) Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacology & therapeutics* **131**, 130-141
94. Towers, C. G., and Thorburn, A. (2016) Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine* **14**, 15-23
95. Cook, K. L., Wärrri, A., Soto-Pantoja, D. R., Clarke, P. A., Cruz, M. I., Zwart, A., and Clarke, R. (2014) Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 3222-3232
96. Pellegrini, P., Strambi, A., Zipoli, C., Hägg-Olofsson, M., Buoncervello, M., Linder, S., and De Milito, A. (2014) Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: implications for cancer therapies. *Autophagy* **10**, 562-571
97. Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326
98. Homewood, C. A., Warhurst, D. C., Peters, W., and Baggaley, V. C. (1972) Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature* **235**, 50-52
99. Slater, A. F. (1993) Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in Plasmodium falciparum. *Pharmacology & therapeutics* **57**, 203-235
100. Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., and Reggiori, F. (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**, 1435-1455
101. Kremer, J. M. (2001) Rational use of new and existing disease-modifying agents in rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine* **134**, 695-706
102. Rainsford, K. D., Parke, A. L., Clifford-Rashotte, M., and Kean, W. F. (2015) Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology* **23**, 231-269
103. Sperber, K., Kalb, T. H., Stecher, V. J., Banerjee, R., and Mayer, L. (1993) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by hydroxychloroquine in T cells and monocytes. *AIDS research and human retroviruses* **9**, 91-98
104. Geser, A., Brubaker, G., and Draper, C. C. (1989) Effect of a malaria suppression program on the incidence of African Burkitt's lymphoma. *American journal of epidemiology* **129**, 740-752
105. Lagneaux, L., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., Bernier, M., and Bron, D. (2002) Hydroxychloroquine-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia involves activation of caspase-3 and modulation of Bcl-2/bax/ratio. *Leukemia & lymphoma* **43**, 1087-1095

106. Rahim, R., and Strobl, J. S. (2009) Hydroxychloroquine, chloroquine, and all-trans retinoic acid regulate growth, survival, and histone acetylation in breast cancer cells. *Anti-cancer drugs* **20**, 736-745
107. Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K., Hiyoshi, M., Kaneko, M., Kitayama, J., Takahashi, K., and Nagawa, H. (2010) Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC cancer* **10**, 370
108. Sotelo, J., Briceño, E., and López-González, M. A. (2006) Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of internal medicine* **144**, 337-343
109. Hu, C., Solomon, V. R., Ulibarri, G., and Lee, H. (2008) The efficacy and selectivity of tumor cell killing by Akt inhibitors are substantially increased by chloroquine. *Bioorganic & medicinal chemistry* **16**, 7888-7893
110. Seçkin, U., Ozoran, K., Ikinçiogullari, A., Borman, P., and Bostan, E. E. (2000) Hydroxychloroquine ototoxicity in a patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* **19**, 203-204
111. Wolfe, F., and Marmor, M. F. (2010) Rates and predictors of hydroxychloroquine retinal toxicity in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis care & research* **62**, 775-784
112. Levy, G. D., Munz, S. J., Paschal, J., Cohen, H. B., Pince, K. J., and Peterson, T. (1997) Incidence of hydroxychloroquine retinopathy in 1,207 patients in a large multicenter outpatient practice. *Arthritis and rheumatism* **40**, 1482-1486
113. Bernard, M., Cardin, G. B., Cahuzac, M., Ayad, T., Bissada, E., Guertin, L., Bahig, H., Nguyen-Tan, P. F., Filion, E., Ballivy, O., Soulieres, D., Rodier, F., and Christopoulos, A. (2020) Dual Inhibition of Autophagy and PI3K/AKT/MTOR Pathway as a Therapeutic Strategy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* **12**
114. Zhao, X. G., Sun, R. J., Yang, X. Y., Liu, D. Y., Lei, D. P., Jin, T., and Pan, X. L. (2015) Chloroquine-enhanced efficacy of cisplatin in the treatment of hypopharyngeal carcinoma in xenograft mice. *PloS one* **10**, e0126147
115. Wheeler, S. E., Shi, H., Lin, F., Dasari, S., Bednash, J., Thorne, S., Watkins, S., Joshi, R., and Thomas, S. M. (2014) Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. *Head & neck* **36**, 385-392
116. Lewis, M. P., Lygoe, K. A., Nystrom, M. L., Anderson, W. P., Speight, P. M., Marshall, J. F., and Thomas, G. J. (2004) Tumour-derived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *British journal of cancer* **90**, 822-832
117. New, J., Arnold, L., Ananth, M., Alvi, S., Thornton, M., Werner, L., Tawfik, O., Dai, H., Shnyder, Y., Kakarala, K., Tsue, T. T., Girod, D. A., Ding, W. X., Anant, S., and Thomas, S. M. (2017) Secretory Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Head and Neck Cancer Progression and Offers a Novel Therapeutic Target. *Cancer research* **77**, 6679-6691
118. Dröse, S., and Altendorf, K. (1997) Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *The Journal of experimental biology* **200**, 1-8
119. Toei, M., Saum, R., and Forgac, M. (2010) Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry* **49**, 4715-4723
120. Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles

- by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function* **23**, 33-42
121. Kawai, A., Uchiyama, H., Takano, S., Nakamura, N., and Ohkuma, S. (2007) Autophagosome-lysosome fusion depends on the pH in acidic compartments in CHO cells. *Autophagy* **3**, 154-157
 122. Mousavi, S. A., Kjekens, R., Berg, T. O., Seglen, P. O., Berg, T., and Brech, A. (2001) Effects of inhibitors of the vacuolar proton pump on hepatic heterophagy and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* **1510**, 243-257
 123. Mauvezin, C., and Neufeld, T. P. (2015) Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **11**, 1437-1438
 124. Wu, Y. C., Wu, W. K., Li, Y., Yu, L., Li, Z. J., Wong, C. C., Li, H. T., Sung, J. J., and Cho, C. H. (2009) Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **382**, 451-456
 125. Li, L. Q., Xie, W. J., Pan, D., Chen, H., and Zhang, L. (2016) Inhibition of autophagy by bafilomycin A1 promotes chemosensitivity of gastric cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**, 653-659
 126. Chu, H. Y., Wang, W., Chen, X., Jiang, Y. E., Cheng, R., Qi, X., Zhong, Z. M., Zeng, M. S., Zhu, X. F., and Sun, C. Z. (2018) Bafilomycin A1 increases the sensitivity of tongue squamous cell carcinoma cells to cisplatin by inhibiting the lysosomal uptake of platinum ions but not autophagy. *Cancer letters* **423**, 105-112
 127. Schreiber, R. D., Old, L. J., and Smyth, M. J. (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)* **331**, 1565-1570
 128. Pietrocola, F., Pol, J., Vacchelli, E., Rao, S., Enot, D. P., Baracco, E. E., Levesque, S., Castoldi, F., Jacquelot, N., Yamazaki, T., Senovilla, L., Marino, G., Aranda, F., Durand, S., Sica, V., Chery, A., Lachkar, S., Sigl, V., Bloy, N., Buque, A., Falzoni, S., Ryffel, B., Apetoh, L., Di Virgilio, F., Madeo, F., Maiuri, M. C., Zitvogel, L., Levine, B., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2016) Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer cell* **30**, 147-160
 129. Green, D. R., and Llambi, F. (2015) Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**
 130. Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., and Gibson, S. B. (2008) Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* **15**, 171-182
 131. Ginet, V., Puyal, J., Rummel, C., Aubry, D., Breton, C., Cloux, A. J., Majjigapu, S. R., Sordat, B., Vogel, P., Bruzzone, S., Nencioni, A., Duchosal, M. A., and Nahimana, A. (2014) A critical role of autophagy in antileukemia/lymphoma effects of APO866, an inhibitor of NAD biosynthesis. *Autophagy* **10**, 603-617
 132. Liu, Y., Shoji-Kawata, S., Sumpter, R. M., Jr., Wei, Y., Ginet, V., Zhang, L., Posner, B., Tran, K. A., Green, D. R., Xavier, R. J., Shaw, S. Y., Clarke, P. G., Puyal, J., and Levine, B. (2013) Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 20364-20371
 133. Granville, C. A., Warfel, N., Tsurutani, J., Hollander, M. C., Robertson, M., Fox, S. D., Veenstra, T. D., Issaq, H. J., Linnoila, R. I., and Dennis, P. A. (2007)

- Identification of a highly effective rapamycin schedule that markedly reduces the size, multiplicity, and phenotypic progression of tobacco carcinogen-induced murine lung tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 2281-2289
134. Paglin, S., Lee, N. Y., Nakar, C., Fitzgerald, M., Plotkin, J., Deuel, B., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Lampen, N., and Yahalom, J. (2005) Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer research* **65**, 11061-11070
 135. Cao, C., Subhawong, T., Albert, J. M., Kim, K. W., Geng, L., Sekhar, K. R., Gi, Y. J., and Lu, B. (2006) Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer research* **66**, 10040-10047
 136. Vézina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* **28**, 721-726
 137. Dumont, F. J., Staruch, M. J., Koprak, S. L., Melino, M. R., and Sigal, N. H. (1990) Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **144**, 251-258
 138. Degertekin, M., Serruys, P. W., Foley, D. P., Tanabe, K., Regar, E., Vos, J., Smits, P. C., van der Giessen, W. J., van den Brand, M., de Feyter, P., and Popma, J. J. (2002) Persistent inhibition of neointimal hyperplasia after sirolimus-eluting stent implantation: long-term (up to 2 years) clinical, angiographic, and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation* **106**, 1610-1613
 139. Augustine, J. J., Bodziak, K. A., and Hricik, D. E. (2007) Use of sirolimus in solid organ transplantation. *Drugs* **67**, 369-391
 140. Eng, C. P., Sehgal, S. N., and Vézina, C. (1984) Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *The Journal of antibiotics* **37**, 1231-1237
 141. Grewe, M., Gansauge, F., Schmid, R. M., Adler, G., and Seufferlein, T. (1999) Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer research* **59**, 3581-3587
 142. Hosoi, H., Dilling, M. B., Shikata, T., Liu, L. N., Shu, L., Ashmun, R. A., Germain, G. S., Abraham, R. T., and Houghton, P. J. (1999) Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer research* **59**, 886-894
 143. Shi, Y., Frankel, A., Radvanyi, L. G., Penn, L. Z., Miller, R. G., and Mills, G. B. (1995) Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer research* **55**, 1982-1988
 144. Yao, J. C., Fazio, N., Singh, S., Buzzoni, R., Carnaghi, C., Wolin, E., Tomasek, J., Raderer, M., Lahner, H., Voi, M., Pacaud, L. B., Rouyrre, N., Sachs, C., Valle, J. W., Fave, G. D., Van Cutsem, E., Tesselaar, M., Shimada, Y., Oh, D. Y., Strosberg, J., Kulke, M. H., and Pavel, M. E. (2016) Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet (London, England)* **387**, 968-977
 145. Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L., and Coiffier, B. (2009) Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of

- relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 3822-3829
146. Chawla, S. P., Staddon, A. P., Baker, L. H., Schuetze, S. M., Tolcher, A. W., D'Amato, G. Z., Blay, J. Y., Mita, M. M., Sankhala, K. K., Berk, L., Rivera, V. M., Clackson, T., Loewy, J. W., Haluska, F. G., and Demetri, G. D. (2012) Phase II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 78-84
147. Mecham, J. O., Rowitch, D., Wallace, C. D., Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1983) The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* **117**, 429-434
148. Guo, H. Y., Herrera, H., Groce, A., and Hoffman, R. M. (1993) Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer research* **53**, 2479-2483
149. Brosnan, J. T., and Brosnan, M. E. (2006) The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of nutrition* **136**, 1636s-1640s
150. Lu, S. C. (2000) S-Adenosylmethionine. *The international journal of biochemistry & cell biology* **32**, 391-395
151. Bhattacharyya, S., and Varshney, U. (2016) Evolution of initiator tRNAs and selection of methionine as the initiating amino acid. *RNA biology* **13**, 810-819
152. Orentreich, N., Matias, J. R., DeFelice, A., and Zimmerman, J. A. (1993) Low methionine ingestion by rats extends life span. *The Journal of nutrition* **123**, 269-274
153. Stone, K. P., Wanders, D., Orgeron, M., Cortez, C. C., and Gettys, T. W. (2014) Mechanisms of increased in vivo insulin sensitivity by dietary methionine restriction in mice. *Diabetes* **63**, 3721-3733
154. Ables, G. P., Perrone, C. E., Orentreich, D., and Orentreich, N. (2012) Methionine-restricted C57BL/6J mice are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance but have low bone density. *PloS one* **7**, e51357
155. Malloy, V. L., Krajcik, R. A., Bailey, S. J., Hristopoulos, G., Plummer, J. D., and Orentreich, N. (2006) Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging cell* **5**, 305-314
156. Sharma, S., Dixon, T., Jung, S., Graff, E. C., Forney, L. A., Gettys, T. W., and Wanders, D. (2019) Dietary Methionine Restriction Reduces Inflammation Independent of FGF21 Action. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **27**, 1305-1313
157. Maddineni, S., Nichenametla, S., Sinha, R., Wilson, R. P., and Richie, J. P., Jr. (2013) Methionine restriction affects oxidative stress and glutathione-related redox pathways in the rat. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **238**, 392-399
158. Ruckenstuhl, C., Netzberger, C., Entfellner, I., Carmona-Gutierrez, D., Kickenweiz, T., Stekovic, S., Gleixner, C., Schmid, C., Klug, L., Sorgo, A. G., Eisenberg, T., Büttner, S., Mariño, G., Koziel, R., Jansen-Dürr, P., Fröhlich, K. U., Kroemer, G., and Madeo, F. (2014) Lifespan extension by methionine restriction requires autophagy-dependent vacuolar acidification. *PLoS genetics* **10**, e1004347
159. Efeyan, A., Zoncu, R., and Sabatini, D. M. (2012) Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends in molecular medicine* **18**, 524-533
160. Sugimura, T., Birnbaum, S. M., Winitz, M., and Greenstein, J. P. (1959) Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII.

- The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. *Archives of biochemistry and biophysics* **81**, 448-455
161. Halpern, B. C., Clark, B. R., Hardy, D. N., Halpern, R. M., and Smith, R. A. (1974) The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 1133-1136
162. Kokkinakis, D. M., Liu, X., Chada, S., Ahmed, M. M., Shareef, M. M., Singha, U. K., Yang, S., and Luo, J. (2004) Modulation of gene expression in human central nervous system tumors under methionine deprivation-induced stress. *Cancer research* **64**, 7513-7525
163. Cavuoto, P., and Fenech, M. F. (2012) A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer treatment reviews* **38**, 726-736
164. Levine, M. E., Suarez, J. A., Brandhorst, S., Balasubramanian, P., Cheng, C. W., Madia, F., Fontana, L., Mirisola, M. G., Guevara-Aguirre, J., Wan, J., Passarino, G., Kennedy, B. K., Wei, M., Cohen, P., Cimmmins, E. M., and Longo, V. D. (2014) Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell metabolism* **19**, 407-417
165. Epner, D. E., Morrow, S., Wilcox, M., and Houghton, J. L. (2002) Nutrient intake and nutritional indexes in adults with metastatic cancer on a phase I clinical trial of dietary methionine restriction. *Nutrition and cancer* **42**, 158-166
166. Goseki, N., Yamazaki, S., Shimojyu, K., Kando, F., Maruyama, M., Endo, M., Koike, M., and Takahashi, H. (1995) Synergistic effect of methionine-depleting total parenteral nutrition with 5-fluorouracil on human gastric cancer: a randomized, prospective clinical trial. *Japanese journal of cancer research : Gann* **86**, 484-489
167. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **68**, 394-424
168. R.K.-I.H.u.d.G.d.e.K.i.D.e.V. (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. *Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)*
169. Hecht, S. S. (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature reviews. Cancer* **3**, 733-744
170. Choi, P., and Chen, C. (2005) Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **104**, 1113-1128
171. Williams, H. K. (2000) Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Molecular pathology : MP* **53**, 165-172
172. Rosenquist, K. (2005) Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swedish dental journal. Supplement*, 1-66
173. Hashibe, M., Boffetta, P., Zaridze, D., Shangina, O., Szeszenia-Dabrowska, N., Mates, D., Fabiánová, E., Rudnai, P., and Brennan, P. (2007) Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe. *American journal of epidemiology* **165**, 814-820
174. Bray, I., Brennan, P., and Boffetta, P. (2000) Projections of alcohol- and tobacco-related cancer mortality in Central Europe. *International journal of cancer* **87**, 122-128

175. Blitzer, G. C., Smith, M. A., Harris, S. L., and Kimple, R. J. (2014) Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **88**, 761-770
176. Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruze, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., and Gillison, M. L. (2011) Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 4294-4301
177. Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., and Fakhry, C. (2015) Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**, 3235-3242
178. Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P., and Gillison, M. L. (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* **363**, 24-35
179. Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Anderson, W. F., and Gillison, M. L. (2008) Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 612-619
180. Patel, S. C., Carpenter, W. R., Tyree, S., Couch, M. E., Weissler, M., Hackman, T., Hayes, D. N., Shores, C., and Chera, B. S. (2011) Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 1488-1494
181. Hafkamp, H. C., Manni, J. J., Haesevoets, A., Voogd, A. C., Schepers, M., Bot, F. J., Hopman, A. H., Ramaekers, F. C., and Speel, E. J. (2008) Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *International journal of cancer* **122**, 2656-2664
182. Semrau, R., Duerbaum, H., Temming, S., Huebbers, C., Stenner, M., Drebber, U., Klussmann, J. P., Müller, R. P., and Preuss, S. F. (2013) Prognostic impact of human papillomavirus status, survivin, and epidermal growth factor receptor expression on survival in patients treated with radiochemotherapy for very advanced nonresectable oropharyngeal cancer. *Head & neck* **35**, 1339-1344
183. Taghavi, N., and Yazdi, I. (2007) Type of food and risk of oral cancer. *Archives of Iranian medicine* **10**, 227-232
184. Garavello, W., Lucenteforte, E., Bosetti, C., and La Vecchia, C. (2009) The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. *Minerva stomatologica* **58**, 25-34
185. Güneri, P., and Epstein, J. B. (2014) Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. *Oral oncology* **50**, 1131-1136
186. Bozec, A., Culié, D., Poissonnet, G., and Dassonville, O. (2019) Current role of primary surgical treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Current opinion in oncology* **31**, 138-145
187. Hanasono, M. M., Friel, M. T., Klem, C., Hsu, P. W., Robb, G. L., Weber, R. S., Roberts, D. B., and Chang, D. W. (2009) Impact of reconstructive microsurgery in patients with advanced oral cavity cancers. *Head & neck* **31**, 1289-1296

188. Yao, M., Epstein, J. B., Modi, B. J., Pytynia, K. B., Mundt, A. J., and Feldman, L. E. (2007) Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology* **43**, 213-223
189. Nutting, C. M., Morden, J. P., Harrington, K. J., Urbano, T. G., Bhide, S. A., Clark, C., Miles, E. A., Miah, A. B., Newbold, K., Tanay, M., Adab, F., Jefferies, S. J., Scrase, C., Yap, B. K., A'Hern, R. P., Sydenham, M. A., Emson, M., and Hall, E. (2011) Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *The Lancet. Oncology* **12**, 127-136
190. Peng, G., Wang, T., Yang, K. Y., Zhang, S., Zhang, T., Li, Q., Han, J., and Wu, G. (2012) A prospective, randomized study comparing outcomes and toxicities of intensity-modulated radiotherapy vs. conventional two-dimensional radiotherapy for the treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **104**, 286-293
191. Winquist, E., Agbassi, C., Meyers, B. M., Yoo, J., and Chan, K. K. W. (2017) Systemic therapy in the curative treatment of head and neck squamous cell cancer: a systematic review. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale* **46**, 29
192. Zenda, S., Onozawa, Y., Boku, N., Iida, Y., Ebihara, M., and Onitsuka, T. (2007) Single-agent docetaxel in patients with platinum-refractory metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Japanese journal of clinical oncology* **37**, 477-481
193. Spencer, S. A., Harris, J., Wheeler, R. H., Machtay, M., Schultz, C., Spanos, W., Rotman, M., and Meredith, R. (2001) RTOG 96-10: reirradiation with concurrent hydroxyurea and 5-fluorouracil in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **51**, 1299-1304
194. Hainsworth, J. D., Meluch, A. A., McClurkan, S., Gray, J. R., Stroup, S. L., Burris, H. A., 3rd, Yardley, D. A., Bradof, J. E., Yost, K., Ellis, J. K., and Greco, F. A. (2002) Induction paclitaxel, carboplatin, and infusional 5-FU followed by concurrent radiation therapy and weekly paclitaxel/carboplatin in the treatment of locally advanced head and neck cancer: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* **8**, 311-321
195. Pignon, J. P., le Maître, A., Maillard, E., and Bourhis, J. (2009) Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **92**, 4-14
196. Taberna, M., Oliva, M., and Mesía, R. (2019) Cetuximab-Containing Combinations in Locally Advanced and Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in oncology* **9**, 383
197. Laban, S., Doescher, J., Schuler, P. J., Bullinger, L., Brunner, C., Veit, J. A., and Hoffmann, T. K. (2015) [Immunotherapy of head and neck tumors: Highlights of the ASCO Meeting 2015]. *Hno* **63**, 612-619
198. Syn, N. L., Teng, M. W. L., Mok, T. S. K., and Soo, R. A. (2017) De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet. Oncology* **18**, e731-e741
199. Schmitz, W., Koderer, C., El-Mesery, M., Gubik, S., Sampers, R., Straub, A., Kübler, A. C., and Seher, A. (2021) Metabolic Fingerprinting of Murine L929 Fibroblasts as a Cell-Based Tumour Suppressor Model System for Methionine Restriction. **22**, 3039

200. AG, R. I. (2012) CASY Cell Counter + Analyser System Model TT. *Operator Manual Version 2.3E*
201. Gillies, R. J., Didier, N., and Denton, M. (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical biochemistry* **159**, 109-113
202. Noeske, K. (1966) Die Bindung von Kristallviolett an Desoxyribonukleinsäure. *Histochemie* **7**, 273-287
203. Smith, B. J. (1994) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **32**, 23-34
204. Li, Y., Liu, F., Wang, Y., Li, D., Guo, F., Xu, L., Zeng, Z., Zhong, X., and Qian, K. (2016) Rapamycin-induced autophagy sensitizes A549 cells to radiation associated with DNA damage repair inhibition. *Thorac Cancer* **7**, 379-386
205. St John, M. A., Li, Y., Zhou, X., Denny, P., Ho, C. M., Montemagno, C., Shi, W., Qi, F., Wu, B., Sinha, U., Jordan, R., Wolinsky, L., Park, N. H., Liu, H., Abemayor, E., and Wong, D. T. (2004) Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **130**, 929-935
206. Yoshii, S. R., and Mizushima, N. (2017) Monitoring and Measuring Autophagy. *International journal of molecular sciences* **18**
207. Huang, T., Song, X., Yang, Y., Wan, X., Alvarez, A. A., Sastry, N., Feng, H., Hu, B., and Cheng, S. Y. (2018) Autophagy and Hallmarks of Cancer. *Crit Rev Oncog* **23**, 247-267
208. Sproll, K. C., Balló, H., Hoffmann, T. K., Scheckenbach, K., Koldovsky, U., Balz, V., Hafner, D., Ramp, U., and Bier, H. (2009) Is there a role for the Fas-/Fas-Ligand pathway in chemoresistance of human squamous cell carcinomas of the head and neck (SCCHN)? *Oral oncology* **45**, 69-84
209. Peter, M. E., and Krammer, P. H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**, 26-35
210. Ivanov, V. N., Lopez Bergami, P., Maulit, G., Sato, T. A., Sassoon, D., and Ronai, Z. (2003) FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol* **23**, 3623-3635
211. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 3448-3459
212. Waugh, D. J., and Wilson, C. (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 6735-6741
213. Selimovic, D., Wahl, R. U., Ruiz, E., Aslam, R., Flanagan, T. W., Hassan, S. Y., Santourlidis, S., Haikel, Y., Friedlander, P., Megahed, M., Kandil, E., and Hassan, M. (2019) Tumor necrosis factor- α triggers opposing signals in head and neck squamous cell carcinoma and induces apoptosis via mitochondrial- and non-mitochondrial-dependent pathways. *Int J Oncol* **55**, 1324-1338
214. Young, T. M., Reyes, C., Pasnikowski, E., Castanaro, C., Wong, C., Decker, C. E., Chiu, J., Song, H., Wei, Y., Bai, Y., Zambrowicz, B., Thurston, G., and Daly, C. (2020) Autophagy protects tumors from T cell-mediated cytotoxicity via inhibition of TNF α -induced apoptosis. *Sci Immunol* **5**
215. Kitamura, N., Sento, S., Yoshizawa, Y., Sasabe, E., Kudo, Y., and Yamamoto, T. (2020) Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences* **22**
216. Yun, C. W., and Lee, S. H. (2018) The Roles of Autophagy in Cancer. *International journal of molecular sciences* **19**

217. Liu, Q., Li, A., Tian, Y., Wu, J. D., Liu, Y., Li, T., Chen, Y., Han, X., and Wu, K. (2016) The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **31**, 61-71
218. Wanders, D., Hobson, K., and Ji, X. (2020) Methionine Restriction and Cancer Biology. *Nutrients* **12**
219. Lu, S., Hoestje, S. M., Choo, E., and Epner, D. E. (2003) Induction of caspase-dependent and -independent apoptosis in response to methionine restriction. *Int J Oncol* **22**, 415-420
220. Lu, S., Hoestje, S. M., Choo, E. M., and Epner, D. E. (2002) Methionine restriction induces apoptosis of prostate cancer cells via the c-Jun N-terminal kinase-mediated signaling pathway. *Cancer letters* **179**, 51-58
221. Maycotte, P., Gearheart, C. M., Barnard, R., Aryal, S., Mulcahy Levy, J. M., Fosmire, S. P., Hansen, R. J., Morgan, M. J., Porter, C. C., Gustafson, D. L., and Thorburn, A. (2014) STAT3-mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious. *Cancer research* **74**, 2579-2590
222. Levy, J. M., Thompson, J. C., Griesinger, A. M., Amani, V., Donson, A. M., Birks, D. K., Morgan, M. J., Mirsky, D. M., Handler, M. H., Foreman, N. K., and Thorburn, A. (2014) Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAF(V600E) brain tumors. *Cancer discovery* **4**, 773-780
223. Chude, C. I., and Amaravadi, R. K. (2017) Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *International journal of molecular sciences* **18**
224. Tsapras, P., and Nezis, I. P. (2017) Caspase involvement in autophagy. *Cell Death Differ* **24**, 1369-1379
225. Hughes, M. A., Powley, I. R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., Schwabe, J. W., Leverkus, M., Cain, K., and MacFarlane, M. (2016) Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Molecular cell* **61**, 834-849
226. Li, X., Pan, X., Zhang, H., Lei, D., Liu, D., Xu, F., and Luan, X. (2008) Overexpression of cFLIP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinicopathologic correlations. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**, 609-615
227. Jia, L., Wang, J., Wu, T., Wu, J., Ling, J., and Cheng, B. (2017) In vitro and in vivo antitumor effects of chloroquine on oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* **16**, 5779-5786
228. Fedele, A. O., and Proud, C. G. (2020) Chloroquine and bafilomycin A mimic lysosomal storage disorders and impair mTORC1 signalling. *Biosci Rep* **40**
229. Varisli, L., Cen, O., and Vlahopoulos, S. (2020) Dissecting pharmacological effects of chloroquine in cancer treatment: interference with inflammatory signaling pathways. *Immunology* **159**, 257-278
230. Whitton, B., Okamoto, H., Packham, G., and Crabb, S. J. (2018) Vacuolar ATPase as a potential therapeutic target and mediator of treatment resistance in cancer. *Cancer Med* **7**, 3800-3811
231. Magnano, S., Hannon Barroeta, P., Duffy, R., O'Sullivan, J., and Zisterer, D. M. (2021) Cisplatin induces autophagy-associated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) mediated in part through reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol* **427**, 115646
232. Aissat, N., Le Tourneau, C., Ghoul, A., Serova, M., Bieche, I., Lokiec, F., Raymond, E., and Faivre, S. (2008) Antiproliferative effects of rapamycin as a

- single agent and in combination with carboplatin and paclitaxel in head and neck cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **62**, 305-313
233. Molinolo, A. A., Hewitt, S. M., Amornphimoltham, P., Keelawat, S., Rangdaeng, S., Meneses García, A., Raimondi, A. R., Jufe, R., Itoiz, M., Gao, Y., Saranath, D., Kaleebi, G. S., Yoo, G. H., Leak, L., Myers, E. M., Shintani, S., Wong, D., Massey, H. D., Yeudall, W. A., Lonardo, F., Ensley, J., and Gutkind, J. S. (2007) Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 4964-4973
234. Nam, H. Y., Han, M. W., Chang, H. W., Lee, Y. S., Lee, M., Lee, H. J., Lee, B. W., Lee, H. J., Lee, K. E., Jung, M. K., Jeon, H., Choi, S. H., Park, N. H., Kim, S. Y., and Kim, S. W. (2013) Radioresistant cancer cells can be conditioned to enter senescence by mTOR inhibition. *Cancer research* **73**, 4267-4277
235. Castedo, M., Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2002) Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ* **9**, 99-100
236. Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M. N. (2011) Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery* **10**, 868-880
237. Birk, R., Schell, A., Aderhold, C., Hoch, S., Huber, L., Mueller, C. E., Lammert, A., Scherl, C., Rotter, N., Sommer, J. U., and Kramer, B. (2020) Apoptosis-related Proteins Are Altered by Selective Tyrosine Kinase Inhibitors and Everolimus in HPV-dependent SCC. *Anticancer Res* **40**, 6195-6203
238. Ko, J. H., Yoon, S. O., Lee, H. J., and Oh, J. Y. (2017) Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NFκB pathways in autophagy- and p62-dependent manners. *Oncotarget* **8**, 40817-40831
239. Kahraman, D. C., Kahraman, T., and Cetin-Atalay, R. (2019) Targeting PI3K/Akt/mTOR Pathway Identifies Differential Expression and Functional Role of IL8 in Liver Cancer Stem Cell Enrichment. *Mol Cancer Ther* **18**, 2146-2157
240. Monkkonen, T., and Debnath, J. (2018) Inflammatory signaling cascades and autophagy in cancer. *Autophagy* **14**, 190-198
241. Chan, L. P., Liu, C., Chiang, F. Y., Wang, L. F., Lee, K. W., Chen, W. T., Kuo, P. L., and Liang, C. H. (2017) IL-8 promotes inflammatory mediators and stimulates activation of p38 MAPK/ERK-NF-κB pathway and reduction of JNK in HNSCC. *Oncotarget* **8**, 56375-56388
242. Divac Rankov, A., Ljujić, M., Petrić, M., Radojković, D., Pešić, M., and Dinić, J. (2017) Targeting autophagy to modulate cell survival: a comparative analysis in cancer, normal and embryonic cells. *Histochem Cell Biol* **148**, 529-544
243. Gąsioriewicz, B. M., Koczurkiewicz-Adamczyk, P., Piska, K., and Pękala, E. (2021) Autophagy modulating agents as chemosensitizers for cisplatin therapy in cancer. *Invest New Drugs* **39**, 538-563
244. Rebecca, V. W., and Amaravadi, R. K. (2016) Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene* **35**, 1-11
245. Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C., and Debnath, J. (2019) Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions. *Cancer discovery* **9**, 1167-1181
246. Piao, S., Ojha, R., Rebecca, V. W., Samanta, A., Ma, X. H., McAfee, Q., Nicastri, M. C., Buckley, M., Brown, E., Winkler, J. D., Gimotty, P. A., and Amaravadi, R. K. (2017) ALDH1A1 and HLTF modulate the activity of lysosomal autophagy inhibitors in cancer cells. *Autophagy* **13**, 2056-2071

247. Noman, M. Z., Janji, B., Kaminska, B., Van Moer, K., Pierson, S., Przanowski, P., Buart, S., Berchem, G., Romero, P., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2011) Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer research* **71**, 5976-5986
248. DeVorkin, L., Pavey, N., Carleton, G., Comber, A., Ho, C., Lim, J., McNamara, E., Huang, H., Kim, P., Zacharias, L. G., Mizushima, N., Saitoh, T., Akira, S., Beckham, W., Lorzadeh, A., Moksa, M., Cao, Q., Murthy, A., Hirst, M., DeBerardinis, R. J., and Lum, J. J. (2019) Autophagy Regulation of Metabolism Is Required for CD8(+) T Cell Anti-tumor Immunity. *Cell reports* **27**, 502-513.e505
249. Mgrditchian, T., Arakelian, T., Paggetti, J., Noman, M. Z., Viry, E., Moussay, E., Van Moer, K., Kreis, S., Guerin, C., Buart, S., Robert, C., Borg, C., Vielh, P., Chouaib, S., Berchem, G., and Janji, B. (2017) Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E9271-e9279

I. Abkürzungsverzeichnis

AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Atg-Proteine	autophagy-related protein
DFCP1	double FYVE-containing protein 1
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMEM/F12	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium: Nutrient Mixture F-12
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
GEMM	genetically engineered mouse model
HCL	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HNSCC	Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma

HOPS-Komplex	homotypic fusion and protein sorting complex
HPV	humanes Papillomavirus
IC10	inhibitory concentration of 10%
IL-8	Interleukin-8
LC3	microtubule-associated protein 1a/1B-light chain 3
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEM	Minimum Essential Medium
MR	Methioninrestriktion
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MW	Mittelwert
NF- κ B	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
OSCC	oral squamous cell carcinoma
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline
pH	Potential des Wasserstoffs
PI3KC3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase
PKA	Proteinkinase A
SD	Standardabweichung

SDS-Page	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
STX17	Syntaxin-17
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFEB	transcription factor EB
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSCC	tongue squamous cell carcinoma
Tween	Polysorbate 20
ULK1/2	Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2
UVRAG	UV-radiation resistance-associated gene proteine
V-ATPase	vacuolar-type ATPase
WIPI	WD-repeat domain phospholinositides-interacting protein

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung der Bildung eines Autophagolysosoms.	3
Abbildung 2: mTOR-abhängige Aktivierung des Initiationskomplexes.....	4
Abbildung 3: Bildung der Isolationsmembran.	6
Abbildung 4: LC3- und Atg16L-Konjugationssystem.....	9
Abbildung 5: Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom.....	10
Abbildung 6: aktuelle klinische Studien zur Beeinflussung der Autophagie in der Therapie unterschiedlicher Tumorentitäten	15
Abbildung 7: Inhibitorische Effekte von Chloroquin.....	38
Abbildung 8: inhibitorische Effekte von Bafilomycin.....	39
Abbildung 9: inhibitorische Effekte von Rapamycin.	41
Abbildung 10: Einfluss von FasL auf die Zellproliferationsrate im HNSCC.	43
Abbildung 11: Einfluss von TNF α auf die Zellproliferationsrate im HNSCC.....	44
Abbildung 12: Einfluss von Cisplatin auf die Zellproliferationsrate im HNSCC.	45
Abbildung 13: Kombinationstherapie FasL und Chloroquin.....	47
Abbildung 14: Kombinationstherapie TNF α und Chloroquin.....	49
Abbildung 15: Kombinationstherapie Cisplatin und Chloroquin.....	50
Abbildung 16: Kombinationstherapie FasL und Bafilomycin.....	51
Abbildung 17: Kombinationstherapie TNF α und Bafilomycin.....	53
Abbildung 18: Kombinationstherapie Cisplatin und Bafilomycin.....	54
Abbildung 19: Kombinationstherapie FasL und Rapamycin.	55
Abbildung 20: Kombinationstherapie TNF α und Rapamycin.	57

Abbildung 21: Kombinationstherapie Cisplatin und Rapamycin.	58
Abbildung 22: Methioninrestriktion und FasL.....	60
Abbildung 23: Methioninrestriktion in Kombination mit Autophagie-Modulatoren und TNF α	62
Abbildung 24: Analyse der IL-8 Expression.	65
Abbildung 25: Analyse der LC3-II-Expression nach Stimulation mit autophagiemodulierenden Wirkstoffen.	68

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräteliste.....	26
Tabelle 2: Materialliste.....	27
Tabelle 3: Zellkulturmedien.....	28
Tabelle 4: Reagenzien.....	29
Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 6: Software.....	31
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Zelllinien inklusive deren Lokalisation und Kulturmedium.	32
Tabelle 8: Polyacrylamid-Gele.....	35
Tabelle 9: Chloroquin/Bafilomycin IC ₁₀	42

IV. Danksagung

Im Zuge dieser Promotionsarbeit gibt es einige Personen denen ich danken möchte, denn ohne deren Hilfe und Mitwirkung wäre diese Promotionsarbeit nicht zustande gekommen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler, der als Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg die Betreuung dieser Promotionsschrift übernommen und das wissenschaftliche Labor zur Durchführung aller Experimente zur Verfügung gestellt hat. Ebenfalls danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Thomas Müller für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich vor allem Herrn Dr. rer. nat. Axel Seher, Leiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für seine intensive, geduldige und stets hilfsbereite Betreuung bei allen Fragen, die bei der Herstellung dieser Promotion aufkamen. Jederzeit traf ich mit etwaigen Fragen bei Herrn Dr. Seher auf offene Ohren. Eine solch engagierte Betreuung kann sich jeder Doktorand nur wünschen! Im selben Zuge möchte ich hier die Mitarbeiterinnen des wissenschaftlichen Labors Frau Margit Schleyer und Frau Irina Kucerov erwähnen, die mir auch immer für alle Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen und deren hilfsbereites und kollegiales Verhalten ich nicht als Selbstverständlichkeit angesehen habe. Vielen Dank!

Zum Schluss gebührt der größte Dank den mir nahe stehenden Menschen, allen voran meiner Familie, die mich in welcher Form auch immer während der Erstellung dieser Promotionsarbeit unterstützt und motiviert haben. Ohne euch wäre ich niemals an diesen Punkt in meinem Leben gelangt.

V.Veröffentlichungen

Beiträge zu Publikationen:

2021 Schmitz, Koderer, El-Mesery, Gubik, **Sampers**, Straub, Kübler, Seher
“Metabolic Fingerprinting of Murine L929 Fibroblasts as a Cell-Based
Tumour Suppressor Model System for Methionine Restriction”, International
Journal of Molecular Science