

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

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

Einfluss von HGF und Foretinib auf den Glukosestoffwechsel
bei Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexander Abt

aus Bretzfeld

Würzburg, September 2019



Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. Dr. Urs Müller-Richter

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. Schlagenhaut

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2020

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie.....	1
1.2	Ätiologie.....	2
1.3	Diagnose und Staging.....	6
1.4	Therapie.....	7
1.4.1	Chirurgie.....	7
1.4.2	Radiotherapie.....	8
1.4.3	Chemotherapie.....	9
1.4.4	Weitere Therapieformen.....	9
1.5	Molekulare Grundlagen von Kopf-Hals-Karzinomen.....	11
1.5.1	Mesenchymal epithelial transition-Rezeptor (Met-Rezeptor).....	13
1.5.2	Glukosestoffwechsel und Tumormikromilieu.....	17
2	Zielsetzung.....	18
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Materialien.....	19
3.1.1	Zelllinien.....	19
3.1.2	Kulturmedien und Zusätze.....	19
3.1.3	Antikörper.....	20
3.1.4	Kits.....	21
3.1.5	Medikamente, Wachstumsfaktoren, Primer.....	21
3.1.6	Chemikalien, Lösungen.....	22
3.1.7	Geräte.....	22
3.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	24
3.1.9	Computerprogramme zur Analyse und Bearbeitung.....	26
3.2	Methoden.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Zellkultur.....	27
3.2.2	FACS zum Nachweis des Met-Rezeptors auf den Tumorzelllinien.....	28
3.2.3	ELISA zum Nachweis von endogenem HGF.....	28
3.2.4	Zellviabilitätsassay	29
3.2.4.1	Monotherapie HGF.....	29
3.2.4.2	Monotherapie Foretinib	30
3.2.4.3	Simultane Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib.....	31
3.2.5	Echtzeit-PCR zum Nachweis der Genexpression nach HGF-Stimulation und nach Inhibition mit Foretinib.....	32
3.2.6	FACS zum Nachweis von GLUT1 auf den Tumorzellen.....	35
4	Ergebnisse.....	36
4.1	Vorbemerkung.....	36
4.2	FACS zum Nachweis des Met-Rezeptors auf den Tumorzelllinien.....	37
4.3	ELISA zum Nachweis von endogenem HGF.....	39
4.4	Zellviabilitätsassay	40
4.4.1	Zellviabilitätsassay mit HGF zum Nachweis einer proliferierenden Wirkung auf die Tumorzellen.....	40
4.4.2	Zellviabilitätsassay mit Foretinib zum Nachweis einer toxischen Wirkung auf die Tumorzellen.....	43
4.4.3	T-Test-Analyse der Foretinib-Zellviabilitätsassays	46
4.4.4	Simultane Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib.....	47
4.5	Echtzeit-PCR zum Nachweis der Genexpression nach HGF-Stimulation sowie nach Inhibition mit Foretinib.....	50
4.5.1	A253	52
4.5.2	Detroit 562	53
4.5.3	FaDu.....	54
4.5.4	SCC9.....	55

Inhaltsverzeichnis

4.5.5	SCC25.....	56
4.6	FACS zum Nachweis von GLUT1 auf den Zelllinien	57
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	64
5	Diskussion	65
5.1	FACS zum Nachweis des Met-Rezeptors auf den Tumorzelllinien.....	65
5.2	ELISA zum Nachweis von endogenem HGF.....	66
5.3	Zellviabilitätsassay	66
5.3.1	Zellviabilitätsassay mit HGF und Foretinib zum Nachweis einer proliferationsfördernden beziehungsweise toxischen Wirkung auf die Tumorzellen	66
5.3.2	Simultane Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib.....	69
5.4	Echtzeit-PCR zum Nachweis der Genexpression nach HGF-Stimulation sowie nach Inhibition mit Foretinib.....	70
5.5	FACS zum Nachweis von GLUT1 auf den Zelllinien	73
6	Zusammenfassung.....	76
7	Literaturverzeichnis	78
8	Abbildungsverzeichnis	86
8.1	Literaturverzeichnis der Abbildungen.....	87
9	Tabellenverzeichnis	88
10	Abkürzungsverzeichnis	89
11	Veröffentlichungen.....	91
12	Danksagung	92
13	Curriculum Vitae	93

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Maligne Erkrankungen der Schleimhaut der Lippe, der Mundhöhle samt Speicheldrüsen, des Rachens, des Kehlkopfes und der knöchernen Strukturen werden als Head and Neck Cancer (HNC) zusammengefasst. Mehr als 90% der HNC sind histologisch gesehen Plattenepithelkarzinome, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC).¹ HNSCC ist die sechsthäufigste Krebserkrankung weltweit mit jährlich ca. 650.000 neu diagnostizierten Fällen, wobei zwei Drittel der Patienten aus Entwicklungsländern stammen.^{2, 3}

Im Jahr 2013 erkrankten in Deutschland etwa 13.000 Männer und 4.500 Frauen, wobei die Tendenz bei Frauen steigend (+1,3%) und bei Männern hingegen abfallend ist (-0,7%).⁴ Alleine in den Vereinigten Staaten betrug im Jahr 2016 der Anteil der HNC an allen dokumentierten Krebserkrankungen mit 61.760 ca. 3,6% der diagnostizierten Tumorfälle.⁵ Im Vergleich zur im Jahr 2006 erfassten Krebsstatistik liegt ein Anstieg der diagnostizierten Erkrankungen um 21.261 Fälle vor.⁶ Ein deutlicher Zuwachs ist bei unterschiedlich lokalisierten Tumoren zu erkennen, so wurden 2016 im Vergleich zu 2006 rund 6.570 Fälle im Pharynx- und rund 5.280 Fälle im Zungenbereich mehr diagnostiziert. Dies entspricht einem prozentualen Zuwachs von 63% beziehungsweise 58%. Es kann beobachtet werden, dass die Zahl der diagnostizierten Larynxkarzinome in diesem Zeitraum gestiegen ist (2006: 9.510 neue Fälle; 2016: 13.430 neue Fälle), allerdings hat die Zahl der Todesfälle leicht abgenommen (2006: 3.740 Todesfälle; 2016: 3.620 Todesfälle). Chaturvedi et al. konnten 2013 in einer Studie belegen, dass im Zeitraum zwischen 1983-2002 die Anzahl der oropharyngealen Karzinome in den Industriestaaten angestiegen ist.⁷

Durchschnittlich erkranken die meisten Patienten in der 6. Lebensdekade an einem oralen Plattenepithelkarzinom, wobei dreimal mehr Männer als Frauen und außerdem auch häufiger afroamerikanische Menschen betroffen sind.⁸ Eine Besonderheit im Erkrankungsalter findet sich bei oropharyngealen Karzinomen, da hier besonders jüngere Patienten im Alter von 40-55 Jahren betroffen sind.⁹

Einleitung

1.2 Ätiologie

Die bekanntesten Risikofaktoren, die zur Entstehung eines HNSCC führen, sind jahrelanger Tabakgenuss, exzessiver Alkoholkonsum sowie virale Erkrankungen. Betrachtet man die möglichen Ursachen für die Entstehung von HNSCC, so sind Tabak- und Alkoholgenuss an bis zu 75% der HNSCC beteiligt.¹⁰

Übermäßiger Nikotinkonsum führt zu einem fünf- bis 25-fach höheren Risiko, ein HNSCC zu entwickeln, da Tabakrauch mehr als fünftausend unterschiedliche Stoffe beinhaltet, von denen 60 zytotoxische, mutagene und kanzerogene Eigenschaften besitzen.^{2, 3} Das erhöhte Risiko steht dabei in direktem Zusammenhang mit der Dauer und dem Ausmaß des Tabakverbrauchs. Marron et al. konnten in einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2010 aufzeigen, dass schon nach ein bis vier Jahren Nikotinkarenz eine signifikante Reduktion des Risikos einer HNSCC-Erkrankung erkennbar wird. Um die Erkrankungswahrscheinlichkeit eines Nichtraucherers zu erreichen, sind 17-20 Jahre ohne Konsum nötig.¹¹ Dies gilt allerdings nur für das Erkrankungsrisiko bei Mundhöhlen- und Rachenkarzinomen, nicht etwa beim Larynxkarzinom. Ursächlich dafür ist, dass Larynxkarzinome mehr Gemeinsamkeiten mit der Entstehungsursache eines Lungenkarzinoms aufweisen als mit der Entstehungsursache von oralen oder pharyngealen Karzinomen.¹² Selbst bei Nichtrauchern steigt das Risiko einer HNSCC-Erkrankung durch Passivrauchen. So haben Personen, die lebenslang passiv Tabakrauch ausgesetzt sind, ein 2,8-fach höheres Risiko, an einem HNSCC zu erkranken.¹³

Insbesondere der Konsum hochprozentigen Alkohols erhöht die Erkrankungswahrscheinlichkeit deutlich, weswegen der alleinige Verzehr von Alkohol auch als Ursache eines HNSCC gilt.^{8, 11} Die genauen Vorgänge der Karzinogenese durch Alkohol sind noch nicht abschließend erforscht, allerdings konnte herausgefunden werden, dass das Stoffwechselprodukt Acetaldehyd eine besondere Rolle einnimmt, da dieses DNA-Addukte bilden kann, die wiederum mit der DNA-Synthese und -Reparatur wechselwirken können.¹⁴ Das Erkrankungsrisiko kann durch eine Alkoholabstinenz reduziert werden, so sind erste Risikoverminderungen nach drei Jahren erkennbar. Um das Risiko einer Erkrankung auf den Stand eines „Niemals-Trinkers“ zu reduzieren, bedarf es eines Alkoholverzichts von 20 Jahren.¹¹ Es liegen jedoch auch Literaturangaben mit anderen Ergebnissen vor. So

Einleitung

berichten Marron et al., dass selbst nach 20-jähriger Abstinenz das Risiko um lediglich 40% sinkt.¹²

Eine Fallstudie aus dem Jahr 2004 von Castellsague et al. berichtet dagegen von einem 12,7-fach höheren Risiko, an einem HNSCC zu erkranken für Menschen, die beiden Noxen ausgesetzt sind, im Vergleich zu Menschen, die nur einer der beiden Noxen ausgesetzt sind.¹¹ Das erhöhte Risiko ergibt sich durch synergistische Effekte. Zurückzuführen ist dies auf die Eigenschaft des Alkohols, als Lösungsmittel zu wirken, wodurch die Schleimhaut für Kanzerogene durchgängig gemacht wird.^{14, 15}

Auch der sogenannte „smokeless tobacco“, worunter man das Kauen beziehungsweise das Schniefen von getrocknetem Tabak versteht, wurde in Studien als Risikofaktor für die Entstehung von oralen Karzinomen ausgemacht.¹⁶ In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2016 von Wyss et al. wurde der Einfluss von Tabakkauen und des Schniefens von getrocknetem Tabak auf das Auftreten von oralen Karzinomen untersucht. So wird für das Auftreten von Kopf-Hals-Karzinomen für „Niemals-Zigaretten-Raucher“ ein 1,71-fach höheres Risiko bei ständigem Schnupftabakgebrauch beschrieben und ein 1,2-fach erhöhtes Risiko beim Tabakkauen. Das Risiko für Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs ist bei ständigem Schnupftabakgebrauch 1,6-fach, beim Tabakkauen 1,17-fach erhöht.¹⁷

Ebenso kann das Risiko, an einem HNSCC zu erkranken, durch die vor allem in asiatischen Ländern verbreitete Gewohnheit des Betelnuss-Kauens (engl.: Betel Quid) steigen.¹⁸ Betel Quid besteht aus Arecanuss (Betelnuss), gelöschtem Kalk und den Blättern der Betelpfefferpflanze. Zusätzlich können Gewürze, Tabak oder Aromastoffe enthalten sein. Das Kauen des Gemisches führt zur charakteristischen rotbräunlichen Verfärbung der Zähne und der Mukosa. Die karzinogenen Eigenschaften werden vor allem den Alkaloiden zugeschrieben, die zu Nitrosaminen, welche kanzerogen sind, verstoffwechselt werden. Die möglichen Folgen sind submuköse Fibrosen, präkanzerogene Läsionen und auch orale Plattenepithelkarzinome.¹⁹

Ein weiterer Risikofaktor sind virale Erkrankungen. Hier sei zu allererst die Infektion mit humanen Papillomaviren genannt, allerdings können auch Epstein-Barr-Virus-Infektionen zur Karzinomentstehung beitragen. Humane Papillomaviren (HPV) sind eine Gruppe von

Einleitung

etwa 130 kleinen, doppelsträngigen DNA-Viren, die in high-risk (16, 18, 31, 33) and low-risk (26, 30, 34) Viren unterteilt werden. Schon Anfang der 1980er Jahre konnte Harald zur Hausen beweisen, dass HPV für die Entstehung von Cervix-Karzinomen verantwortlich sind. Eine Studie aus dem Jahr 2003 fand heraus, dass 96,6% der Gebärmutterhalskarzinome mit HPV vergesellschaftet sind.²⁰ High-risk-Viren sind überdies verantwortlich für einige andere bösartige Erkrankungen wie Analkarzinome, Vaginal- und Peniskarzinome. Low-risk-HPV führen zur Bildung gewöhnlicher Hautwarzen und Feigwarzen.

In 23% - 35% aller HNSCC-Biopsien sind HPV erkennbar. Bestimmte sexuelle Praktiken, keine Verhütung und häufig wechselnde Sexualpartner tragen zur Übertragung der HPV in die Mundhöhle bei, wobei das Risiko mit der Anzahl der Sexualpartner zunimmt.²¹ Bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen tragen HPV in 45% - 90% der Fälle und somit am häufigsten zur Erkrankung bei.²² Durch HPV entstehen im Wesentlichen oropharyngeale Karzinome, die hauptsächlich im Bereich des Zungengrunds oder im Bereich der Tonsillen auftreten.

Bereits im Jahr 1983 spekulierten Syrjanen et al., dass es weitere ursächliche Faktoren bei der Entstehung von HNSCC geben müsse. Verantwortlich für diesen Anstieg wurden HPV gemacht, da der Einfluss klassischer Risikofaktoren wie Tabak- oder Alkoholkonsum in den Anamnesen der Patienten nicht nachgewiesen werden konnte.^{23, 24} Außerdem sind HPV-positive HNSCC-Patienten deutlich jünger als die klassischen HNSCC-Patienten.

Das Genom der HPV besteht aus sechs regulatorischen Proteinen (E1, E2, E4, E5, E6, E7) sowie aus zwei viralen Proteinen, die für die Virenkapsel zuständig sind (L1, L2). E5, E6 und E7 sind als Onkoproteine für die Karzinogenese von großer Bedeutung, da ihre Expression zur Zellimmortalisierung führt. Insbesondere E6 und E7 nehmen dabei eine besondere Rolle ein, da sie zum Abbau der Tumorsuppressorproteine, p53 und Retinoblastom-Protein (pRb), in den Keratinozyten führen.²² p53 ist ein Protein, welches den Zellzyklus stoppt beziehungsweise die Apoptose einleitet, abhängig vom Schaden der DNA. pRb kontrolliert im Zellzyklus den Übergang der G1-Phase in die S-Phase. Obwohl HPV-induzierte oropharyngeale Karzinome erst spät diagnostiziert werden, haben die Patienten bessere Überlebenschancen als Patienten mit HPV-negativen Tumoren, da die Tumore besser auf eine Bestrahlung und eine Chemotherapie ansprechen.²²

Einleitung

Mit dem Epstein-Barr-Virus, welches vor allem durch das Pfeiffer'sche Drüsenfieber bekannt ist, sind nasopharyngeale Karzinome und das Burkitt-Lymphom assoziiert. Eine mangelnde orale Hygiene stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar. In einer Studie von Rosenquist et al. aus dem Jahr 2005 wurde ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines HNSCC mit schlechter Mundhygiene und fehlenden Zähnen beschrieben.²⁵

Chronische Entzündungszustände stellen einen weiteren Risikofaktor dar, da beispielsweise mechanisch entstandene Traumata durch Wangenbeißen oder scharfe Zahnkanten entarten können, sodass daraus ein invasives Karzinom wächst.²⁶

Auch die Ernährung beeinflusst die mögliche Entstehung eines Karzinoms; so wird das Risiko durch den regelmäßigen Verzehr von Früchten und Gemüse gesenkt. Dagegen erhöht der Verzehr von zubereitetem, rotem Fleisch die Gefahr eines HNSCC.²⁷

Bei genetischen Prädispositionen wie der sehr seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Fanconi-Anämie ist das Krebsrisiko im Vergleich zum gesunden Menschen um mehrere hundertmal größer.¹⁴

1.3 Diagnose und Staging

Neben der Anamnese steht zunächst die klinische Untersuchung der Mundhöhle und des Rachens im Vordergrund. Hierbei werden verstärkt die Oberfläche, Farbe, Abgrenzbarkeit und Verschieblichkeit der Schleimhautveränderung untersucht. Malignome werden durch unregelmäßige, wenig verschiebliche, zerklüftete, erosive, ulzeröse Schleimhautpartien charakterisiert. Klinische Symptome wie Heiserkeit, Schluckbeschwerden, Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Leistungsknicke oder auch Parästhesien deuten auf ein malignes Geschehen im Kopfbereich hin. Familienanamnestisch wurde beim HNSCC keine genetische Komponente gefunden. Alle Patienten mit einer Schleimhautveränderung, die seit mehr als zwei Wochen besteht, sollten umgehend von einem Spezialisten untersucht werden. Des Weiteren dient die Endoskopie dazu, um okkulte Tumore beziehungsweise Zweittumore ausfindig zu machen.

Die klinische Diagnostik wird dann um die bildgebenden Untersuchungen erweitert. Eine klassische Panoramaschichtaufnahme oder eine digitale Volumentomographie eignen sich gut, um den Zahnstatus aufzuzeigen. Eine konventionelle Orthopantomographie ist dazu in der Lage, eine Knocheninfiltration darzustellen, wenn mindestens 30% des Knochens demineralisiert sind. Das OPG zeigt eine Sensitivität von 92%. In 8% der Fälle kommt es zu einer verfehlten Infiltrationsdiagnose, in 12% der Fälle zu falsch-positiven Aussagen.²⁸ Zur lokalen Ausdehnung eignet sich die Computertomographie (CT) beziehungsweise die Magnetresonanztomographie (MRT). Ein Nachteil der CT ist bei der Bildung metallischer Artefakte gegeben, als vorteilhaft zu betrachten ist die Fähigkeit, die Knocheninfiltration zu beurteilen.²⁹ Das MRT eignet sich besser, um Weichgewebe darzustellen. Mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie kann eine Aussage über die Stoffwechselaktivität eines bestimmten Gewebes getroffen werden. Einen immer bedeutsameren Stellenwert im Staging bekommt die Positronen-Emissions-Tomographie-Computer-Tomographie, die Fusionsbildgebung aus PET und CT. Die gemeinsame Betrachtung der Lokalisation, morphologischer Aspekte und der Stoffwechselaktivität erleichtern das Auffinden von lokoregionären Metastasen sowie Fernmetastasen.¹⁰ Nachteilig zu betrachten sind falsch-positive Ergebnisse wie Entzündungen, die ebenfalls eine hohe Stoffwechselaktivität aufzeigen.

Einleitung

Im Staging werden alle tumorbezogenen Informationen wie die Tumorgöße, lokale Metastasen und Fernmetastasen zusammengefasst und im TNM-System der „Union internationale contre le cancer“ (UICC) systematisch klassifiziert. Dabei gibt das T-Stadium Auskunft über die Größe des Tumors, mit N werden die lokoregionären Lymphknotenmetastasen beschrieben und mit M vorhandene Fernmetastasen.

Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) erstellte ein weiteres Schema, basierend auf den vielen Kombinationsmöglichkeiten, die sich aus der TNM-Klassifikation ergeben.

1.4 Therapie

Die Therapie der Kopf-Hals-Karzinome basiert auf der Operation, der Radiotherapie, der klassischen Chemotherapie, der zielgerichteten Therapie („targeted therapy“) und der Immuntherapie. In der Behandlung können verschiedene Kombinationen aus den einzelnen Therapien zum Einsatz kommen. Zu Beginn der Therapie muss entschieden werden, ob eine kurative Therapie möglich oder ob eine palliative Therapie durchzuführen ist.

1.4.1 Chirurgie

Goldstandard in der kurativ-intendierten Therapie bei HNSCC ist die vollständige Tumorentfernung. Die chirurgische Therapie gliedert sich dabei in die Therapie des Primärtumors und der drainierenden Halslymphbahnen. Die Tumorentfernung sollte dabei mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm zum gesunden umliegenden Gewebe erfolgen, sodass im histologischen Präparat ein 5 mm im gesunden Gewebe gelegener Präparationsrand besteht. Bei Tumoren der Kategorie T1/T2 reicht häufig eine Operation aus, während bei T3/T4-Tumoren in den meisten Fällen eine Operation mit nachfolgender Radiotherapie angewendet wird, wobei es von einer extrakapsulären Ausdehnung oder positiven Resektionsrändern abhängig ist, ob mit oder ohne adjuvante Chemotherapie. Ein zusätzlicher wichtiger prognostischer Faktor bei HNSCC ist die Metastasierung in lokale Lymphknoten. Der Halsbereich wird nach Robbins in sechs Level, entsprechend der lokalen Lymphabflussbahnen, eingeteilt. Da es in mehr als 20% der Fälle zu einer im Staging nicht sichtbaren, okkulten, Metastasierung in die Halslymphbahnen kommt, muss diese Tatsache in der Therapieplanung und -durchführung berücksichtigt werden.³⁰ Beim Mundhöhlenkarzinom werden am häufigsten Metastasen in den Levels I-III gefunden.³¹

Einleitung

Bei der Lymphadenektomie unterscheidet man die radikale, die extendierte radikale, die modifizierte radikale und die selektive Neck dissection sowie die elektive und therapeutische Neck dissection. Die elektive Operation wird beim klinisch unauffälligen Hals (=cN0) angewendet. Ziel ist es dabei, mit einer selektiven Neck dissection das klinische Auftreten postoperativer, zervikaler Metastasen zu verhindern. Kontrovers diskutiert wird, ob eine nachgeschobene therapeutische Neck dissection, die „salvage Neck dissection“, die Überlebensrate des Patienten verringert. Mehanna et al. fanden in einer randomisierten Multicenter Phase 3-Studie heraus, dass es bei der „Watch and Wait“-Behandlung fortgeschrittener N2/N3 HNSCC-Erkrankungen im Vergleich zur geplanten Neck dissection zu ähnlichen Gesamtüberlebensraten kommt.³² Eine Besonderheit stellen Tumore des Mundbodens oder im Bereich der Zunge dar. Wegen der Gefahr der kontralateralen Metastasierung muss hier häufig zusätzlich zur ipsilateralen Seite auch die kontralaterale Halsseite ausgeräumt werden.

1.4.2 Radiotherapie

Die Bestrahlung bei Kopf-Hals-Karzinomen kann auf verschiedene Arten erfolgen. So unterscheidet man zum einen zwischen der externen Strahlentherapie und der intratumoralen Brachytherapie. Zum anderen unterscheidet man die präoperative „neo-adjuvante“ Bestrahlung von der postoperativen „adjuvanten“ Bestrahlung. Bei Tumoren der Größe T1 und T2 ist es möglich, den Tumor durch alleinige Bestrahlung des malignen Gewebes zu therapieren. Die gewöhnliche Dosis beträgt 1,8 – 2 Gy/Tag, fünf Tage pro Woche, über einen Zeitraum von sechs bis sieben Wochen, sodass eine Gesamtdosis von 60 – 70 Gy auf das Gewebe appliziert wird. Die adjuvante Bestrahlung sollte postoperativ in einem Zeitfenster von fünf bis sechs Wochen beginnen, da ansonsten die Gefahr eines Rezidivs steigt, und innerhalb von elf Wochen nach der Operation abgeschlossen sein.³³ Die postoperative Bestrahlung verbessert die lokale Rezidivfreiheit sowie die 5-Jahres-Überlebensrate im Vergleich zu einer alleinigen Operation.³⁴ Abwandlungen zur konventionellen Fraktionierung der Strahlendosis sind die Hypo-, Hyperfraktionierung sowie die akzelerierte Bestrahlung. Bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumor, der nicht operativ behandelt werden kann und palliativ behandelt werden muss, wird häufig die Hypofraktionierung angewendet. Der Tumor wird dabei mit größeren Einzeldosen bestrahlt, wobei

Einleitung

eine Gesamtdosis von 10 Gy/Woche eingehalten wird.³⁵ Die Hyperfraktionierung und die akzelerierte Fraktionierung führen hingegen zu einer Erhöhung der Strahlendosis. Bei Ersterer wird das Tumorgewebe mit kleineren Dosen von 1,15 – 1,2 Gy bestrahlt, jedoch erhöht sich die Häufigkeit der Bestrahlung auf bis zu zweimal pro Tag bei fünf Tagen pro Woche. Die akzelerierte Bestrahlung verkürzt zusätzlich die Behandlungszeit. Meta-Analysen aus dem Jahr 2010 und 2006 zeigen auf, dass eine veränderte Fraktionierung die Gesamtmortalität reduziert und die lokoregionäre Kontrolle signifikant verbessert.^{36, 37} Die hyperfraktionierte Bestrahlung schnitt dabei besser ab als die akzelerierte Bestrahlung.

1.4.3 Chemotherapie

Die bei der Therapie des HNSCC zum Einsatz kommenden Chemotherapeutika sind im Wesentlichen Cisplatin, 5-Fluorouracil, Methotrexat oder Taxane. Die alleinige Chemotherapie wird nur bei palliativer Therapieintention angewendet.³⁰ Eine Meta-Analyse von Ma et al. aus dem Jahr 2013 zeigt, dass die Induktionschemotherapie bei resektablen Kopf-Halskarzinomen zu einem um 8% geringeren Risiko für Fernmetastasen führt. Allerdings waren die Gesamtüberlebensrate und das Risiko für lokoregionäre Rezidive unverändert. Bei Patienten mit resektablen Larynxkarzinomen, welche auf die Induktionschemotherapie ansprechen, konnte der Larynx ohne Einbußen in Bezug auf die Gesamtüberlebensrate erhalten bleiben.³⁸ In einer Meta-Analyse von Budach et al. konnte herausgefunden werden, dass die Induktionschemotherapie bestehend aus dem Kombinationspräparat, Docetaxel, Cisplatin und Fluorouracil, die Gesamtüberlebensrate sowie das progressionsfreie Überleben nicht verbessert.³⁹ Die adjuvante Chemotherapie erfolgt nach der Operation beziehungsweise gemeinsam mit der Radiotherapie. Die Kombination aus beiden Therapien (Radio- und Chemotherapie) verbessert bei operablen als auch bei inoperablen Tumoren hierbei deutlich die Chance auf eine Heilung.⁴⁰

1.4.4 Weitere Therapieformen

Neben der chirurgischen, radiotherapeutischen und chemotherapeutischen Behandlung und deren Kombinationen bei Erkrankungen im Kopf- und Halsbereich gibt es auch noch weitere Medikamente, die für die Therapie von HNSCC angewendet werden. Dazu

Einleitung

gehören die bekannten Zytostatika wie Cisplatin, 5-Floururacil, Docetaxel, Methotrexat, Bleomycin, der monoklonale Antikörper Cetuximab² und neuerdings auch Pembrolizumab⁴¹ sowie Nivolumab⁴². Die fünf erstgenannten Zytostatika haben allesamt den Nachteil, dass ihre Nebenwirkungen auf den gesunden Organismus sehr hoch sind, da sie eine sehr geringe Selektivität aufweisen und somit auch auf gesunde Körperzellen einwirken. Lediglich die schnellere Teilungsrate der Krebszellen macht diese sensitiver für Zytostatika wie Cisplatin oder 5-Floururacil.

Pembrolizumab und Nivolumab sind Mitglieder der Immuncheckpoint-Inhibitoren und ebenfalls von der EMA zur Behandlung von HNSCC zugelassen.

1.5 Molekulare Grundlagen von Kopf-Hals-Karzinomen

Die Überlebenschancen und die individuelle Prognose eines Patienten wurden lange Zeit durch klinische Gegebenheiten definiert (z.B. TNM-Stadium). Allerdings gibt es unter Patienten, die sich klinisch ähneln, deutlich unterschiedliche Verläufe. Verschiedene Biomarker wurden in der Vergangenheit untersucht und ermöglichen eine zunehmend individualisierte Therapie und damit verbundene Prognose.

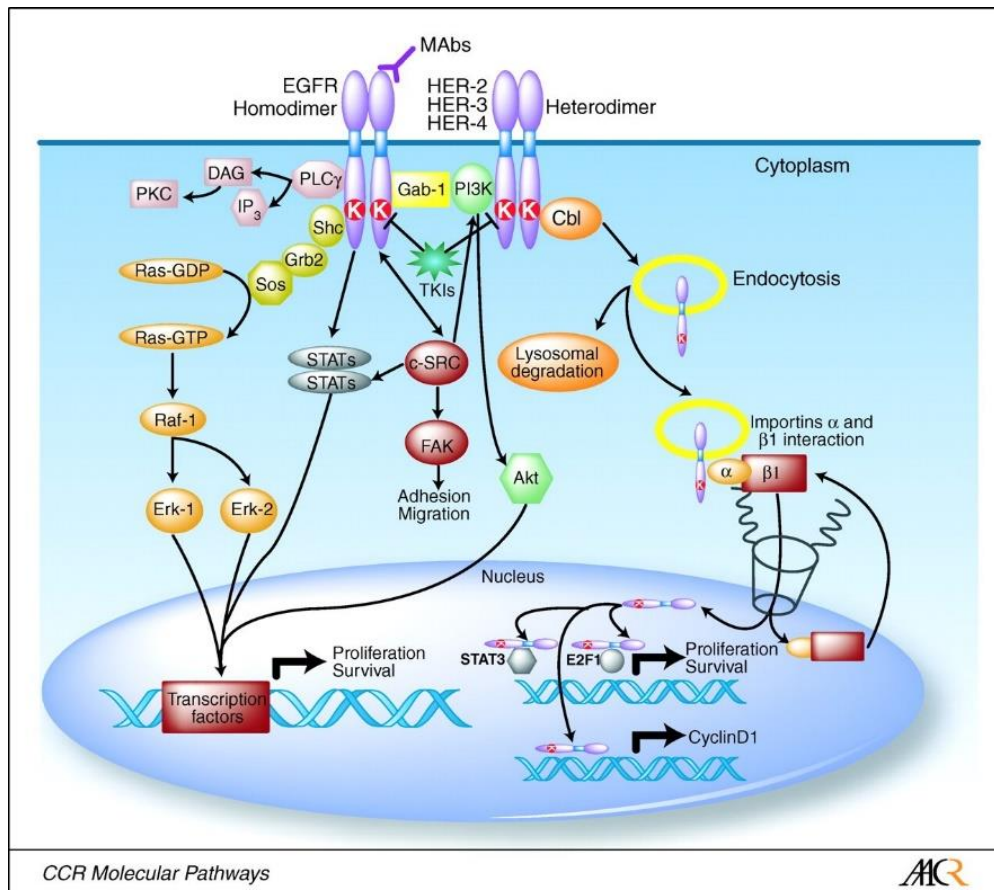


Abbildung 1: Molekulare Signalwege der ErbB-Familie (Quelle: AACR)

Neben dem HPV-Status eines Patienten spielt beispielweise der Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) in der Entstehung und in der Therapie des HNSCC eine bedeutsame Rolle. In bis zu 90% der HNSCC wird der EGFR überexprimiert. Dies geht wiederum mit einer schlechteren Überlebenschance, Therapieresistenzen und folglich einer ungünstigeren Prognose einher.⁴³ Beim EGFR handelt es sich hierbei um einen 170 kDa schweren Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität, der zur Gruppe der ErbB-Familie gehört, die vier verschiedene Rezeptoren beinhaltet: ErbB-1 (EGFR, HER1), ErbB-2 (HER2),

Einleitung

ErbB-3 (HER3) and ErbB-4 (HER4). Mehrere Liganden, wie der Epidermal Growth Factor (EGF), der Transforming Growth Factor TGF- α und Amphiregulin (AREG), können an den EGF binden und die Signalkaskade aktivieren.⁴⁴ Bei Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGFR kommt es zur Homodimerisierung beziehungsweise zur Heterodimerisierung mit anderen ErbB-Rezeptoren, wodurch die Phosphorylierung der Tyrosinkinasedomänen veranlasst wird (Abbildung 1). Schließlich dienen die phosphorylierten Tyrosinreste als Andockstellen für weitere Moleküle, welche den jeweiligen Signalweg initiieren. Im Folgenden gibt es drei verschiedene Signalwege, die aktiviert werden können. Biochemische Signalkaskaden, die durch die Ligandenbindung aktiviert werden, sind der Phospholipase-C-Weg, der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -Signalweg und der MAP-Kinase-Kaskaden-Weg. Dadurch werden das Tumorwachstum, die Zellproliferation und das Metastasierungsverhalten reguliert. Alterierte Aktivitäten des Rezeptors spielen hierbei eine wesentliche Rolle in der Onkogenese bei einer Vielzahl von Tumoren.

In der letzten Dekade konzentrierte sich die Forschung vor allem auf die „gezielte Tumorthherapie“, deren Vorteil darin besteht, dass gesunde Körperzellen weniger stark mit angegriffen werden. Diese Gruppe von Medikamenten zielt spezifisch auf die Rezeptoren, deren Signaltransduktion, die Zellzyklusphasen oder die Angiogenese ab.

Es wird zwischen zwei unterschiedlich pharmakologisch wirkenden Medikamenten unterschieden. Zum einen werden Tyrosinkinase-Inhibitoren, sogenannte TKIs, zum anderen monoklonale Antikörper, sogenannte mAbs, eingesetzt.

Tyrosinkinase-Inhibitoren wie zum Beispiel das bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen verwendete Medikament Erlotinib hingegen konkurrieren intrazellulär um die ATP-Bindungsstellen und blockieren dadurch die Phosphorylierung des Rezeptors und verhindern somit die weitere Signalkaskade.⁴⁵ Der mAb Cetuximab greift an der extrazellulären NH₂-Domäne des EGFR an und blockiert somit die Anbindung des Liganden sowie die Dimerisierung des Rezeptors. Cetuximab bindet mit einer höheren Affinität an den Rezeptor als die natürlichen Liganden.⁴⁴ Derzeit ist Cetuximab das einzige Medikament, welches in der Therapie von HNSCC eingesetzt wird und gegen den EGFR gerichtet ist. In einer großangelegten Studie von Vermorken et al. wurden 442 Patienten mit unbehandeltem rekurrentem oder metastasierendem HNSCC untersucht. 220 dieser Patienten wurden

Einleitung

entweder mit Cisplatin oder Carboplatin mit jeweils Fluoruracil behandelt, während 222 Patienten mit derselben Chemotherapie plus Cetuximab therapiert wurden. Das Ergebnis brachte hervor, dass die Kombinationstherapie mit Cetuximab die mittlere Gesamtüberlebensrate von 7,4 Monaten auf 10,1 Monate sowie das mittlere progressionsfreie Überleben von 3,3 auf 5,6 Monate erhöhte.⁴⁶

Nichtsdestotrotz ist der Erfolg auf die gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Medikamente nicht besonders hoch, da HNSCC gegen diese gezielt wirkenden Medikamente Resistenzen entwickeln können.⁴⁷

Ein verantwortlicher Mechanismus ist die Aktivierung alternativer Rezeptoren und deren Signalwege. Dazu gehört die Aktivierung von anderen Rezeptoren aus der EGFR-Gruppe, nämlich HER-2, HER-3, HER-4, aber auch dem Met-Rezeptor.

1.5.1 Mesenchymal epithelial transition-Rezeptor (Met-Rezeptor)

Der „mesenchymal epithelial transition“-Rezeptor (Met-Rezeptor), der auch „hepatocyte growth factor-receptor“ (HGFR) genannt wird, ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen 50kDa und 145kDa schweren Ketten besteht. Bei der Bindung des Liganden HGF an den Rezeptor kommt es zur Dimerisierung von zwei Met-Rezeptormolekülen. Das führt wiederum zur Phosphorylierung an mehreren Stellen (Y1230, Y1234 und Y1235), wodurch es in der Folge zusätzlich noch zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten am Carboxy-Ende (Y1349 und Y1356) kommt. Die Phosphorylierung dient als Andockstation für Adapterproteine wie zum Beispiel das GRB2-assoziierte Bindepotein GAB1. GAB1 bindet über das „Growth factor receptor bound protein 2“ (GRB2) an den Met-Rezeptor. Die Effektorproteine Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Phospholipase Cy (PLCy) und der „transcription factor signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) binden wiederum an GAB1. Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg wird aktiviert, indem „Src homology-2-containing“ (SHC) an die Tyrosinreste am Carboxy-Ende (Y1349 und Y1356) bindet, an was wiederum GRB2 bindet und den „son of sevenless“ (SOS) aktiviert, der die Dissoziation von GDP stimuliert, sodass GTP binden kann. Damit ist das Ras-Protein aktiv. Das wiederum führt zur Aktivierung von Raf, wodurch die Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) Erk1 und Erk2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 beziehungsweise 2) aktiviert werden.

Einleitung

Ein weiterer Hauptsignalweg des Met-Rezeptors ist die Aktivierung der PI3-Kinase, welche entweder direkt über eine Untereinheit an den aktivierten Met-Rezeptor binden kann oder über das GAB1. Bei der Bindung über GAB1 wird die Proteinkinase B, auch Akt genannt, aktiviert. STAT3 kann selbst an den aktiven Met-Rezeptor binden, wodurch es zur Phosphorylierung von STAT3 kommt und folglich zur Dimerisierung und der Versetzung in den Nukleus.⁴⁸

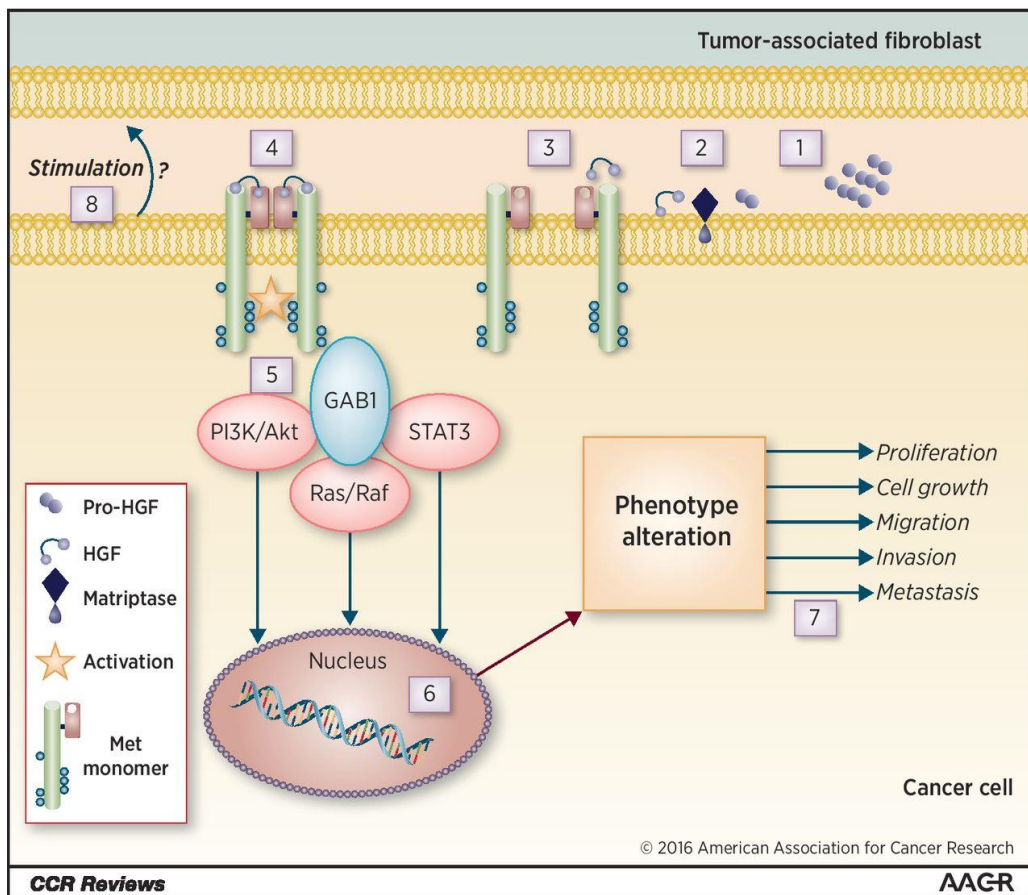


Abbildung 2: Molekularer Signalweg des Met-Rezeptors (Quelle: AACR)

Letzten Endes führen die Signalwege zur Invasion, Migration, Zellwachstum, Proliferation und Metastasierung (Abbildung 2).^{49, 50}

Eine gesteigerte Aktivität des Met-Rezeptor-Signalwegs hat ihren Ursprung in einer Vielzahl von Prozessen. Hierfür können Mutationen des Proto-Onkogens MET, eine Vermehrung des Met-Gens (= Met-Rezeptor-Amplifikation) und auch eine Überexpression des Rezeptors beziehungsweise des Liganden (HGF) verantwortlich sein. Eine Überexpression des Met-Rezeptor-Proteins ist die am häufigsten anzutreffende Alteration bei

Einleitung

Abweichungen im Zusammenhang mit dem Met-Rezeptor-Signalweg, wohingegen Amplifikationen bei HNSCC äußerst selten sind.⁵¹

In mehr als 80% der HNSCC-Fälle ist eine Überexpression des Met-Rezeptors zu sehen, während der Ligand Hepatocyte growth factor in ungefähr 45% der Fälle überexprimiert wird.⁵² In derselben Studie wurde herausgefunden, dass in ca. 66% der HNSCC der aktivierte Rezeptor, der p-Met-Rezeptor, im Vergleich zur normalen Mukosa überexprimiert wird. Eine weitere Ursache von verstärkten und veränderten Met-Rezeptor-Signalen sind Mutationen im Met-Gen, die anfangs beim papillären Nierenkarzinom, später dann auch beim HNSCC gefunden wurden. Hierbei spielt vor allem die Mutation in der genomischen Sequenz der Kinase-Domäne eine bedeutsame Rolle. Di Renzo et al. fanden heraus, dass zwei somatische Mutationen von großer Bedeutung sind: die Y1230C- und die Y1235D-Mutation. Diese Mutationen aktivieren die Kinase, aufgrund ihrer besonderen Lage in der katalytischen Domäne (Aktivierungsschlinge), dauerhaft. Bei der Y1235D-Mutation wird durch den Austausch von Tyrosin durch Asparaginsäure, welche eine negative Ladung besitzt, eine ähnliche Situation wie bei einem phosphorylierten Tyrosin-Rest vorgetäuscht, woraus eine ununterbrochene Aktivierung resultiert. Die Y1235D-Mutation kommt hierbei vor allem in Metastasen vor und nicht im Primärtumor, sodass diese genetischen Veränderungen zur Metastasierung beitragen und dafür unter anderem verantwortlich sind.⁵³ Aebbersold et al. fanden in einer Untersuchung heraus, dass 10,9% der oropharyngealen Karzinome die Y1235D-Mutation aufweisen, wodurch die lokale Tumorkontrolle deutlich erschwert ist.⁵⁴ Mit Ausnahme der Studie von Aebbersold sind solche genetischen Mutationen allerdings sehr selten anzutreffen, wie Lacroix et al. aufzeigten.⁵⁵

Lui et al. fanden heraus, dass ein Drittel aller HNSCC-Mutationen im Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg zeigen. Eine Besonderheit ist dabei, dass HNSCC mit einer PI3K-Signalwegmutation etwa zweimal so viele genetische Mutationen aufweisen wie HNSCC ohne die PI3K-Mutation, was für eine viel größere genetische Instabilität spricht.

Therapeutisch unterscheidet man im Wesentlichen zwischen verschiedenen Arten, den Met-Rezeptor-Signalweg gezielt zu unterbrechen. Zum einen sind es monoklonale Antikörper, die entweder am Liganden HGF, zum Beispiel Ficlaturumab, Rilotumumab,

Einleitung

beziehungsweise direkt am Met-Rezeptor, wie Onartuzumab, angreifen. Des Weiteren zählen der HGF-Antagonist NK4 sowie Tyrosinkinase-Inhibitoren zu den Möglichkeiten, den Signalweg zu unterbrechen (zum Beispiel: Foretinib, Crizotinib, Tivantinib).⁵⁶ Foretinib ist ein oraler Multikinase-Inhibitor, der bei verschiedenen Rezeptoren in die Tyrosinkinase-Domäne eingreift. Hierbei handelt es sich um einen ATP-kompetitiven Inhibitor, der in die ATP-Bindungsstelle bindet.⁵⁷

1.5.2 Glukosestoffwechsel und Tumormikromilieu

Tumoren haben einen erhöhten Bedarf an Energie, um die zahlreichen Prozesse der Proliferation und Metastasierung unterhalten zu können. Otto Warburg beschrieb im Jahr 1924 erstmals das Phänomen des veränderten Glukose-Metabolismus in Tumoren. Für die Energieproduktion benötigen die Zellen eine große Menge an Kohlenhydraten, wie zum Beispiel Glukose. Diese Eigenschaft macht man sich auch in der Diagnostik, zum Beispiel beim PET/CT, zunutze. Zellen können Glukose über zwei verschiedene Transporter aufnehmen: zum einen über die SGLT-Transporter, Natrium/Glukose-Cotransporter und zum anderen über die Glukose-Transporter (GLUT). Warburg erkannte, dass Tumorzellen selbst in Anwesenheit von Sauerstoff Glukose über die anaerobe Glykolyse verstoffwechseln und ihre Energie nicht über die oxidative Phosphorylierung erzeugen.⁵⁸ Um dem erhöhten Bedarf an Glukose nachkommen und die gesteigerte Glykolyse betreiben zu können, besitzen Tumorzellen vermehrt Glukose-Transporter.⁵⁹ Im Gegensatz dazu findet sich in der gesunden Mukosa keine erhöhte Expression der GLUT-Transporter.⁶⁰ Verschiedene Autoren haben hierbei herausgefunden, dass die erhöhte Menge an GLUT mit einer negativeren Prognose in verschiedensten Tumoren einhergeht, so zum Beispiel bei Tumoren im Kopf- und Halsbereich^{61, 62} sowie auch bei Brustkrebs⁶³ und Lungenkrebs⁶⁴. Daneben konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Malignität des Tumors die Menge an GLUT1 gleichermaßen zunimmt.⁶⁵ Interessant ist der Zusammenhang zwischen dem Met-Rezeptor und dem Glukose-Metabolismus, den einige Forschungsgruppen bei anderen Tumoren bereits untersucht haben. In einer experimentellen Studie von De Rosa und Mitarbeitern aus dem Jahr 2015 wurde unter anderem der Einfluss des Met-Rezeptors auf den Glukose-Metabolismus beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom betrachtet. Hier ergab sich, dass es bei einer Inhibition des Met-Rezeptor-Signalwegs zu einer Reduktion der Hexokinase 2 und der Pyruvatkinase M2 kommt.⁶⁶ Perdomo et al. konnten 2008 zeigen, dass durch die HGF-Stimulation von Myozyten deren Glukose-Metabolismus gesteigert wird. Zusätzlich konnte dargestellt werden, dass sowohl die Expression des GLUT1 zunimmt und es auch zu einer vermehrten Lokalisation des GLUT1 in der Zellmembran kommt.⁶⁷

Zielsetzung

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Met-Rezeptor-Signalwegs auf den Glukose-Metabolismus in etablierten Zelllinien von Kopf-Hals-Karzinomen zu untersuchen.

Konkret sollen folgende Aspekte bearbeitet werden:

- 1) Nachweis des Met-Rezeptors auf den fünf Zelllinien
- 2) Messung der endogenen HGF-Produktion der Tumorzelllinien
- 3) Behandlung der Zelllinien mit HGF und dem Tyrosinkinase-Inhibitor Foretinib
- 4) Quantifizierung der Effekte auf acht ausgewählte Gene, die im Zusammenhang mit dem Glukose-Metabolismus stehen nach Stimulation und Hemmung des HGF/Met-Signalwegs
- 5) Bestimmung der Häufigkeit vom GLUT1 in der Zellmembran der Zelllinien bei Stimulation beziehungsweise Inhibition des Met-Rezeptors.

Material und Methoden

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zelllinien

Es wurden die folgenden fünf Zelllinien für die Erstellung der Arbeit verwendet:

Tabelle 1: HNSCC-Zelllinien. Lokalisation und Art der vier HNSCC-Zelllinien sowie der Epidermoidkarzinom-Zelllinie A253, die in der Forschungsarbeit verwendet wurden.

ATCC Nr.	Name	Lokalisation	Art des Tumors
HTB-43	FaDu	Pharynx	SCC
CCL-138	Detroit 562	Pharynx	SCC
CRL-1628	SCC25	Zunge	SCC
CRL-1629	SCC9	Zunge	SCC
HTB-41	A253	Submandibuläre Speicheldrüse	Epidermoid-Karzinom

3.1.2 Kulturmedien und Zusätze

Tabelle 2: Auflistung der benötigten Kulturmedien

Kulturmedium	Kat. Nr.	Hersteller	Herkunft
MEM Alpha Medium (1x)	22561-021	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutsch- land
McCoy's 5A Medium (1x)	26600-023	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutsch- land
DMEM/F12 (1:1) (1x)	31330-038	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutsch- land

Material und Methoden

Tabelle 3: Auflistung der benötigten Medienzusätze

Artikel	Kat. Nr.	Hersteller	Herkunft
Fetal Bovine Serum	10270-106	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	15140	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	14040	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution (0,5%/0,2%)	L 2153	Biochrom KG	Berlin, Deutschland
Hydrocortison	H4001	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, Deutschland

3.1.3 Antikörper

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
Anti human HGFR/Met-Rezeptor PE conjugated	FAB3582P	R&D Systems	Ubstadt-Weiher, Deutschland
Mouse IgG1 PE conjugated	130-092-212	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
PE Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption)	550589	Beckton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Anti-Glukose Transporter GLUT1 antibody	ab40084	Abcam	Cambridge, Groß- britannien

Material und Methoden

3.1.4 Kits

Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten gebrauchsfertigen Kits

Kit	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
Human HGF ELISA Kit	ab100534	Abcam	Cambridge, Großbritan- nien
RNeasy Mini Kit	74106	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Quanti Tect Reverse Transcription	205313	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Quanti Tect SYBR Green PCR Kit	204145	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Cytofix/Cytoperm™ Fixa- tion/Permeabilization Kit	554714	Beckton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland

3.1.5 Medikamente, Wachstumsfaktoren, Primer

Tabelle 6: Liste der verwendeten Medikamente

Medikament	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
Foretinib GSK1363089	S1111	Selleck Chemicals	München, Deutschland

Tabelle 7: Verwendeter Wachstumsfaktor HGF

Wachstumsfaktor	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
HGF Recombinant Hu- man Protein	PHG0254	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Tabelle 8: Auflistung der eingesetzten Primer

Primer	Katalognummer	Hersteller	Herkunft
PKM	QT00028875	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
HK1	QT00045514	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
HK2	QT00013209	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
SLC2A1	QT00068957	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
SLC16A1	QT00012838	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
SLC16A4	QT00044044	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
PDK2	QT00038262	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
ACTB2	QT01680476	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland

3.1.6 Chemikalien, Lösungen

Tabelle 9: Liste der verwendeten Chemikalien

Produkt	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
HCL 37%	100317	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	C.I. 42555	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Methanol	32213	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, Deutschland

Tabelle 10: Kristallviolettlösung

Kristallviolettlösung:	0,5 g Kristallviolett 100 ml Methanol 400 ml VE-H ₂ O
------------------------	--

3.1.7 Geräte

Tabelle 11: Auflistung der eingesetzten Geräte

Gerät	Name	Hersteller	Herkunft
Brutschrank	HERAcell 150i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Sterilbank	SFE 2020	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	5415R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Zellzähler	Casy Cell Counter + Analyser System Model TT	OMNI Life Science GmbH & Co.	Bremen, Deutschland
Mikroskop	Olympus CK 40	Olympus Optical Co. GmbH	Gerstetten, Deutschland
Photometer	Infinite® F50 / Ro- botic ELISA plate reader	Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
Wippschüttler	Rocking Platform	VWR International GmbH	Bruchsal, Deutschland
Wippschüttler	Mini Rocker MR-1	BioSan	Riga, Lett- land
Durchflusszytometer	BD FACS Calibur	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Absauganlage	HLC by Ditabis	Ditabis Digital Biomed- ical Imaging System AG	Pforzheim, Deutschland
Thermomixer	ThermoShaker TS- 100	BioSan	Riga, Lett- land
PCR Maschine	PCR Maschine CFX Connect Real-Time System	BIO-RAD Laboratories GmbH	München, Deutschland
Spectrophotometer	Nano Drop 2000c	PeQLab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Wasserbad	Julabo EC-5 Bad Umwälzthermostat	Julabo GmbH	Seelbach, Deutschland

Material und Methoden

Pipettierhilfe	Accu- Jet Pro	Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
Umwälzthermostat	MB-5	Julabo GmbH	Seelbach, Deutschland

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Produktionsnummer, Hersteller und Herkunft

Artikel	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
8-Kanalpipette 100µl 10-100 µl	Reference 2 4926000034	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
1-Kanalpipette 1000µl 100-1000 µl	Research plus 3123000063	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
1-Kanalpipette 100µl 10-100 µl	Research plus 3123000047	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
1-Kanalpipette 10µl 0,5-10 µl	Research plus 3123000020	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette	PS10 607180	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Serologische Pipette	PS25 760180	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	747720	Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
Nunc™ MicroWell™ 96-Well Mikrotiterplatten	167008	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Nunc™ Zellkultur-multi-schalen 6-Well-Platten	140 675	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

96-Well-Platten PCR		BIO-RAD Laborato- ries GmbH	München, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml	72.695.500	SARSTEDT AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße 2 ml	72.706	SARSTEDT AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Zellzählgefäße Casy Cups 22x65mm	05651794	OMNI Life Science GmbH & Co.	Bremen, Deutsch- land
Zellzählflüssigkeit Casy Ton	05651808	OMNI Life Science GmbH & Co.	Bremen, Deutsch- land
Reinigungsflüssigkeit Casy Clean	05651786	OMNI Life Science GmbH & Co.	Bremen, Deutsch- land
Pipettenspitzen 1000 µl	F161670 D1000	Gilson®	Limburg-Offheim, Deutschland
Pipettenspitzen 20-300 µl epT.I.P.S.	0030 000.897	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	F161630 D10	Gilson®	Limburg-Offheim, Deutschland
FACS Röhrchen 5ml Tubes 75x12mm, PS	55.1579	SARSTEDT AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Falcons Cellstar® Tubes	227261	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Petrischalen Nunc™ Zell- kultur Petrischalen	150288	Thermo Fisher Sci- entific Life Technol- ogies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen Nunc™ EasYFlask™ 75cm ²	156499	Thermo Fisher Sci- entific Life Technol- ogies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Zellschaber Cell Scraper	90020	SPL Life sciences	Wien, Österreich

Material und Methoden

3.1.9 Computerprogramme zur Analyse und Bearbeitung

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Computerprogramme

Programm	Hersteller	Firmensitz
Magellan F50	TECAN	Männedorf, Schweiz
CellQuest Pro	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
End Note	Thomson Reuters GmbH	Frankfurt, Deutschland
Microsoft Word	Microsoft	Redmond, USA
Microsoft Excel	Microsoft	Redmond, USA
PRISM	GraphPad Software	La Jolla, USA
FlowJo	FlowJo LLC	Ashland, USA

Material und Methoden

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle an den Zellkulturen vorgenommenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien wurden als Monolayer in Kulturflaschen gehalten. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank mit einem Kohlendioxidgehalt von 5%, einer Temperatur von 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Um eine optimale Zelldichte zu erhalten, wurden alle Zelllinien zweimal pro Woche gesplittet (siehe Tabelle 14). Nach Absaugen des Mediums mit einer Glaspipette wurden die adhärennten Zellen mit 10 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Danach wurden jeweils 3 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und diese für 15 Minuten im Brutschrank HERAcCell 150i inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen im jeweiligen Medium resuspendiert und in einem von der Zelllinie abhängigen Verhältnis in die jeweiligen Kulturflaschen zurückgegeben. Abschließend wurden 25 ml des entsprechenden Mediums hinzugegeben. Das Teilungsverhältnis der jeweiligen Zelllinie sowie die Zusammensetzung der zellspezifischen Medien sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Zelllinien, Splittungsverhältnis, Medien und Mediumszusätze

Zelllinie	Verhältnis	Medium	Zusatz zum Medium
FaDu	1:5	MEM Alpha Medium (1x)	10% FCS, 1% P/S
Detroit 562	1:3	MEM Alpha Medium (1x)	10% FCS, 1% P/S
A253	1:10	McCoy's 5A Medium (1x)	10% FCS, 1% P/S
SCC9	1:2,5	DMEM/F12 (1:1) (1x)	10% FCS, 1% P/S, 5µl Hydrocortison, 15 mM HEPES
SCC25	1:2	DMEM/F12 (1:1) (1x)	10% FCS, 1% P/S, 5µl Hydrocortison, 15 mM HEPES

Die Zellzählung erfolgte mit dem Zellzähler Casy Counter der Fa. OMNI Life Science. Hierbei wurden in 10 ml sterilfiltriertes H₂O jeweils 10 µl der Zellsuspension gegeben.

3.2.2 FACS zum Nachweis des Met-Rezeptors auf den Tumorzelllinien

Um den Met-Rezeptor auf den fünf Zelllinien nachzuweisen, wurden diese im Fluoreszenz-activated Cell Sorting (FACS) untersucht, wobei jeweils 1.000.000 Zellen für zwei Minuten mit 13.200 rpm zentrifugiert wurden. Danach wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und auf zwei separate Eppendorfgefäße zu gleichen Teilen verteilt, um erneut bei 13.200 rpm abzentrifugiert zu werden. Abschließend wurden die Zellen in 400 µl PBS resuspendiert und bei 4 °C für 30 Minuten mit folgenden Antikörpern inkubiert:

1. Anti human HGF/Met-Rezeptor PE conjugated
2. Mouse IgG1 PE conjugated.

Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut bei voller Geschwindigkeit für zwei Minuten zentrifugiert und in 1 ml PBS gewaschen. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, um darauf die Zellen schließlich in 400 µl PBS aufzunehmen und in FACS-Röhrchen zu überführen. Die FACS-Analyse wurde mit dem Gerät FACS Calibur der Fa. BD Bioscience durchgeführt, die dazugehörige Software war CellQuest Pro von der Fa. BD Bioscience.

3.2.3 ELISA zum Nachweis von endogenem HGF

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde nach dem Protokoll des Human HGF ELISA Kit ab100534 durchgeführt, weshalb alle fünf Zelllinien auf einer 96-Well-Platte kultiviert wurden. Dabei wurden für jede Zelllinie zwei Spalten verwendet und pro Well 10.000 Zellen ausgesät. Nach drei verschiedenen Zeitpunkten von 24, 48 und 72 Stunden wurde der Überstand des Mediums abgenommen. Die fotometrische Messung der Platte wurde mit dem Gerät Infinite F50 von der Fa. TECAN durchgeführt, mit einer Schütteldauer von fünf Sekunden und bei einer Messwellenlänge von 450 nm. Die Auswertung am PC erfolgte mit dem Programm Magellan F50 von der Fa. TECAN.

3.2.4 Zellviabilitätsassay

Die fünf Zelllinien wurden mit jeweils zwei verschiedenen Wirkstoffen behandelt, um deren Auswirkungen auf die relative Zellzahl darzustellen. In diesem Kapitel werden die verschiedenen Zellviabilitätsassays mit den verwendeten Wirkstoffen und Durchführungen erklärt.

3.2.4.1 Monotherapie HGF

Zunächst wurden die Zellen mit dem Wachstumsfaktor HGF stimuliert, hierbei erfolgte die Zellzählung mit dem Zellzähler Schärfe System CASY Modell TT. Es wurden von jeder Zelllinie 4.000 Zellen/Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät und die äußersten Reihen dabei freigelassen. Tabelle 15 zeigt den Belegungsplan der 96-Well-Platte. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurde zunächst das Medium steril abgesaugt. Danach wurden die Spalten drei bis zehn mit 100 µl des zellspezifischen Mediums aufgefüllt. Die elfte Spalte wurde mit 100 µl HCl gefüllt und in die zweite Spalte wurden pro Well 200 µl einer 100 ng/ml konzentrierten HGF-Lösung gegeben. Es wurde mit einer acht-kanaligen Pipette, die auf 100 µl eingestellt ist, die Log₂-Verdünnung bis Spalte neun durchgeführt. Allerdings wurden nur drei Reihen der 96-Well-Platte verwendet. Daraufhin wurden die Zellen für 72 Stunden im Brutschrank bei einem Kohlendioxidgehalt von 5%, einer Temperatur von 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert. Nach einer Dauer von 72 Stunden wurde der Überstand von Medium abgeschüttet und die Zellen wurden pro Well mit 100 µl einer 0,1%-Kristallviolettlösung für 15 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit H₂O gewaschen und die 96-Well-Platten im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet. 24 Stunden später wurden 100 µl Methanol pro Well hinzugegeben und die fotometrische Messung mit dem Gerät Infinite F50 von der Fa. TECAN bei einer Wellenlänge von 595 nm vorgenommen. Die Versuchsanzahl betrug n=6. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Magellan F50 von der Fa. TECAN.

Material und Methoden

Tabelle 15: Well-Belegungsplan (Stimulation mit HGF)

Darstellung des Well-Belegungsplans für die Monotherapie mit HGF. In jedem Well der Versuchsplatte befinden sich 100 µl Flüssigkeit. Die Startkonzentration von HGF beträgt 100 ng/ml, welche dann im Log2 verdünnt wurde.

	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	12,5 ng/ml	6,25 ng/ml	3,12 ng/ml	1,56 ng/ml	0,78 ng/ml	100 µl Medium	100 µl HCl	
	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	12,5 ng/ml	6,25 ng/ml	3,12 ng/ml	1,56 ng/ml	0,78 ng/ml	100 µl Medium	100 µl HCl	
	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	12,5 ng/ml	6,25 ng/ml	3,12 ng/ml	1,56 ng/ml	0,78 ng/ml	100 µl Medium	100 µl HCl	

3.2.4.2 Monotherapie Foretinib

Neben der Stimulation mit HGF wurden die fünf Zelllinien ebenso mit dem Met-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Foretinib behandelt. Der Versuchsablauf erfolgte analog zu der Monotherapie mit HGF. Die Versuchsanzahl betrug n=3. Es wurden von jeder Zelllinie 10.000 Zellen/Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank gelagert. 24 Stunden später wurde der Überstand an Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und danach die Spalten drei bis zehn mit 100 µl Medium aufgefüllt, während die elfte Spalte mit 100 µl HCl gefüllt wurde. In die erste Spalte wurden pro Well 200 µl einer 100 µM Foretinib-Lösung gegeben. Darauf wurde die Log2-Verdünnung bis Spalte neun mit einer acht-kanaligen Pipette, auf 100 µl eingestellt, durchgeführt, sodass Spalte zehn und elf jeweils 100 µl reines Medium beziehungsweise 100 µl HCl enthielten. Die Messung und Auswertung erfolgte entsprechend der Monotherapie mit HGF. Tabelle 16 zeigt den Wellbelegungsplan für die Monotherapie mit Foretinib.

Material und Methoden

Tabelle 16: Well-Belegungsplan (Monotherapie Foretinib)

Darstellung des Well-Belegungsplans für die Monotherapie mit Foretinib. In jedem Well der Versuchsplatte befinden sich 100 µl Flüssigkeit. Die Startkonzentration von Foretinib beträgt 100 µM und wurde dann im Log2 verdünnt.

	100 µM	50 µM	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	3,13 µM	1,56 µM	0,78 µM	100 µl Medium	100µl HCl	
	100 µM	50 µM	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	3,13 µM	1,56 µM	0,78 µM	100 µl Medium	100µl HCl	
	100 µM	50 µM	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	3,13 µM	1,56 µM	0,78 µM	100 µl Medium	100µl HCl	
	100 µM	50 µM	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	3,13 µM	1,56 µM	0,78 µM	100 µl Medium	100µl HCl	
	100 µM	50 µM	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	3,13 µM	1,56 µM	0,78 µM	100 µl Medium	100µl HCl	
	100 µM	50 µM	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	3,13 µM	1,56 µM	0,78 µM	100 µl Medium	100µl HCl	
	100 µM	50 µM	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	3,13 µM	1,56 µM	0,78 µM	100 µl Medium	100µl HCl	

3.2.4.3 Simultane Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib

In diesem Assay wurden die Zelllinien mit HGF stimuliert und gleichzeitig mit Foretinib inhibiert, wobei von jeder Zelllinie 4.000 Zellen/Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät wurden. Die äußeren Reihen der Versuchsplatte wurden dabei wieder leer gelassen und das Medium nach 24 Stunden abgesaugt. In die erste benutzte Spalte der Well-Platte wurden 100 µl normales Medium gegeben, in die zweite Spalte 100 µl einer 25 ng/ml konzentrierten HGF-Lösung. In die Spalten drei und vier wurden die aus der Monotherapie mit Foretinib ermittelten IC50-Werte pipettiert. In die dritte verwendete Spalte wurden 100 µl einer in der jeweiligen zellspezifischen IC-50 konzentrierten Foretinib-Lösung pipettiert und in Spalte vier 50 µl einer 50 ng/ml konzentrierten HGF-Lösung gegeben sowie 50 µl der doppelt-konzentrierten zellspezifischen IC50-Foretinib-Lösung. In die elfte Spalte der 96-Well-Platte wurden 100 µl HCl pipettiert. In jedem benutzten Well der 96-Well-Platte befanden sich 100 µl. Die Versuchszahl betrug n=4 und es wurden pro 96-Well-Platte jeweils drei Reihen verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden wurde der Überstand von Medium abgeschüttet und die Zellen pro Well mit 100 µl

Material und Methoden

dargestellt. Nach einer Zeitspanne von 24 beziehungsweise 48 Stunden wurde die mRNA aus den Zellen mit Hilfe des RNeasy Mini Kit isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA am Computer mit dem Programm Nano Drop 2000 und dem Gerät Nano Drop 2000c gemessen, um die cDNA aus der mRNA zu synthetisieren. Der Vorgang erfolgte mit dem Quanti Tect Reverse Transcription Kit nach den Angaben des Herstellers. Als Standard- beziehungsweise Haushaltsgen wurde Beta-actin 2 verwendet, ein Gen, welches für Proteine, die Bestandteile des Zytoskeletts sind, kodiert. Das Beta-actin 2 Gen wird unabhängig von der Behandlung der Zellen weder hoch- noch herunterreguliert und dient deswegen als Referenz.

Der cycle threshold (ct)-Wert definiert bei der Echtzeit PCR die Anzahl der Replikationszyklen, die benötigt werden, damit die jeweilige vervielfältigte DNA eines Gens und somit das korrespondierende Fluoreszenzsignal über einen bestimmten Schwellenwert steigt. Hierbei ist das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der jeweiligen DNA. Der Delta-ct-Wert ($= ct(\text{Standardgen}) - ct(\text{Zielgen})$) beschreibt, wie viele Zyklen später beziehungsweise früher der jeweilige gesuchte DNA-Abschnitt den Schwellenwert im Vergleich zum Standardgen übersteigt. Der berechnete Delta-delta-ct-Wert ($= ct(\text{Zielgen behandelte Zellen}) - ct(\text{Zielgen Kontrollgruppe})$) beschreibt, wie viele Zyklen später beziehungsweise früher das Gen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle den Schwellenwert übersteigt. Daraus lässt sich wiederum die Fold induction berechnen, welche die relative Veränderung der Genexpression beschreibt.

Die PCR wurde mit Hilfe des Quanti Tect SYBR Green PCR Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Farbstoff diente SYBR Green. Die Versuchszahl betrug $n=6$.

Der PCR Ansatz wurde in einem Volumen von 25 μl mit 11 ng cDNA pro Probe durchgeführt. Das Pipettierschema bestand aus 12,5 μl SYBR Green, 11 μl der 1 ng/ μl konzentrierten cDNA-Stocklösung sowie 1,5 μl des jeweiligen Primers. Es wurden die in Kapitel 3.1.5 in Tabelle 8 aufgelisteten Primer verwendet. Gemessen wurde mit dem Gerät CFX Connect Real-Time System und die Auswertung erfolgte mit dem Programm Bio-Rad CFX Manager. Das Programm bestand aus den folgenden vier Phasen:

Material und Methoden

Tabelle 18: PCR-Schema

Phase	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4
Temperatur	95 °C	94 °C	54 °C	72 °C
Dauer	15:00 Min.	15 Sek.	30 Sek.	30 Sek.
Phase 2 – 4 wurde insgesamt 40-mal wiederholt				

Tabelle 19: Auflistung der Primer und Proteine, für welche die verschiedenen Gene codieren, sowie deren Aufgabe

Primer	Protein	Aufgabe
PKM	Pyruvat Kinase	Oxidative Decarboxylierung von Pyruvat
HK1	Hexokinase 1	Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat; ubiquitäre Form
HK2	Hexokinase 2	Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat; prädominante Form in der Skelettmuskulatur
SLC2A1	Solute carrier family 2 member 1 / GLUT1	Glukose-Transporter 1
SLC16A1	Solute carrier family 16 member 1 / MCT 1	Monocarboxylattransporter 1
SLC16A4	Solute carrier family 16 member 4 / MCT 4	Monocarboxylattransporter 4
PDK2	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 2	Phosphorylierung der Pyruvat Dehydrogenase
ACTB	Actin Beta	Codiert für Proteine des Zytoskeletts

3.2.6 FACS zum Nachweis von GLUT1 auf den Tumorzellen

In diesem Versuch wurde die Häufigkeit des GLUT1-Transporters in der Zellmembran der Zelllinien bei Stimulation beziehungsweise Inhibition des Met-Rezeptors untersucht. Der folgende Abschnitt beschreibt den detaillierten Versuchsaufbau und -ablauf.

Es wurden jeweils 1.000.000 Zellen/Well im Six-Well-Format von jeder Zelllinie pro Well ausgesät. Die Behandlung der Zelllinien auf den Six-Well-Platten erfolgte analog Kapitel 3.2.5. Die Antikörperfärbung wurde mit dem Kit BD Cytfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach einer Zeitspanne von 24 beziehungsweise 48 Stunden wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin abgelöst, in 1 ml PBS überführt und anschließend bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde das PBS abgesaugt. Es wurden 250 µl der Fixations- und Permeabilisationslösung hinzugegeben und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,5 ml BD Perm/Wash™ buffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100 µl BD Perm/Wash™ buffer resuspendiert und auf zwei Tubes verteilt, in die jeweils 2 µl des Isotypkontrollantikörpers PE Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption) dazugegeben wurden. Zusätzlich wurden in die Hälfte der Tubes 2 µl des gegen den GLUT1 gerichteten Antikörpers ab 40084 gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen zweimal mit 1 ml BD Perm/Wash™ buffer gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 400 µl PBS aufgenommen und im FACS gemessen, wobei die Auswertung mit dem Programm FlowJo erfolgte. Die Versuchszahl betrug n=3.

Ergebnisse

4 Ergebnisse

4.1 Vorbemerkung

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, den Zusammenhang zwischen dem Signalweg des Met-Rezeptors und dem Glukose-Metabolismus in Tumorzelllinien des Kopf- und Halsbereichs zu untersuchen. Zur Erarbeitung der Ergebnisse wurden fünf etablierte Zelllinien aus dem Kopf- und Halsbereich verwendet.

Die Untersuchungen zu Beginn der Arbeit konzentrieren sich auf die Expressionslevel des Met-Rezeptors und die weitergehende Frage, ob der Ligand Hepatocyte Growth Factor von den Zellen selbstständig sezerniert wird.

Der Fokus der weiteren Experimente konzentriert sich auf die Auswirkungen des HGFs und des Tyrosinkinase-Inhibitors Foretinib auf den Glukosestoffwechsel.

Hierbei wurden nach der Stimulation der Zelllinien mit HGF beziehungsweise der Inhibition mit Foretinib acht Gene im Echtzeit-PCR-Verfahren untersucht und im Fluoreszenz-activated Cell Sorting die Menge an GLUT1 in der Zellmembran erfasst.

Ergebnisse

4.2 FACS zum Nachweis des Met-Rezeptors auf den Tumorzelllinien

Zu Beginn wurden alle Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf die Expression des Met-Rezeptors untersucht. In den nachfolgend gezeigten Histogrammen in Abbildung 3 wird auf der horizontalen Achse die Fluoreszenzintensität, die Intensität der Einzelmessungen, aufgezeigt und auf der vertikalen Achse die Zellenanzahl dargestellt. Der verwendete Met-Antikörper ist dabei fluoreszenzgekoppelt und mit dem Farbstoff Phycoerythrin markiert. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

Die Stärke der Fluoreszenzintensität korreliert hierbei mit der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen, bei denen es sich in diesem Falle um die Met-Rezeptoren handelt. Die roten Histogramme zeigen die Kontrollen auf, die mit dem Isotypkontroll-Antikörper behandelt wurden. Die Isotypkontrolle entspricht einer Negativkontrolle, welche die Hintergrundsignale des Primärantikörpers aufzeigen soll. Die blauen Histogramme zeigen die Menge an Met-Rezeptor-Antigenen. Der Mean-Wert, also der arithmetische Mittelwert, beschreibt hierbei die Menge an Met-Rezeptor, die sich in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität im Durchschnitt auf jeder Zelle befindet. Der Flächeninhalt unter den Histogrammen kommt durch die Summe der einzelnen Fluoreszenzintensitäten mit der dazugehörigen Zahl an Zellen zustande. Wie in Abbildung 3 erkennbar, kommt es zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der Histogramme. Folglich ist bei allen fünf Zelllinien eine starke Expression des Met-Rezeptors nachzuweisen. Die Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse kann der Tabelle 20 entnommen werden.

Tabelle 20: Darstellung der Mean-Werte bei den fünf Zelllinien und der Menge des Met-Rezeptors, die sich im Durchschnitt auf jeder Zelllinie befindet (siehe Abbildung 3).

Zelllinie	FaDu	Detroit 562	A253	SCC9	SCC25
Mean Iso	4,11	4,04	4,78	8,75	3,79
Mean c-Met	60,2	126	107	97,4	30,2

Am meisten Met-Rezeptor befindet sich auf der Zelllinie Detroit 562 bei einem durchschnittlichen Mean-Wert von 126.

Ergebnisse

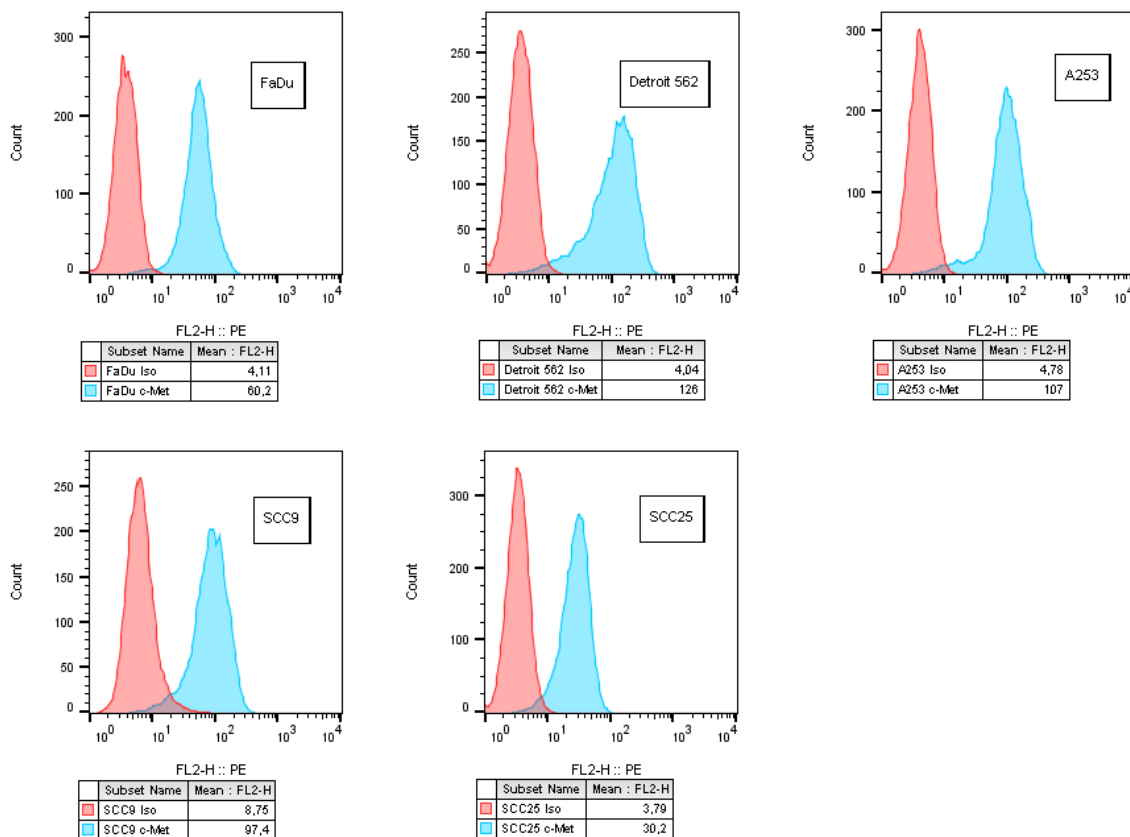


Abbildung 3: Darstellung der Histogramme zum Nachweis des Met-Rezeptors auf den Zelllinien.

Auf der x-Achse wird die Fluoreszenzintensität, auf der y-Achse die Zellzahl dargestellt. Die roten Histogramme zeigen die Hintergrundaktivität des Primärantikörpers. In Blau wird die Menge des Met-Rezeptors auf den Zellen gezeigt. Der Mean-Wert beschreibt die Anzahl der Met-Antigene, die sich in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität auf jeder Zelle befinden. Die Rechtsverschiebung der Histogramme zeigt, dass bei allen Zelllinien der Met-Rezeptor vorhanden ist.

Ergebnisse

4.3 ELISA zum Nachweis von endogenem HGF

Ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay dient unter anderem dem Nachweis von Proteinen und wurde durchgeführt, um zu drei verschiedenen Zeitpunkten, nach 24, 48 sowie 72 Stunden, nachzuweisen, ob die Tumorzellen endogen den Hepatozyten-Wachstumsfaktor HGF produzieren. Die Versuche wurden als Duplikate durchgeführt. Die Ausführung erfolgte nach dem Schema, welches in Kapitel 3.2.3 des Material- und Methodenteils beschrieben wurde. In Tabelle 21 sind die einzelnen Messwerte aufgelistet. Es zeigt sich, dass bei allen fünf Zelllinien annähernd kein HGF nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 21: Konzentration des endogen produzierten HGFs bei den fünf Zelllinien.

In Tabelle 21 wird die Darstellung der Konzentrationen des HGFs im Medium der Zellen zu den Zeitpunkten nach 24, 48 und 72 Stunden gezeigt. Der ELISA wurde mit dem Human HGF ELISA Kit ab100534 durchgeführt. Die Messung erfolgte photometrisch. Als Referenz, um die Konzentration des humanen HGFs zu bestimmen, wurden die Standards gemäß des Protokolls pipettiert. Wie in Tabelle 21 gezeigt ist, kann im Medium der Tumorzellen nahezu kein HGF nachgewiesen werden.

	Fadu	Detroit 562	A253	SCC9	SCC25
24 Stunden	1,2 pg/ml	0,9 pg/ml	0,8 pg/ml	0,6 pg/ml	0,6 pg/ml
48 Stunden	1,4 pg/ml	1,2 pg/ml	0,9 pg/ml	0,6 pg/ml	0,7 pg/ml
72 Stunden	1,0 pg/ml	0,9 pg/ml	1,1 pg/ml	1,1 pg/ml	0,8 pg/ml

4.4 Zellviabilitätsassay

Zellviabilitätsassays dienen dazu, um den relativen Anteil der lebenden Zellen in einer Zellpopulation nach einer Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von HGF und Foretinib auf die fünf Zelllinien untersucht.

In den Assays wurden die Zellen jeweils 72 Stunden mit dem Wachstumsfaktor HGF und dem Met-Inhibitor Foretinib behandelt. Betrachtet man die Versuchsreihe, bei der die Zellen mit HGF stimuliert wurden, betrug die Startkonzentration 100 ng/ml und die Versuchszahl $n=6$. Bei der Durchführung mit dem Inhibitor Foretinib dagegen betrug die Startkonzentration 100 μM und die Versuchszahl $n=3$. Beide Durchführungen erfolgten analog des Kapitels 3.2.4, jedoch wurden bei der Monotherapie mit dem Inhibitor Foretinib sechs Reihen einer 96-Well-Platte verwendet und bei der Stimulation mit HGF lediglich drei.

4.4.1 Zellviabilitätsassay mit HGF zum Nachweis einer proliferierenden Wirkung auf die Tumorzellen

In dem nachfolgenden Versuch wurden die Zelllinien mit humanem HGF stimuliert. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben. Proliferationsfördernde Effekte sind in der Literatur ab einer Konzentration in Höhe von 25 ng/ml beschrieben.⁶⁸ Um die Wirkung auch bei höheren Konzentrationen zu untersuchen, wurden die Zellviabilitätsassays mit einer Startkonzentration von 100 ng/ml durchgeführt und im Log₂ verdünnt. Die in Abbildung 4 gezeigten Diagramme vergleichen hierbei jeweils zwei verschiedene Konzentrationen von HGF mit der nicht stimulierten Kontrolle im statistischen T-Test-Verfahren. Auf der y-Achse ist die Fraktion als relative Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle aufgezeigt. Auf der x-Achse wird die Konzentration des HGFs dargestellt. In allen Diagrammen ist zu sehen, dass die relative Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle bei 6,2 ng/ml human HGF und bei 25 ng/ml human HGF ansteigt. Durch die Stimulation mit humanem HGF kommt es folglich zu einer Zunahme der optischen Dichte im Photometer, allerdings findet diese in unterschiedlich starkem Ausmaß statt, wie Tabelle 22 zu entnehmen ist. Die stärkste Zunahme der optischen Dichte findet sich bei der Zelllinie SCC25 mit 45% bei einer HGF-Konzentration von 25 ng/ml. Die am wenigsten starke

Ergebnisse

Zunahme der optischen Dichte konnte bei der Zelllinie FaDu gemessen werden. Hier beträgt die Zunahme 13% beziehungsweise 14%. Alle Ergebnisse sind statistisch signifikant.

Tabelle 22: Ausmaß der HGF-induzierten Zunahme der Zellen in Prozent bei den fünf Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9, SCC25.

Zelllinie	6,2 ng/ml HGF	25 ng/ml HGF
A253	25%	28%
Detroit 562	24%	25%
FaDu	13%	14%
SCC9	39%	41%
SCC25	39%	45%

Ergebnisse

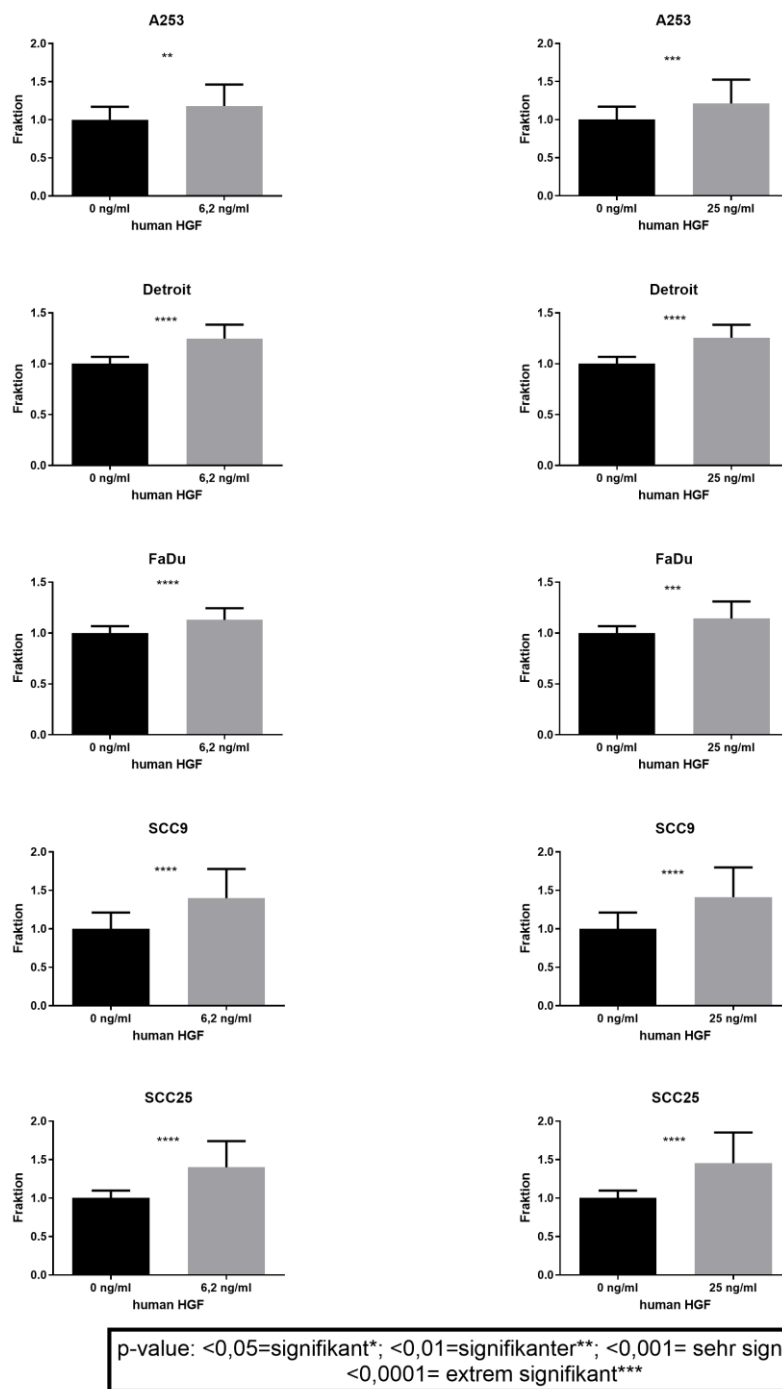


Abbildung 4: T-Test der Stimulation mit humanem HGF der Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25

In Abbildung 4 werden die Ergebnisse des T-Tests der Stimulation mit humanem HGF der Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25 gezeigt. Die Messung erfolgte photometrisch. Die Färbung der Zelllinien wurde mit Kristallviolett durchgeführt. Die HGF-Stimulation führt zu einer Zunahme der optischen Dichte. Die statistischen Ergebnisse sind signifikant. Die stärkste Zunahme der optischen Dichte um etwa 45% findet sich bei der Zelllinie SCC25 bei einer HGF-Konzentration von 25 ng/ml.

Ergebnisse

4.4.2 Zellviabilitätsassay mit Foretinib zum Nachweis einer toxischen Wirkung auf die Tumorzellen

In weiteren Versuchen wurden für die fünf Zelllinien Zellviabilitätsassays mit dem Medikament Foretinib durchgeführt, um eine toxische Wirkung auf die Tumorzellen nachweisen zu können. Die Startkonzentration des Foretinib betrug dabei 100 μM und die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben. In der nachfolgenden Abbildung 5 werden die Ergebnisse einer Versuchsreihe (insgesamt $n=3$ pro Zelllinie) grafisch dargestellt.

Aus Tabelle 24 geht hervor, dass es bei allen Zelllinien durch die Behandlung mit Foretinib zu einer Reduktion der relativen Zellzahl kommt. In Tabelle 23 sind die graphisch bestimmten IC_{50} -Konzentrationen aufgelistet. Mit steigender Konzentration kann beobachtet werden, dass ab dem Punkt, bei welchem der größte Effekt erzielt wird, die relative Zellzahl wieder zunimmt.

Bei der Zelllinie SCC9 findet dieser Anstieg am ausgeprägtesten statt, auf ungefähr 43% der unbehandelten Kontrolle.

Der größte Effekt kann bei der Zelllinie Detroit mit einer Reduktion der relativen Zellzahl um 91% erzielt werden. Die Effizienz der Foretinib-Therapie liegt bei den fünf untersuchten Zelllinien zwischen ungefähr 70% und 91%.

Die schwächste, durch eine 1,56 μM Foretinib-Konzentration erreichte Abnahme der relativen Zellzahl findet bei der Zelllinie SCC9 statt. Eine deutliche Abnahme der relativen Zellzahl kann bei dieser Zelllinie erst ab Konzentrationen von über 1,56 μM erreicht werden.

Bei der Zelllinie Detroit 562 findet sich bei der Konzentration von 0,78 μM die prozentual größte Reduktion der relativen Zellzahl, nämlich um etwa 50%. Das gleiche Ausmaß der Verminderung der relativen Zellzahl findet sich bei der Zelllinie A253 bei einer Konzentration von ungefähr 3,12 μM . Bei der Zelllinie SCC9 kommt es bei einer Foretinib-Konzentration zwischen 3,12 μM - 6,25 μM zu einer 50%-igen Reduktion der relativen Zellzahl. Für die Zelllinien FaDu und SCC25 kann diese Reduktion bei Konzentrationen zwischen 0,78 – 1,56 μM beziehungsweise ungefähr 1,56 μM erreicht werden. Die Foretinib-

Ergebnisse

Konzentration, bei der in der Gesamtheit aller Zelllinien die größte Abnahme der relativen Zellzahl erkennbar ist, beträgt 12,5 μM .

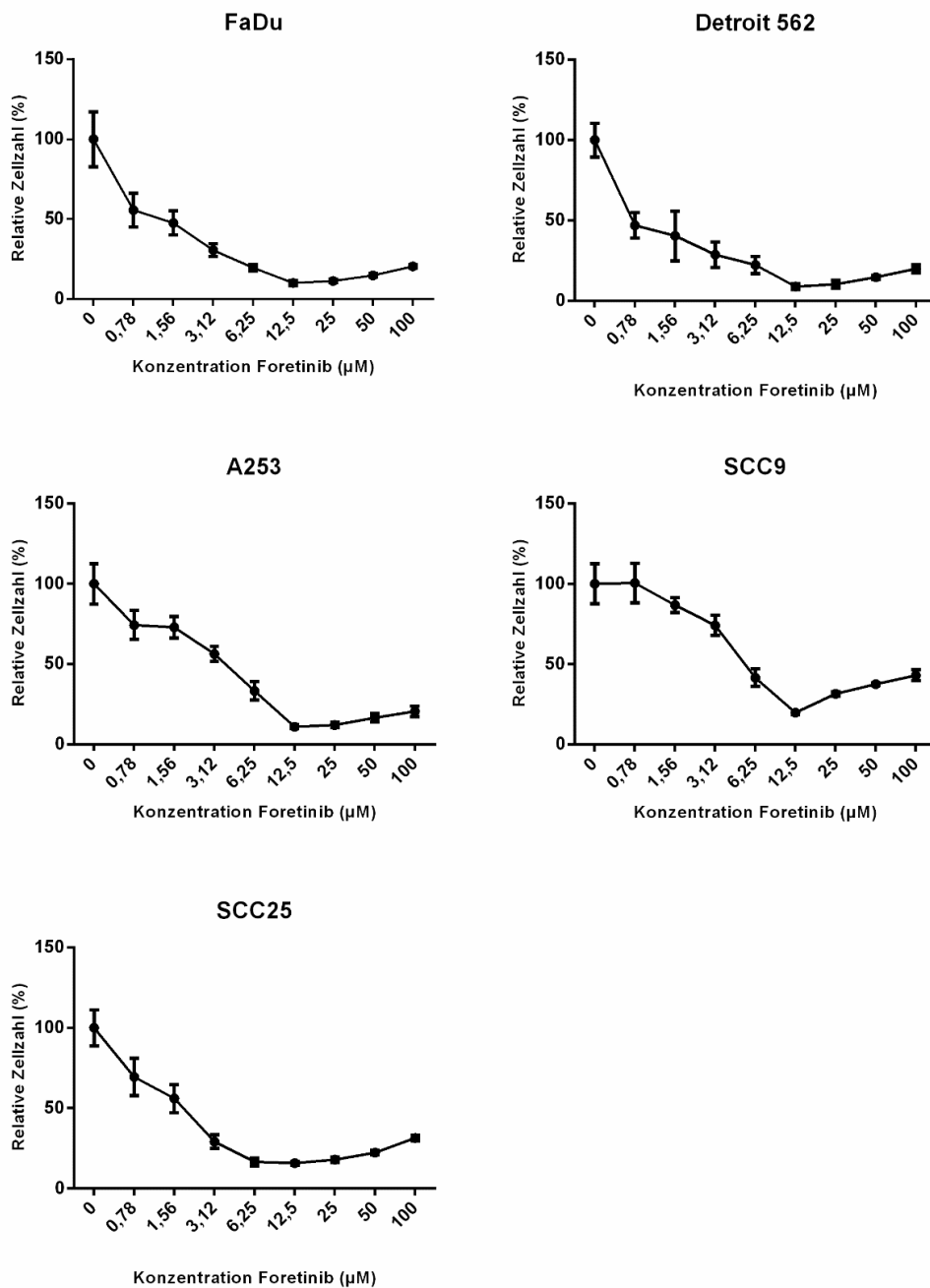


Abbildung 5: Zellviabilitätsassays der Zelllinien mit Foretinib

In Abbildung 5 werden Zellviabilitätsassays der Zelllinien mit Foretinib dargestellt. Auf der x-Achse wird die Konzentration von Foretinib gezeigt, auf der y-Achse die relative Zellzahl. Die Verdünnung erfolgte im Log2. Die Färbung erfolgte mit Kristallviolett. Die Messung erfolgte photometrisch. Bei allen Zelllinien kommt es zur Reduktion der relativen Zellzahl in Abhängigkeit von der Foretinib-Konzentration.

Ergebnisse

Tabelle 23: IC50-Konzentration Monotherapie mit Foretinib (graphisch bestimmt aus allen Kurven)

Zelllinie	IC50
FaDu	1,5 μ M
Detroit 562	1 μ M
A253	4,5 μ M
SCC9	4,5 μ M
SCC25	2 μ M

Tabelle 24: Relative Zellzahl sowie Foretinib-Konzentration bei maximaler Inhibition

Zelllinie	Relative Zellzahl bei maximaler Inhibition (%)	Konzentration Foretinib bei maximaler Inhibition (μ M)
FaDu	10,1%	12,5 μ M
Detroit 562	8,8%	12,5 μ M
A253	10,9%	12,5 μ M
SCC9	19,7%	12,5 μ M
SCC25	15,6%	12,5 μ M

Ergebnisse

4.4.3 T-Test-Analyse der Foretinib-Zellviabilitätsassays

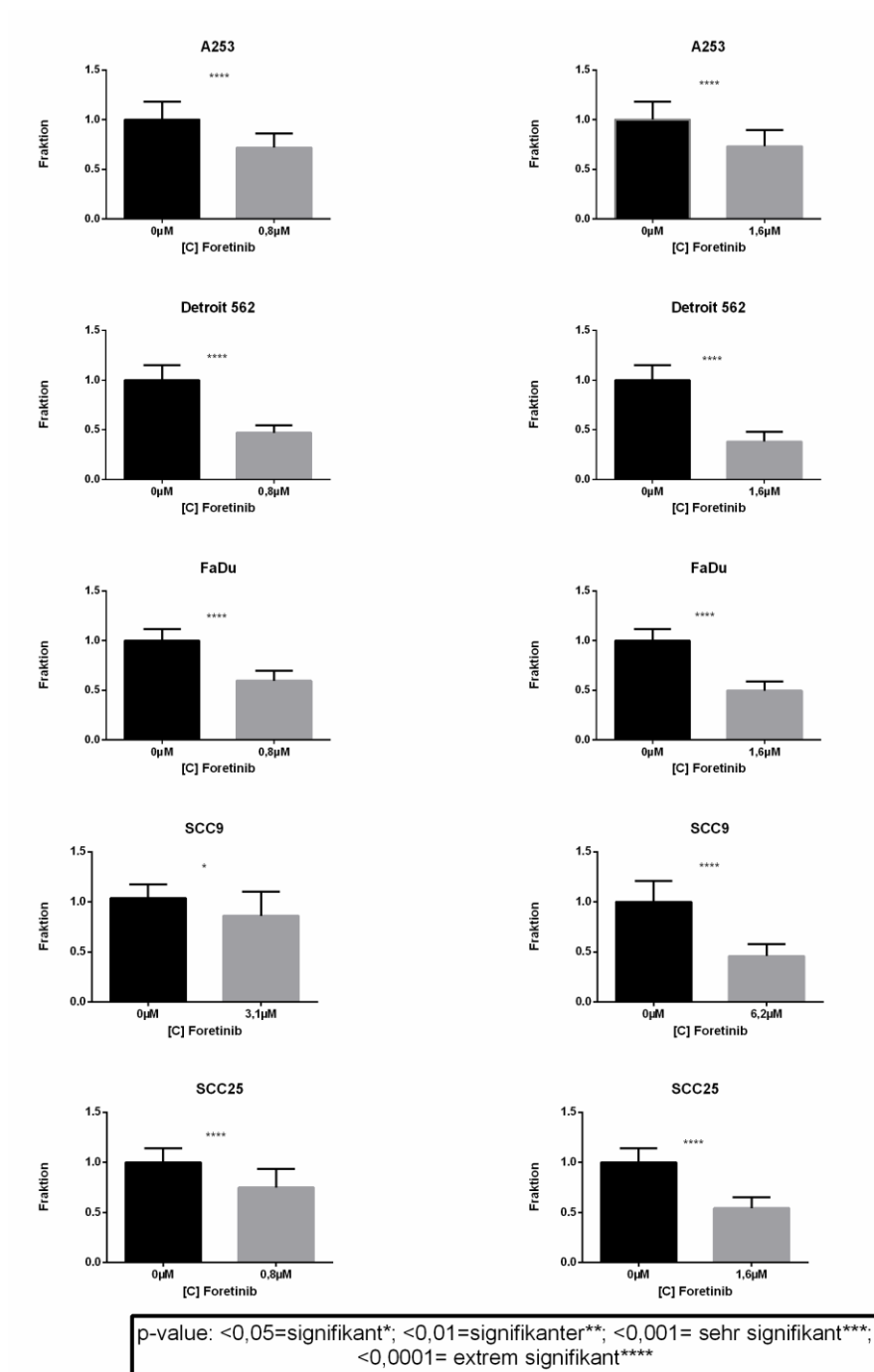


Abbildung 6: T-Test der Monotherapie mit Foretinib bei den Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25

In Abbildung 6 werden die Ergebnisse der statistischen T-Test-Analyse der Monotherapie mit Foretinib bei den Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25 dargestellt. Die Konzentration von Foretinib beträgt jeweils 0 μM, 0,8 μM, 1,6 μM, bei der Zelllinie SCC9 3,1 μM und 6,2 μM. Die statistische T-Test-Analyse erfolgte zwischen jeweils zwei Foretinib-Konzentrationen mit der unbehandelten Kontrolle. Alle Ergebnisse sind statistisch signifikant.

Ergebnisse

Die in Abbildung 6 dargestellten Diagramme zeigen für jede Zelllinie die Werte von jeweils zwei verschiedenen Foretinib-Konzentrationen mit der unbehandelten Kontrolle im T-Test-Verfahren. Dabei ist auf der x-Achse die Konzentration von Foretinib und auf der y-Achse die Fraktion als relative Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle aufgezeigt. Alle Ergebnisse sind statistisch signifikant.

4.4.4 Simultane Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib

In diesem Experiment wurden die fünf Zelllinien mit HGF stimuliert und gleichzeitig mit dem Met-Inhibitor Foretinib behandelt. Die Zielsetzung war es herauszufinden, ob der Met-Inhibitor die proliferationsfördernde Wirkung des Wachstumsfaktors HGF aufhebt. Die nachfolgenden Diagramme in Abbildung 7 zeigen zum einen die relative Zellzahl auf der y-Achse und zum anderen auf der x-Achse die jeweilige Medikation, mit der die Zelllinien behandelt wurden. Die unbehandelte Zelllinie ist als Kontrollwert anzusehen. Daneben wird die mit 25 ng/ml HGF stimulierte Zelllinie dargestellt. Des Weiteren wurden die Zelllinien mit den selbst ermittelten IC₅₀-Konzentrationen, die in der Monotherapie mit Foretinib herausgefunden wurden, behandelt. Hierbei wurden die Zelllinien mit Foretinib inhibiert (Foretinib) und in einer zweiten Gruppe gleichzeitig mit 25 ng/ml HGF stimuliert (HGF+Foretinib). Die Durchführung ist in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben.

Bei der Zelllinie A253 führt HGF zur Zunahme der relativen Zellzahl um 15%. Die verwendete IC₅₀-Konzentration von Foretinib verringert die relative Zellzahl auf ungefähr 70%. Bei gleichzeitiger Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib nimmt die relative Zellzahl um etwa 45% ab.

Bei der Stimulation mit HGF kommt es zu einem Anstieg der relativen Zellzahl der Zelllinie Detroit 562 um ca. 20%. Bei der Inhibition mit dem IC₅₀-Wert aus der Monotherapie kommt es sowohl bei den Zellen, die ausschließlich inhibiert wurden, als auch bei denen, die gleichzeitig inhibiert und stimuliert wurden, zu einer Abnahme der relativen Zellzahl um ca. 27% beziehungsweise 47%.

Ergebnisse

HGF führt bei der Zelllinie FaDu zu keiner deutlichen Zunahme der relativen Zellzahl. Allerdings wurde der proliferationsfördernde Einfluss von HGF auf die Zelllinie FaDu in der Monotherapie mit HGF belegt. Die IC50-Konzentration aus der Foretinib-Monotherapie reduziert in beiden Fällen die relative Zellzahl um knapp 40% sowie 36%.

Bei der Zelllinie SCC9 führt die Stimulation mit HGF zu einer deutlichen substanziellen Zunahme der relativen Zellzahl um 32%. Sowohl bei der Therapie mit ausschließlich Foretinib in der IC50-Konzentration als auch bei der zeitgleichen Stimulation mit HGF kommt es zur Abnahme der relativen Zellzahl um 28% beziehungsweise 60%.

Die Behandlung der Zelllinie SCC25 mit HGF führt zu einer Zunahme der relativen Zellzahl um 28%. Foretinib in der IC50-Konzentration verringert die relative Zellzahl, in Abhängigkeit von der Behandlung, um 28% beziehungsweise 60%.

Ergebnisse

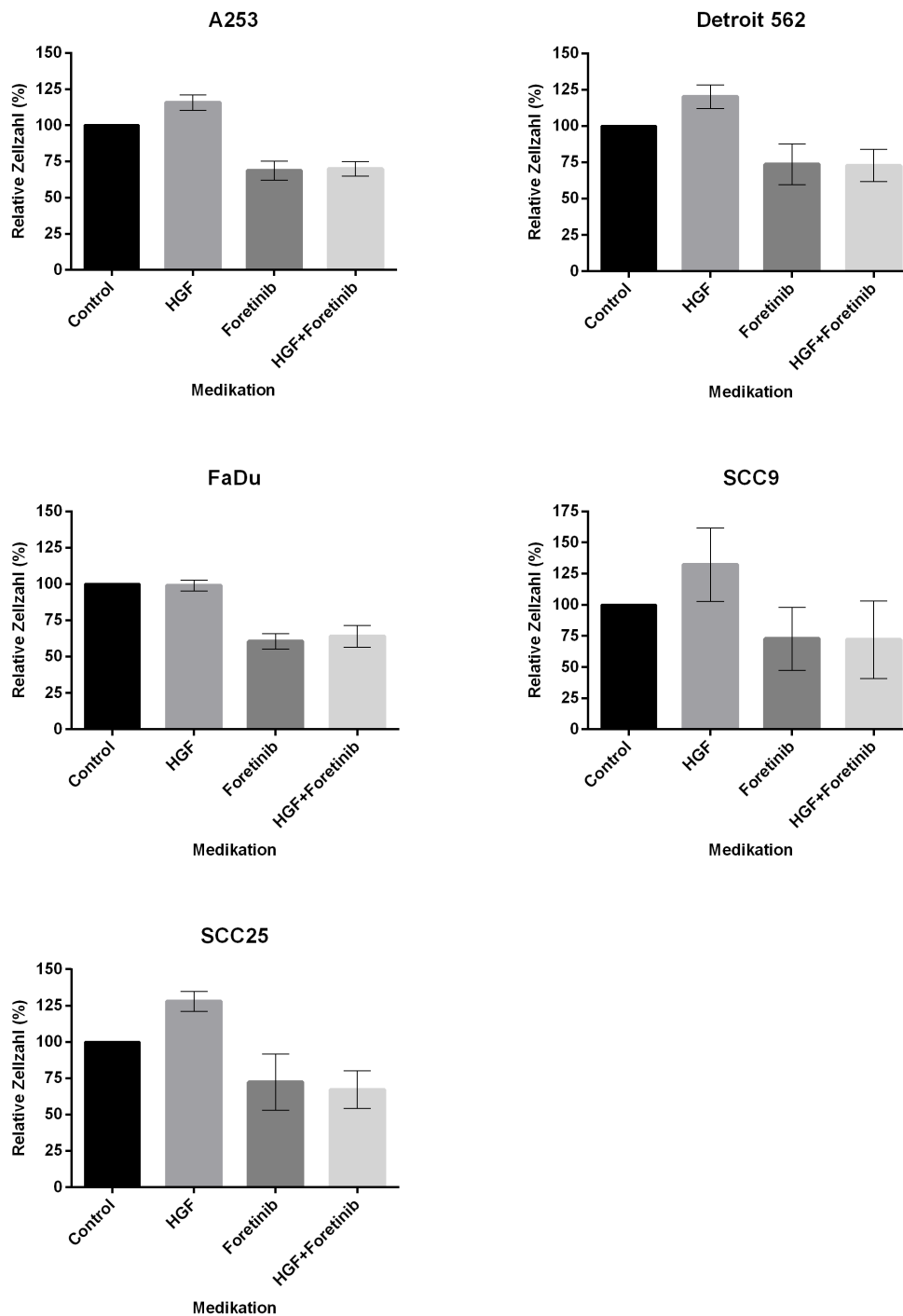


Abbildung 7: Simultane Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib

In Abbildung 7 werden auf der x-Achse die verschiedenen Medikationen, auf der y-Achse die relative Zellzahl in Prozent dargestellt. Die Messung erfolgte photometrisch, die Färbung mit Kristallviolett. Die Zellen wurden mit 25 ng/ml HGF stimuliert und gleichzeitig auch mit Foretinib, in der grafisch ermittelten IC50-Konzentration aus der Monotherapie, behandelt (siehe Tabelle 23).

Ergebnisse

4.5 Echtzeit-PCR zum Nachweis der Genexpression nach HGF-Stimulation sowie nach Inhibition mit Foretinib

In diesem Experiment wurden die fünf Zelllinien mit 25 ng/ml HGF und mit Foretinib in der ermittelten IC50-Konzentration aus der Monotherapie behandelt. Nach Stimulationszeiten von jeweils 24 und 48 Stunden wurde die RNA isoliert und cDNA hergestellt. Als Kontrollgruppe wurden die unstimulierten Zelllinien nach 24 beziehungsweise 48 Stunden verwendet. Im Folgenden wurden Echtzeit-PCRs durchgeführt, um auf Ebene der mRNA herauszufinden, ob sich für bestimmte Proteine durch die Stimulation beziehungsweise Inhibition des Met-Rezeptors Änderungen ergeben. Der Versuchsaufbau ist in Kapitel 3.2.5 beschrieben.

Untersucht wurden die für die folgenden Proteine kodierenden DNA-Abschnitte:

Pyruvatkinase, Hexokinase 1 (HK1), Hexokinase 2 (HK2), GLUT1 (SLC2A1), MCT1 (SLC16A1), MCT4 (SLC16A4) und Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 2 (PDK2).

Alle sieben Gene stehen dabei in direktem Zusammenhang mit dem Glukose-Metabolismus.

In den nachfolgenden Abbildungen 8 bis 12 ist auf der y-Achse die Fold induction der jeweiligen Gene aufgelistet. Auf der x-Achse ist die Behandlung mit der jeweiligen Dauer gezeigt.

Bei der Zelllinie A253 führt die Behandlung mit HGF über 24 Stunden zu einer leichten Herunterregulierung der Gene für die PKM (Faktor 0,74), die HK1 (Faktor 0,83) sowie den GLUT1 (Faktor 0,78). Im mRNA-Level der oben aufgelisteten Proteine für die Zelllinie A253 sind bei der Behandlung Foretinib keine nennenswerten Veränderungen sichtbar, wie aus Abbildung 8 zu erkennen ist.

Die Behandlung mit Foretinib führt bei der Zelllinie Detroit 562 über 24 und 48 Stunden jeweils zu einer leichten Hochregulierung des Gens für die HK1 um den Faktor 1,2 beziehungsweise 1,6. Das Gen für den MCT1 wird bei der Behandlung über 24 und 48 Stunden mit Foretinib um den Faktor 0,6 herunterreguliert. Die PCR-Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

Ergebnisse

Bei der Zelllinie FaDu werden die Gene der PKM1 sowie des SLC2A1 durch die 24-stündige Inhibition mit Foretinib leicht herunterreguliert (Faktor 0,71 beziehungsweise 0,79).

Das Gen der Hexokinase 2 wird bei der 24- und 48-stündigen Behandlung mit HGF substantiell hochreguliert (Faktor 1,94 beziehungsweise Faktor 1,65) wie aus Abbildung 10 ersichtlich ist.

Ebenso führt die 24-stündige Behandlung mit HGF dazu, dass das Gen des SLC16A1 leicht hochreguliert wird (Faktor 1,43).

Die 48-stündige Behandlung mit Foretinib führt zu einem substantiellen Anstieg des mRNA-Levels des MCT4 (Faktor 1,94).

Eine substantielle Hochregulierung kann bei der Zelllinie SCC9 in der 48-stündigen Stimulation mit HGF bei dem Gen für den GLUT1 (Faktor 1,71) sowie bei dem Gen für den MCT1 (Faktor 1,76) festgestellt werden. Ebenso kommt es bei der 24-stündigen Behandlung mit Foretinib für das Gen des MCT4 zu einer substantiellen Hochregulierung (Faktor 3,55). Des Weiteren sind, wie Abbildung 11 zeigt, keine Veränderungen in der Expression der sieben Gene erkennbar.

Die 24-stündige Behandlung der Zelllinie SCC25 mit Foretinib führt zu einer substantiellen Hochregulierung des Gens für den MCT4 (Faktor 1,67). Die 48-stündige Behandlung mit HGF führt bei der Zelllinie SCC25 zu einer verminderten Expression des Gens für PDK2 (Faktor 0,64).

Ansonsten sind bei dieser Zelllinie keine nennenswerten Veränderungen in der Genexpression erkennbar, wie man aus Abbildung 12 entnehmen kann.

Ergebnisse

4.5.1 A253

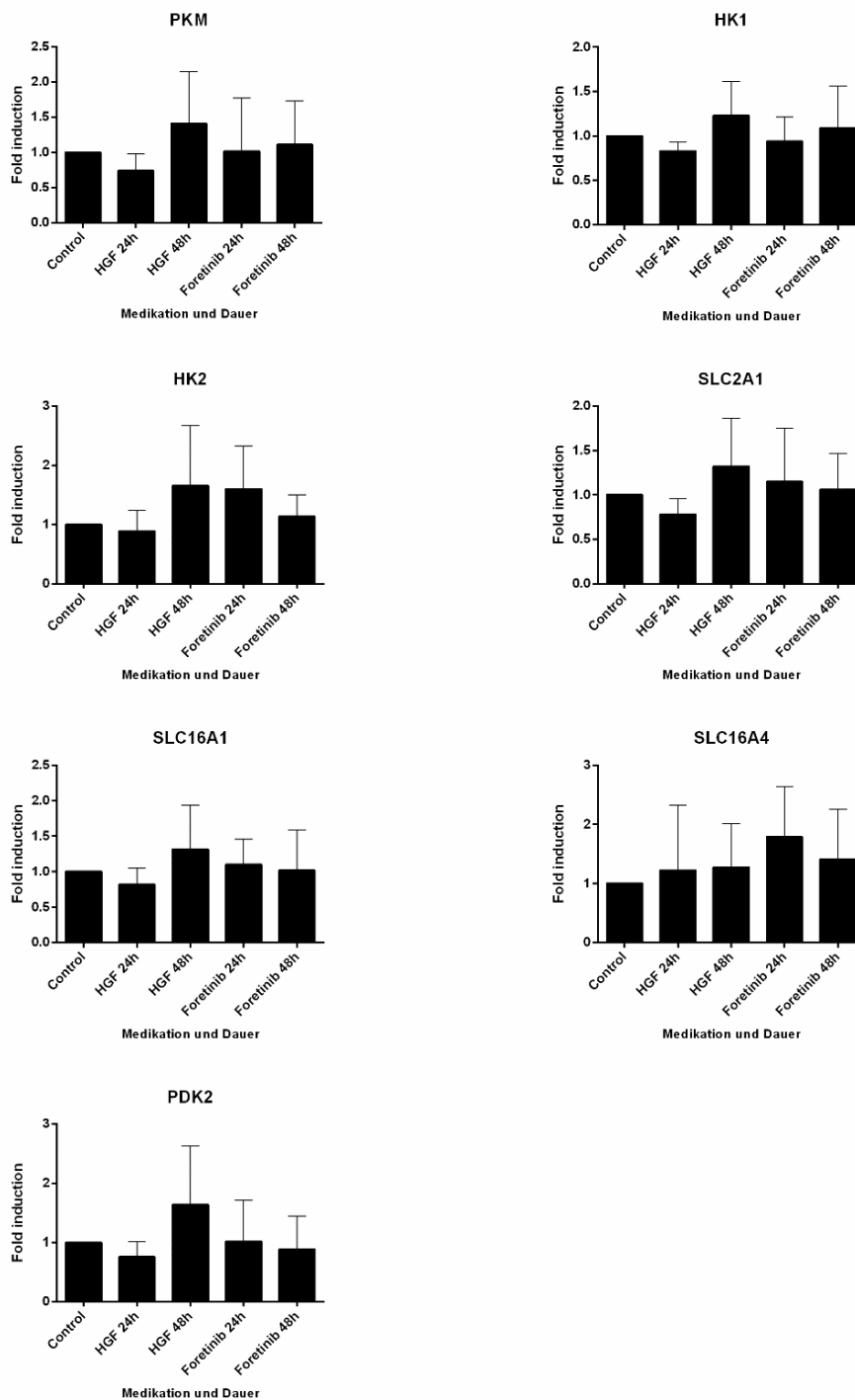


Abbildung 8: PCR der Zelllinie A253

Bei der Zelllinie A253 führt die Behandlung mit HGF über 24 Stunden zu einer leichten Reduktion der Gene für die PKM, die HK1 sowie den GLUT1. Die Behandlung mit Foretinib führt zu keinen nennenswerten Veränderungen im mRNA-Level der untersuchten Proteine.

Ergebnisse

4.5.2 Detroit 562

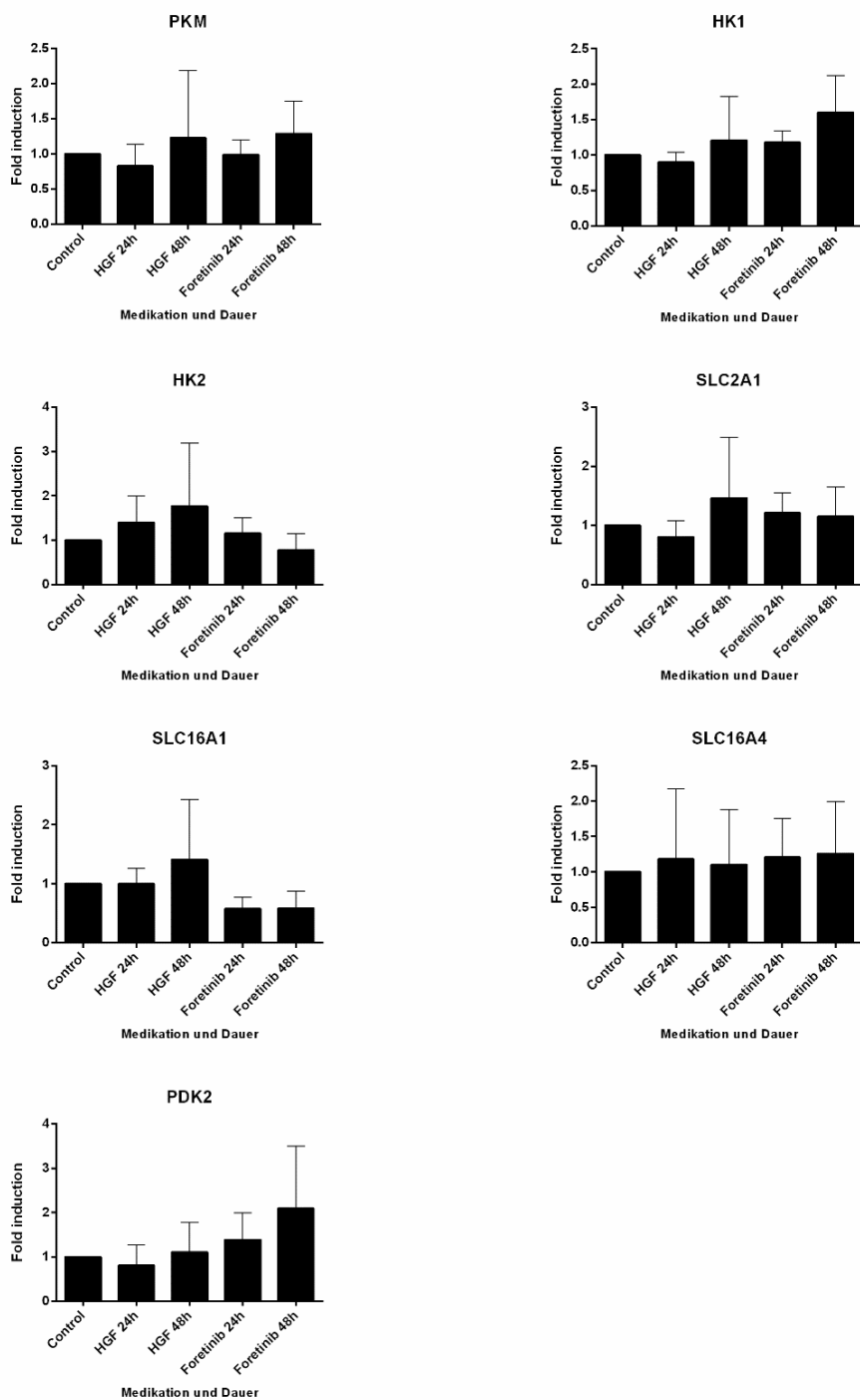


Abbildung 9: PCR der Zelllinie Detroit 562

Das Gen für die HK1 wird bei der Behandlung über 24 und 48 Stunden mit Foretinib substanzuell leicht hochreguliert (Faktor 1,2 beziehungsweise 1,6). Die Behandlung mit Foretinib führt über 24 und 48 Stunden jeweils zu einer Herunterregulierung des Gens für den MCT1 (Faktor 0,6).

Ergebnisse

4.5.3 FaDu

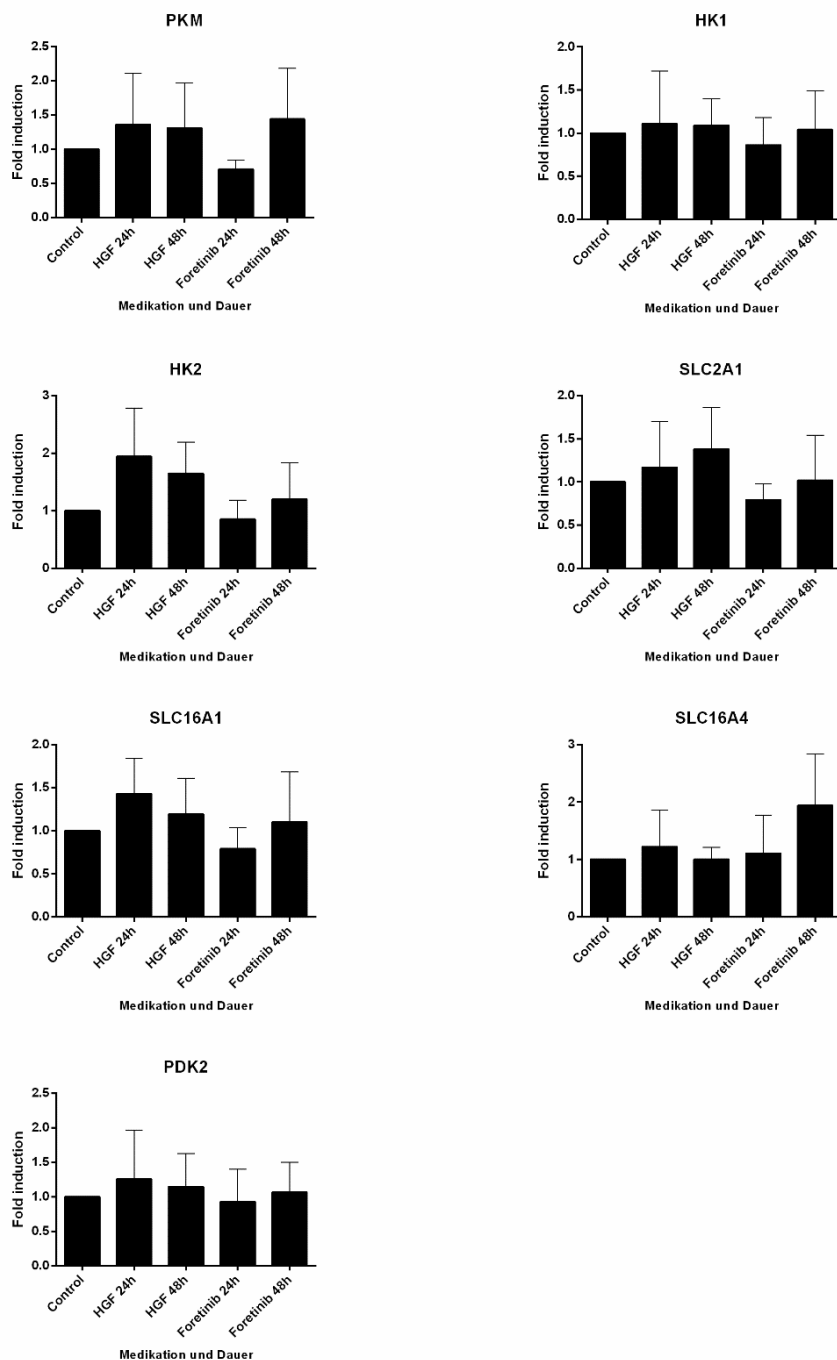


Abbildung 10: PCR der Zelllinie FaDu

Es kommt zu einer Herunterregulierung der Gene für die PKM1 (Faktor 0,71) und SLC2A1 (Faktor 0,79) durch die 24-stündige Behandlung mit Foretinib. Das Gen der Hexokinase 2 bei der 24-stündigen Behandlung mit HGF substanziiell hochreguliert und etwa doppelt so stark exprimiert (Faktor 1,94). Ebenso wird dieses Gen auch bei der 48-stündigen Behandlung mit HGF hochreguliert, jedoch weniger stark (Faktor 1,65). Ebenso kommt es zu einem Anstieg des mRNA-Levels des SLC16A1 (Faktor 1,43) durch die 24-stündige Behandlung mit HGF. Die 48-stündige Behandlung mit Foretinib führt zu einem substanziiellen Anstieg des mRNA-Levels des SLC16A4 (Faktor 1,94).

Ergebnisse

4.5.4 SCC9

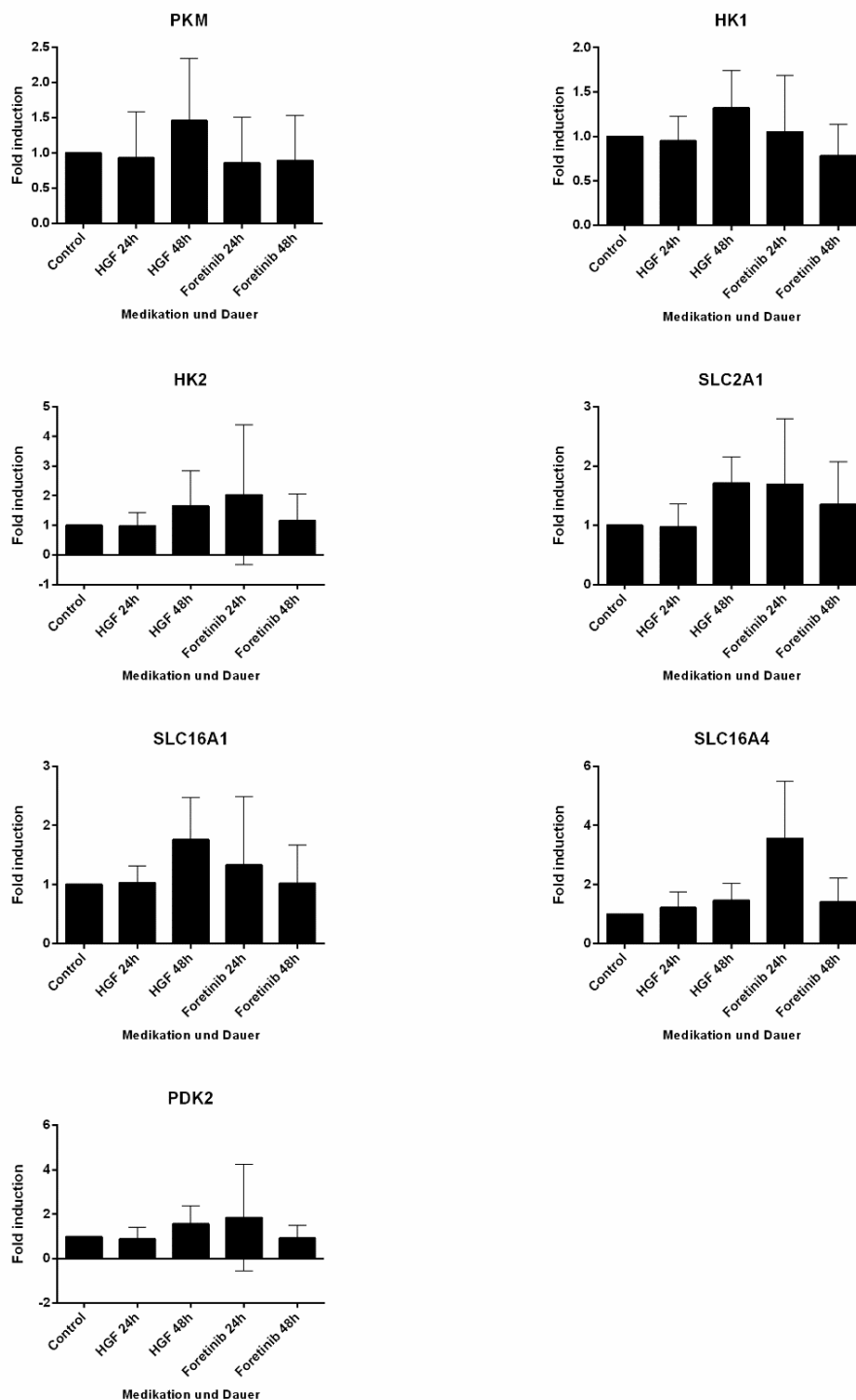


Abbildung 11: PCR der Zelllinie SCC9

Bei der Zelllinie SCC9 kommt es lediglich bei den Genen für den GLUT1 (SLC2A1), MCT 1 (SLC16A1) und den MCT4 (SLC16A4) zu einem substantiellen Zuwachs bei der Behandlung mit HGF über 48 Stunden (GLUT1: Faktor 1,71; MCT1: Faktor 1,76) beziehungsweise mit Foretinib über 24 Stunden (MCT4: Faktor 3,55).

Ergebnisse

4.5.5 SCC25

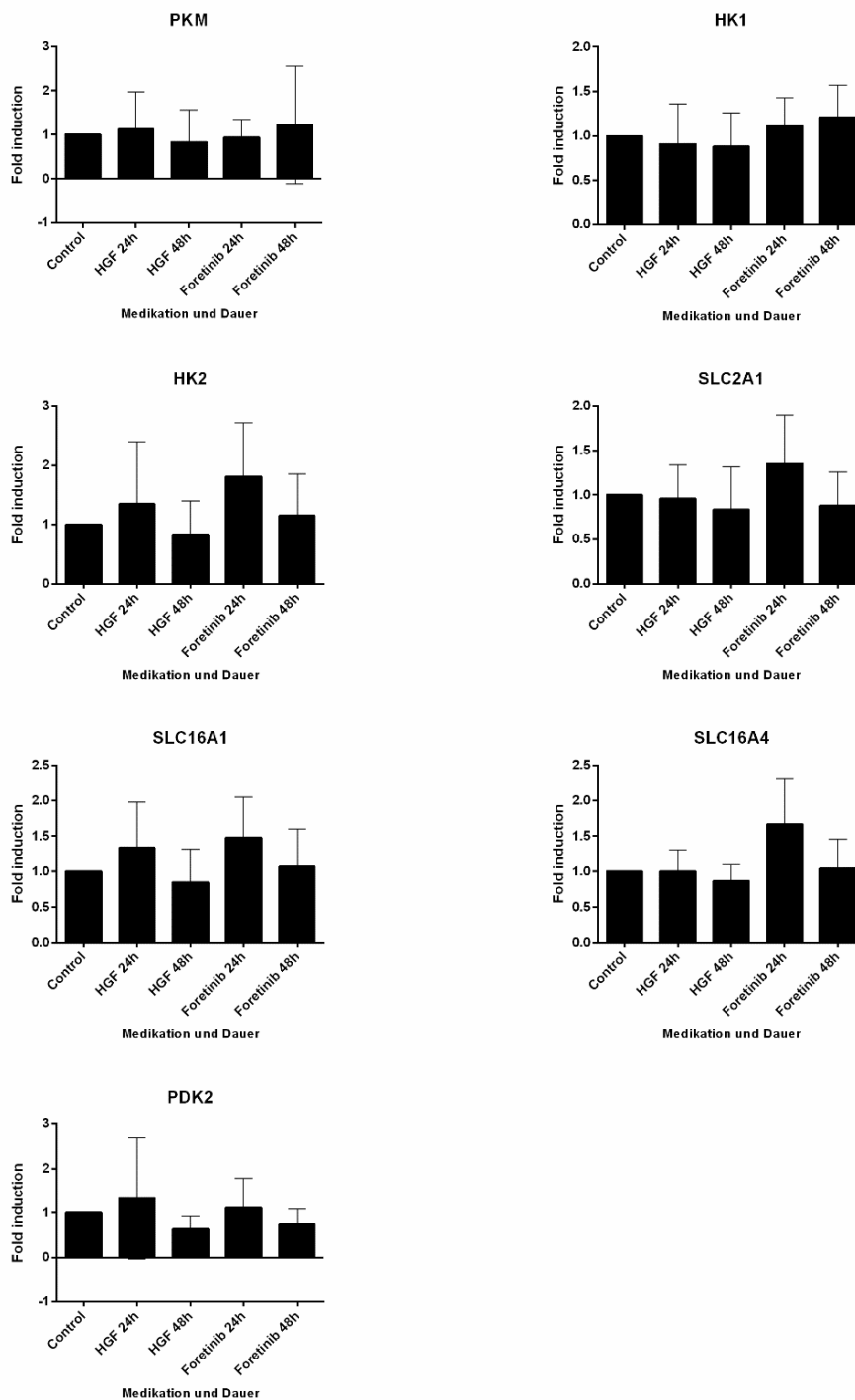


Abbildung 12: PCR der Zelllinie SCC25

Die 24-stündige Behandlung mit Foretinib führt zu einer verstärkten Expression des Gens für den MCT4 (Faktor 1,67). Bei der 48-stündigen Behandlung mit HGF kommt es zu einer verminderten Expression des Gens für die PDK2 (Faktor 0,64). Ansonsten sind hier ebenfalls keine nennenswerten Veränderungen in der Genexpression erkennbar.

4.6 FACS zum Nachweis von GLUT1 auf den Zelllinien

In diesem Versuch wurden die fünf Zelllinien zum einen mit 25 ng/ml HGF und zum anderen mit Foretinib in der jeweiligen IC50-Konzentration aus der Monotherapie behandelt. Nach zwei verschiedenen Stimulationszeiten von 24 und 48 Stunden wurden die Zellen dann mit Antikörpern für die FACS-Analyse gefärbt. Die Durchführung ist in Kapitel 3.2.6 beschrieben. Es wurden in jedem Durchgang mindestens 10.000 Events gemessen. Der erste Antikörper, der verwendet wurde, war der Isotypkontrollantikörper, welcher als Negativkontrolle dient. Der Isotypkontrollantikörper soll hierbei das Ausmaß der unspezifischen Antikörperbindungen aufzeigen. Der zweite Antikörper diente dazu, um den GLUT1-Transporter zu binden. In den nachfolgenden Diagrammen ist auf der x-Achse die Behandlung der Zelllinien zu sehen. Auf der y-Achse ist die relative Anzahl von GLUT1 als Mittelwert aus den Versuchen (n=3) auf der Oberfläche der Zelllinie aufgezeigt. Die einzelnen Werte stammen dabei aus den Histogrammen, wobei hier die Mean-Werte verwendet wurden. Der Mean beschreibt hierbei die Menge an GLUT1, die sich in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität im Durchschnitt auf jeder Zelle befindet. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus dem oben beschriebenen Versuch dargestellt.

Nach der 24-stündigen Stimulation mit HGF befindet sich bei der Zelllinie A253 35,9% weniger GLUT1 auf der Membranoberfläche im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Stimulation mit HGF über 48 Stunden befindet sich sogar 41,3% weniger GLUT1 auf der Oberfläche der Zellen. Die Behandlung mit Foretinib über 48 Stunden führt zu einem substantiellen Anstieg von GLUT1.

6,8% weniger GLUT1 werden nach der 24-stündigen Simulation mit HGF bei der Zelllinie Detroit 562 auf der Membranoberfläche gemessen, nach der 48-stündigen Stimulation sogar 17,7% weniger. Durch die Behandlung mit Foretinib zeigt sich substantiell mehr GLUT1 auf der Membranoberfläche.

Ergebnisse

Die Behandlung der Zelllinie FaDu führt bei der 24-stündigen Stimulation mit HGF zu einer Reduktion der Menge an GLUT1 auf der Membranoberfläche um 35,3%. Bei der 48-stündigen Inhibition mit Foretinib nimmt die Menge von GLUT1 um 44,5% zu.

Bei der Zelllinie SCC9 sinkt nach der 24-stündigen Stimulation mit HGF der GLUT1-Anteil auf der Membranoberfläche um 22,2%. Die 48-stündige Behandlung mit Foretinib führt zu einem substantiellen Anstieg des GLUT1-Anteils um ungefähr 42%.

Ebenso reduziert sich der GLUT1-Anteil um 22,7% bei der Zelllinie SCC25 nach einer 48-stündigen Behandlung mit HGF. Die 24-stündige Inhibition mit Foretinib zeigt einen Anstieg des GLUT1-Transporters auf der Membran um 55,2%, wohingegen nach der 48-stündigen Stimulation mit Foretinib die Menge um 59,2% gestiegen ist.

Ergebnisse

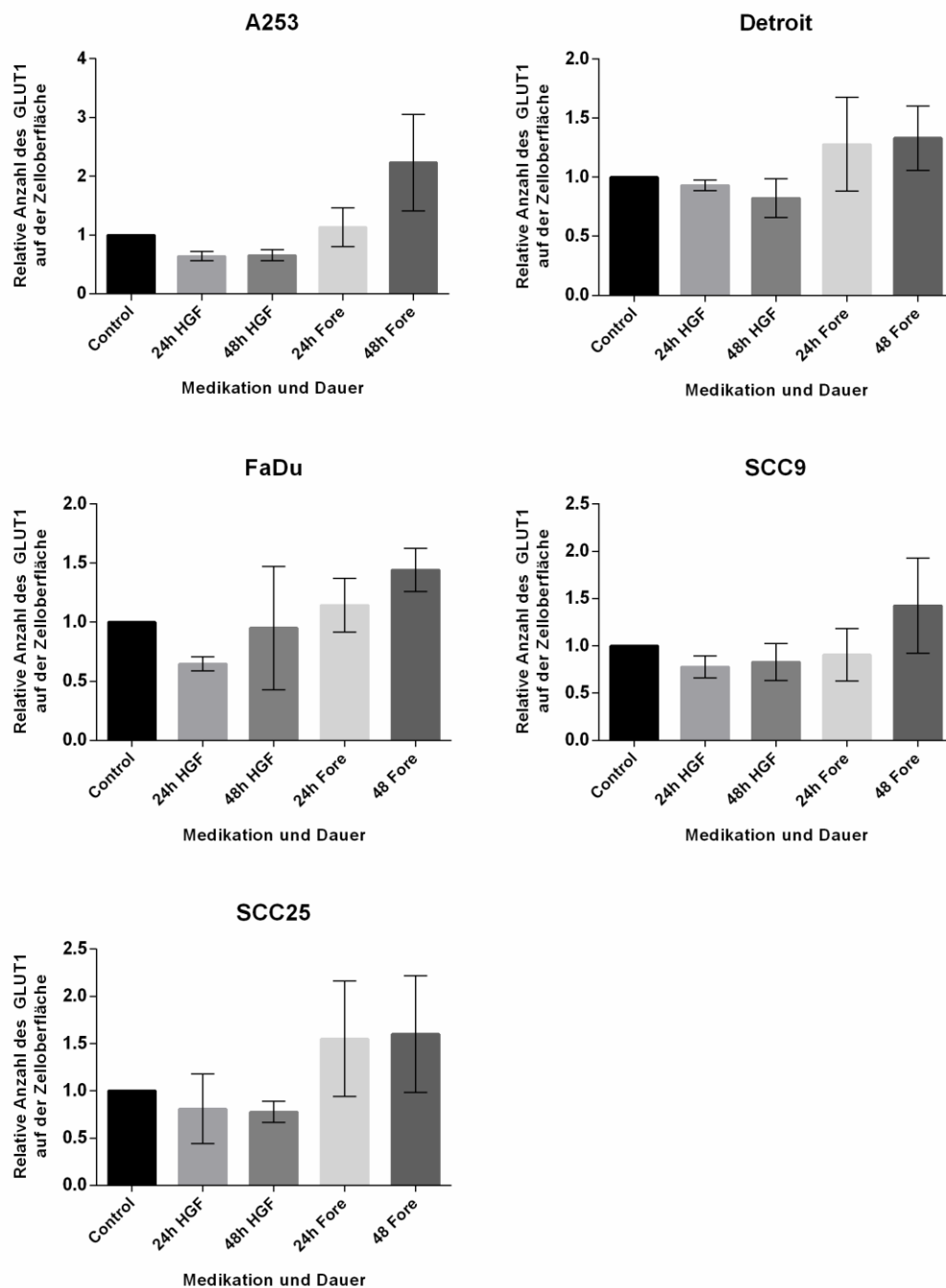


Abbildung 13: Relative Anzahl des GLUT1 bei den Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25

In Abbildung 13 wird die relative Anzahl des GLUT1 bei den Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25 gezeigt. Auf der x-Achse ist die Behandlung der Zelllinien zu sehen mit Wirkstoff und Dauer. Auf der y-Achse ist die relative Anzahl von GLUT1 als Mittelwert aus den Versuchen ($n=3$) auf der Oberfläche der Zelllinie aufgezeigt. Die Messung erfolgte mit dem FACS, als Grundlage für die Werte diente der Mean-Wert der einzelnen Messungen aus den Histogrammen. Der Mean beschreibt hierbei die Menge an GLUT1, die sich in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität im Durchschnitt auf jeder Zelle befindet. Das Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

Ergebnisse

Die Abbildungen 14 - 17 zeigen allesamt Beispiele aus der FACS-Analyse. Auf der linken Seite ist eine Überlagerung aller Histogramme aus den unstimulierten ungefärbten Zellen, den unstimulierten gefärbten Zellen sowie den mit HGF beziehungsweise mit Foretinib (Fore) behandelten gefärbten Zellen dargestellt. Auf der rechten Seite sind jeweils die Streudiagramme der Kontrollgruppen mit dem jeweiligen Gate gezeigt. Es wurden jeweils alle Zellen einer Zelllinie mit dem gleichen Gate ausgewertet.

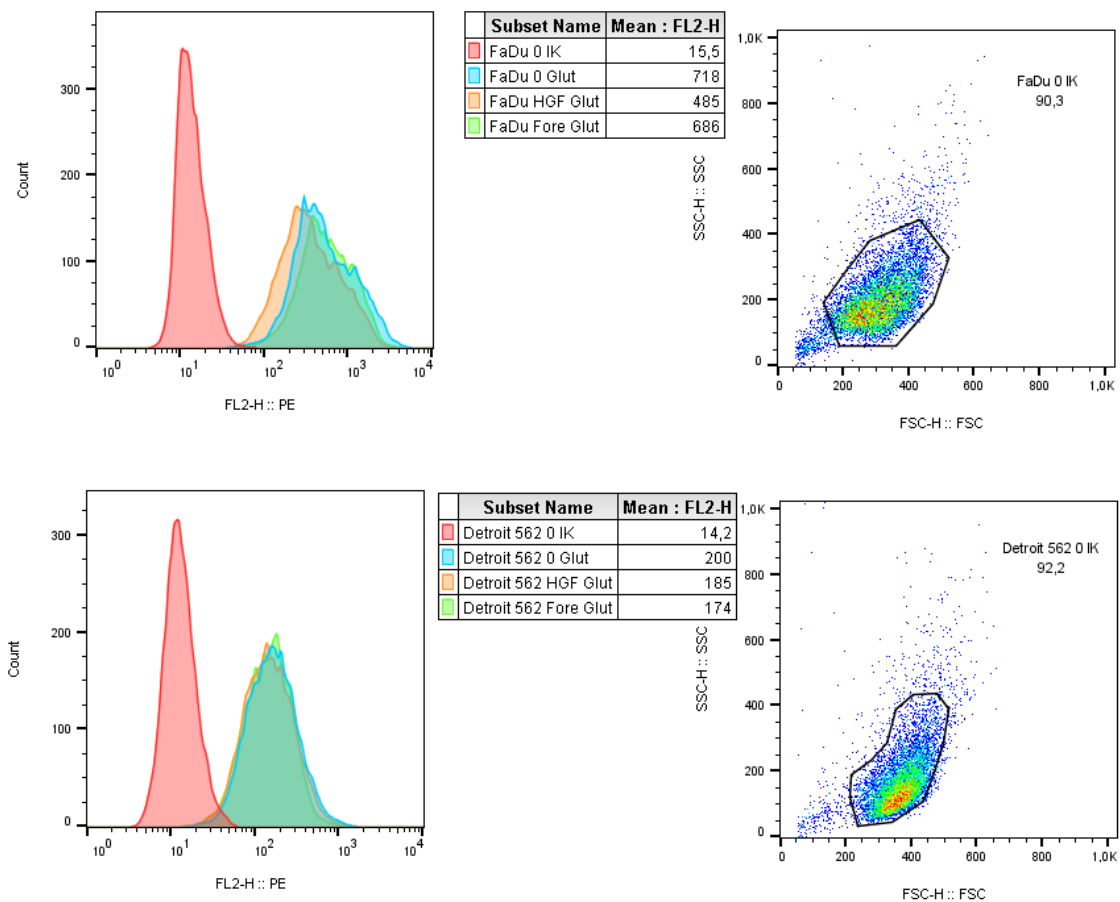


Abbildung 14: Darstellung der FACS-Ergebnisse aus der 24-stündigen Behandlung der Zelllinien FaDu und Detroit 562

In Abbildung 14 werden die FACS-Ergebnisse aus der 24-stündigen Behandlung der Zelllinien FaDu und Detroit 562 dargestellt. Bei der Zelllinie FaDu ist zu erkennen, dass es lediglich bei der Behandlung mit HGF zu einer deutlichen Verminderung des Mean-Wertes kommt. Bei der Zelllinie Detroit 562 kommt es dahingegen nur zu einer geringen Verkleinerung der Mean-Werte. Bei der Behandlung mit Foretinib kommt es zu einer leichten Verkleinerung des Mean-Wertes beider Zelllinien.

Ergebnisse

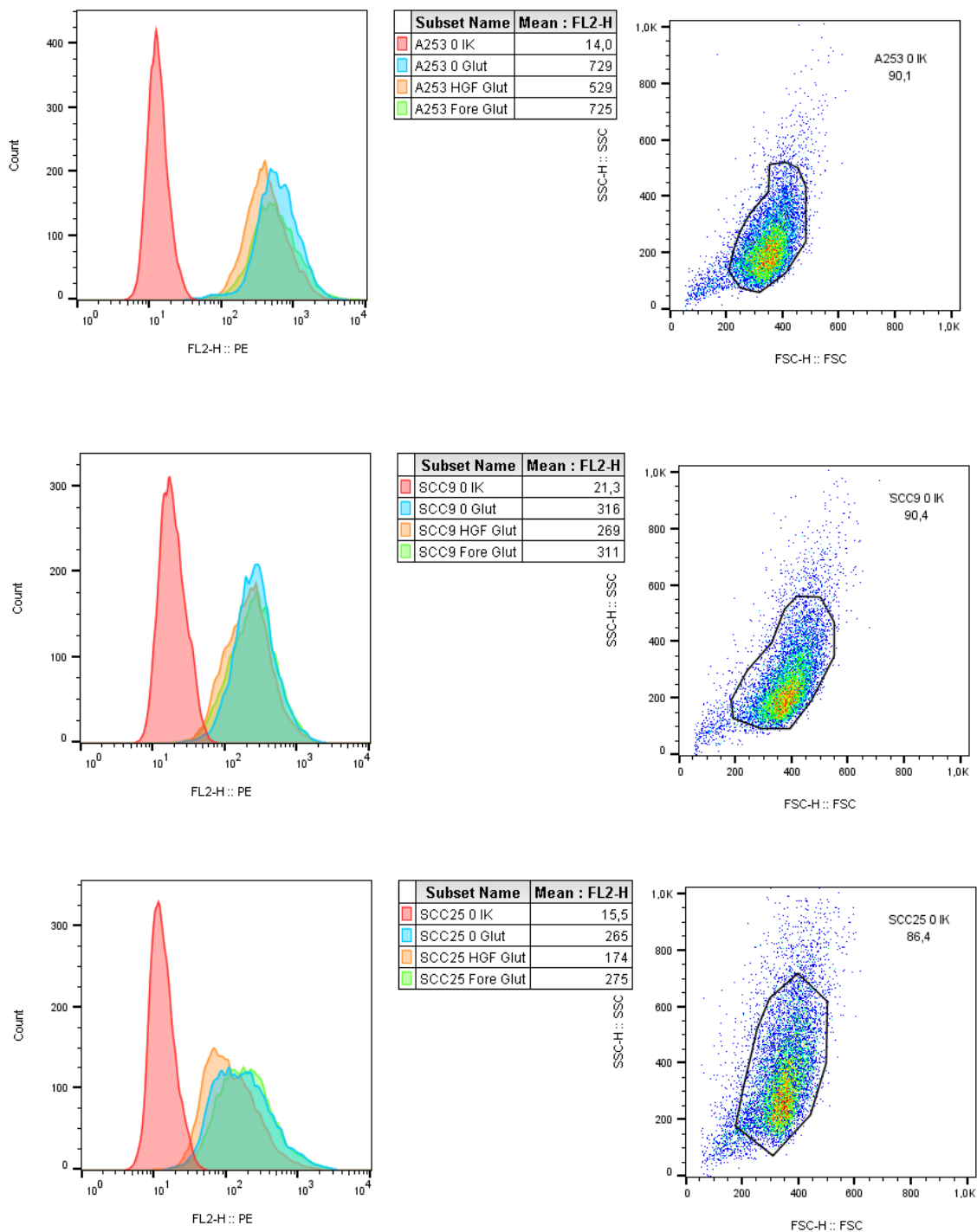


Abbildung 15: Darstellung der FACS-Ergebnisse nach der 24-stündigen Behandlung der Zelllinien A253, SCC9 und SCC25

Abbildung 15 zeigt die Darstellung der FACS-Ergebnisse nach der 24-stündigen Behandlung der Zelllinien A253, SCC9 und SCC25. Bei allen drei Zelllinien ist auch hier erkennbar, dass die Behandlung mit HGF zu einer Verminderung des Mean-Wertes führt. Bei der Behandlung mit Foretinib kommt es zu keinen wesentlichen Veränderungen des Mean-Wertes bei den drei Zelllinien.

Ergebnisse

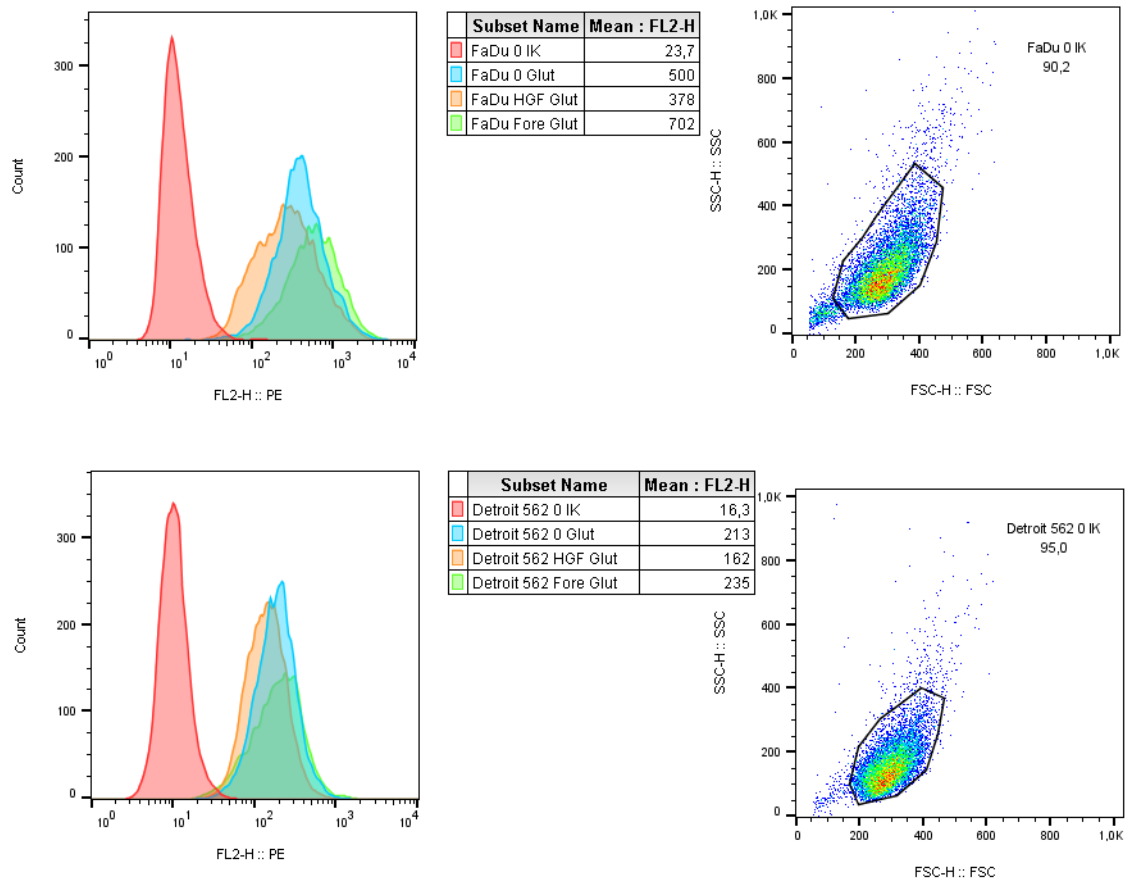


Abbildung 16: Darstellung der FACS-Ergebnisse aus der 48-stündigen Behandlung der Zelllinien FaDu und Detroit 562

In Abbildung 16 werden die Ergebnisse aus der 48-stündigen Behandlung der Zelllinien FaDu und Detroit 562 gezeigt. Unverkennbar ist, dass der Mean-Wert durch die HGF-Behandlung deutlich sinkt, wohingegen die Behandlung mit Foretinib bei der Zelllinie FaDu zu einem starken Anstieg des Mean-Wertes führt. Bei der Zelllinie Detroit 562 kommt es hingegen nicht zu einem ähnlich starken Anstieg des Mean-Wertes.

Ergebnisse

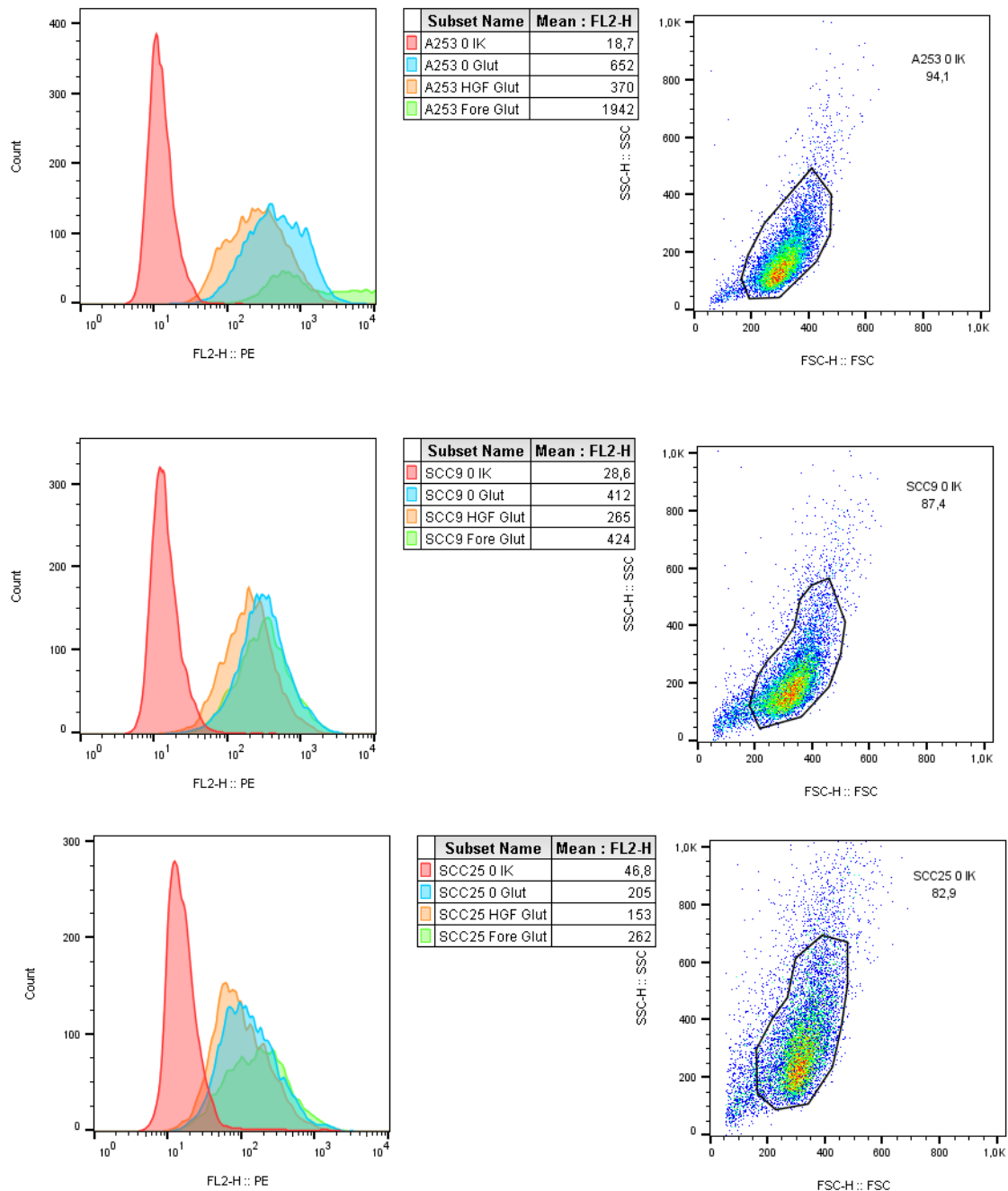


Abbildung 17: Darstellung der FACS-Ergebnisse aus der 48-stündigen Behandlung der Zelllinien A253, SCC9 und SCC25

In Abbildung 17 werden die FACS-Ergebnisse aus der 48-stündigen Behandlung der Zelllinien A253, SCC9 und SCC25 gezeigt. Bei allen drei Zelllinien wird gezeigt, dass die 48-stündige Stimulation mit HGF zu einer Abnahme des Mean-Wertes führt. Bei der Behandlung mit Foretinib kommt es bei den beiden Zelllinien SCC9 und SCC25 zu einer nur geringen Veränderung des Mean-Wertes, wohingegen bei der Zelllinie A253 in diesem FACS-Durchlauf eine mehr als doppelt so große Menge des GLUT1 erkennbar wird.

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden fünf etablierte Tumorzelllinien aus dem Kopf- und Halsbereich mit den zwei verschiedenen Wirkstoffen HGF und Foretinib behandelt. Das Ziel der Arbeit war es, den Einfluss des Met-Rezeptor-Signalwegs auf den Glukose-Metabolismus darzustellen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien besitzen allesamt den Met-Rezeptor, jedoch in unterschiedlich starkem Ausmaß. Des Weiteren sezernieren die Zelllinien kein HGF.

Die Stimulation der Tumorzelllinien mit HGF führt zu einer Zunahme der relativen Zellzahl und somit zu einer Zunahme des photometrischen Signals.

Die Inhibition des Met-Rezeptors durch Foretinib führt zu einer Abnahme der relativen Zellzahl der Tumorzelllinien und somit zu einer Abnahme des photometrischen Signals.

Die gleichzeitige Stimulation der Zelllinien mit HGF und Inhibition des Met-Rezeptors mit Foretinib führt zelllinienübergreifend zu dem Ergebnis, dass die HGF-vermittelte Proliferation durch Foretinib inhibiert wird.

Die Stimulation der Zelllinien mit HGF sowie die Behandlung mit Foretinib führt zu einzelnen substanziellen Veränderungen auf der mRNA-Ebene der untersuchten Proteine des Glukosemetabolismus, jedoch in ihrer Gesamtheit zu keinen signifikanten Veränderungen.

Die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor HGF führt zu einer verminderten Expression des GLUT1 auf der Zelloberfläche der Tumorzelllinien.

Durch die Behandlung mit Foretinib kommt es zum Teil zu einem verstärkten Vorkommen des GLUT1 auf der Zelloberfläche der Zelllinien.

5 Diskussion

Die Zielsetzung der Arbeit bestand zunächst darin, den Met-Rezeptor bei fünf Zelllinien, die aus dem Kopf- und Halsbereich stammen, nachzuweisen. Des Weiteren sollen jeweils die Auswirkungen einer Monotherapie und einer Kombinationstherapie, bei welchen sowohl der Ligand HGF als auch der Tyrosinkinase-Inhibitor Foretinib angewendet wurden, auf die ausgewählten Zelllinien aufgezeigt werden.

Der Fokus der weiteren Versuche konzentrierte sich darauf, ob und in welchem Ausmaß der Glukose-Metabolismus durch die zwei oben genannten Wirkstoffe beeinflusst wird. Hierbei wurden acht Gene, die in direktem Zusammenhang mit dem Glukose-Metabolismus stehen sowie die Plasmamembranlokalisation des GLUT1 untersucht.

5.1 FACS zum Nachweis des Met-Rezeptors auf den Tumorzelllinien

Zunächst wurden die Zelllinien auf das Vorhandensein des Met-Rezeptors untersucht. Bei allen fünf Zelllinien kann der Met-Rezeptor im Durchflusszytometer in unterschiedlich starkem Ausmaß nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit der Literatur, da der Met-Rezeptor in 70% - 90% der Kopf-Hals-Karzinome in substantieller Menge exprimiert wird.⁶⁹⁻⁷¹

Die mittleren Fluoreszenzintensitäten unserer Untersuchungen, nämlich dass SCC9 (88,65) am meisten, FaDu (56,09) weniger und SCC25 (26,41) deutlich weniger Met-Rezeptor besitzt, sind qualitativ vergleichbar mit Daten von Seiwert et al. für die gleichen Zelllinien.⁵² Bei den Zelllinien A253 (102,22) und Detroit 562 (121,96) konnte hingegen noch mehr Met-Rezeptor nachgewiesen werden. Die hohe Expression des Met-Rezeptors bei der Zelllinie Detroit 562 liegt eventuell in der Tatsache begründet, dass diese Zelllinie aus metastatischen Absiedlungen eines Pharynxkarzinoms etabliert wurde.

Galeazzi et al. zeigten, dass bei Metastasen die Rezeptorexpression im Vergleich zum Primärtumor stärker ist.⁷²

Wie aus der Literatur zu erwarten ist, findet sich auf allen fünf Zelllinien der gesuchte Met-Rezeptor, allerdings in unterschiedlich starkem Ausmaß, wie in Tabelle 20 gezeigt.

5.2 ELISA zum Nachweis von endogenem HGF

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Zelllinien selbst den Liganden des Met-Rezeptors sekretieren. Das Ergebnis des Enzyme-linked Immunosorbent Assays zeigt, dass die Zelllinien annähernd kein HGF produzieren.

So entspricht dieses Ergebnis den Erkenntnissen aus der Literatur. Knowles et al. beschreiben ebenso in einer experimentellen Studie, dass die Tumorzellen selbst kein HGF produzieren. Das in der Studie nachgewiesene HGF stammt von drei Fibroblasten-Kulturen TDF0001, TDF0731 und 0733, die aus dem Tumor-Micro-Environment (TME) dreier verschiedener Tumore PCI-37A, UM-22B und 1483 (Zunge, Larynx, Tonsillen) stammen. Die HGF-Stimulation der Tumorzellen erfolgt durch einen parakrinen Sekretionsmodus.⁷³

5.3 Zellviabilitätsassay

Es wurden drei Zellviabilitätsassays mit unterschiedlichen Konditionen für die Zelllinien durchgeführt. Zum einen wurden die Zellen mit HGF stimuliert und zum anderen mit Foretinib inhibiert. Außerdem wurde auch eine Kombinationstherapie mit gleichzeitiger Stimulation und Inhibition durchgeführt.

5.3.1 Zellviabilitätsassay mit HGF und Foretinib zum Nachweis einer proliferationsfördernden beziehungsweise toxischen Wirkung auf die Tumorzellen

Zunächst wurden die Zellen mit dem Wachstumsfaktor HGF stimuliert. Mit der Aktivierung des Met-Rezeptors gehen verschiedene Prozesse in den Tumorzellen einher. So führen diese zur Zellproliferation, Migration, Invasion sowie der Metastasierung.^{49, 50}

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass HGF zur Proliferation der verwendeten Zelllinien beiträgt. Des Weiteren soll die Empfindlichkeit der fünf Zelllinien gegenüber dem Tyrosinkinase-Inhibitor Foretinib überprüft werden.

Allerdings handelt es sich hierbei um Monozellkulturen, worin keine Tumor-assoziierten Fibroblasten beziehungsweise andere tumorspezifische Zellarten vorhanden sind. Die Zellen dieses artifiziellen Systems wachsen als Monolayer, wodurch keine dauerhafte Stimulation der Zelllinien mit HGF stattfindet. Tabelle 22 veranschaulicht die konzentrationsabhängigen proliferativen Effekte von HGF in den untersuchten Zelllinien.

Diskussion

In einer experimentellen Studie von Knowles et al., in der drei HNSCC-Zelllinien (PCI-37A, UM-22B und 1483) untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass es zu einer HGF-induzierten Proliferation kommt.⁷³ Eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zellproliferation konnte zusätzlich bei der Zelllinie PCI-37A durch die Forschungsgruppe nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 50 ng/ml HGF kann der maximale Effekt auf die Zellproliferation beobachtet werden. Hierbei wurden 6.000 Zellen/Well ausgesät, über einen Zeitraum von 72 Stunden stimuliert und mit Hilfe eines MTS-Assays ausgewertet.

Fleigel et. al konnten ebenso proliferationsfördernde Effekte bei der Zelllinie FaDu herausfinden. Vor Beginn des eigentlichen Versuchs wurden die Zellen für eine Zeitspanne von 24 Stunden in einem serumfreien Medium mit 1% bovinem Serum-Albumin und 1 X Penicillin-Streptomycin gehalten. Außerdem wurden die 96-Well-Platten über Nacht bei 37 °C mit vier extrazellulären Proteinen, Fibronectin (Fn), bovinem Kollagentyp I (Cn I) und IV (Cn IV) sowie Murinlaminin (Ln), beschichtet. Nachdem die Zellen in den Platten ausgesät worden sind, wurde am nächsten Tag das Medium durch ein 200 µl serumfreies Medium mit verschiedenen HGF-Konzentrationen ausgewechselt. Die Inkubation erfolgte analog unseres Versuches für 72 Stunden und die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Auch hier wurde, unabhängig von der Beschichtung der Versuchsplatten, der größte proliferationsfördernde Effekt bei einer HGF-Konzentration von 25 ng/ml photometrisch gemessen.⁶⁸

Aufgrund der Ergebnisse, die durch die Versuche von Knowles et al. sowie Fleigel et al. beschrieben werden konnten, bestätigt sich die Annahme der vorliegenden Arbeit, dass die Behandlung mit HGF zu einer Proliferation der Zelllinien führt. In dieser experimentellen Arbeit ist die größte proliferationsfördernde Wirkung ebenso bei einer HGF-Konzentration von 25 ng/ml erkennbar.

Anschließend wurden die HNSCC-Zelllinien mit einer Verdünnungsreihe von Foretinib behandelt. Die Zelllinien wurden dabei nicht mit dem Wachstumsfaktor HGF stimuliert. Es ergaben sich proliferationshemmende Effekte in Abhängigkeit von der Konzentration des Wirkstoffs wie in Abbildung 5 dargestellt.

Diskussion

In einer Studie von Liu und Mitarbeitern wurden mehrere Zelllinien von Mammakarzinomen, Magenkarzinomen, HNSCC, Lungenkarzinomen sowie diverse andere Zelllinien unter anderem mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Foretinib behandelt. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf genetische Mutationen, Amplifikationen sowie Änderungen in der Expression von bestimmten Rezeptoren, unter anderem des Met-Rezeptors, gelegt.⁷⁴ Bei Zelllinien mit Met-Rezeptor-Amplifikationen, also einer Vermehrung der DNA-Abschnitte, die für den Met-Rezeptor codieren, führte Foretinib zu den größten antiproliferativen Effekten. So sind die Foretinib-IC₅₀-Konzentrationen bei den Magenkarzinom-Zelllinien MKN45, SNU5, HS746T kleiner als 0,06 µM. Im Gegensatz dazu beträgt die Foretinib-IC₅₀-Konzentration bei der HNSCC-Zelllinie SCC15 sowie bei der HNC-Zelllinie HN5, welche beide eine Met-Rezeptor-Überexpression haben, mehr als 0,6 µM.⁷⁴ Letzteres deckt sich mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen, die in Tabelle 23 aufgelistet sind. So befinden sich alle graphisch bestimmten IC₅₀-Konzentrationen im einstelligen µM-Bereich.

Eine mögliche Erklärung für die deutlichen Abweichungen der verschiedenen IC₅₀-Konzentrationen sind Unterschiede im Genom der Tumore. Met-Rezeptor-Amplifikationen sind bei HNSCC sehr selten, wohingegen bei Magen- beziehungsweise Lungenkarzinomen häufiger Met-Rezeptor-Amplifikationen nachgewiesen wurden.⁵² Diese Aussage kann durch das von Kataoka et al. erzielte Ergebnis eines in-vitro-Zellviabilitätsassays mit Foretinib bekräftigt werden. Bei den fünf verwendeten Magenkarzinomzelllinien haben zwei, MKN-45 und KATO-III, sehr gut auf Foretinib angesprochen. Die dokumentierte IC₅₀ Konzentration betrug dabei 8 nM beziehungsweise 30 nM.⁷⁵ So stehen die niedrigen IC₅₀-Konzentrationen bei Magenkarzinomzelllinien höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit den Amplifikationen im Genom der Karzinome.

5.3.2 Simultane Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib

In diesem Versuch wurden die Zellen mit HGF stimuliert und gleichzeitig mit Foretinib behandelt. Das Ziel war, den direkten Effekt von Foretinib am Met-Rezeptor zu untersuchen, indem die HGF-induzierte Proliferation gestoppt wird.

Die Zellen wurden mit 25 ng/ml HGF stimuliert, was zu einer substanziellen Proliferation führt. Die alleinige Behandlung mit Foretinib führt dazu, dass die relative Zellzahl sinkt, da diese den kompletten proliferationsfördernden Effekt des HGFs aufhebt. Dies kann den Ergebnissen des Kapitels 4.4.4 entnommen werden. Durch die Tatsache, dass es sich bei Foretinib nicht um einen selektiven Tyrosinkinase-Inhibitor handelt, wirkt das Medikament nicht nur am Met-Rezeptor wie der Wachstumsfaktor HGF, sondern entfaltet seine Wirkung zum Beispiel auch am VEGF-Rezeptor.⁷⁶ Dadurch kann Foretinib die Zelle an mehreren Stellen angreifen und somit zum Zelltod führen.

Ein ähnlicher Versuch wurde durch Liu et al. mit Nasopharynx-Zelllinien durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit 20 ng/ml HGF stimuliert und mit einem Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor PHA665752 in zwei verschiedenen Konzentrationen, 1 μ M und 2 μ M, behandelt. Die Forschungsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass durch die Stimulation mit HGF der zytotoxische Effekt des RTKI nicht aufgehoben werden kann.⁷⁷

Dieses Resultat deckt sich wiederum mit den in Abbildung 7 gezeigten Ergebnissen. Bei den Zelllinien A253, Detroit 562 und SCC25 kommt es zu einer eindeutigen Aufhebung des proliferationsfördernden Effektes von HGF durch die Behandlung mit Foretinib.

5.4 Echtzeit-PCR zum Nachweis der Genexpression nach HGF-Stimulation sowie nach Inhibition mit Foretinib

Ein besonderes Merkmal von Tumoren ist der enorme Energieverbrauch, was wiederum mit einem erhöhten Bedarf an Glukose einhergeht. So verstoffwechseln Tumore selbst unter normalen Sauerstoffverhältnissen Glukose zu Laktat, was bereits im 20. Jahrhundert durch Otto Warburg herausgefunden werden konnte und seither als Warburg-Effekt bekannt ist.⁵⁸

Anhand des durchgeführten Versuchs, bei dem acht Gene des Glukosestoffwechsels im Echtzeit-PCR-Verfahren untersucht wurden, wurde die Hypothese geprüft, ob die Stimulation der Zelllinien mit HGF oder eine Behandlung mit Foretinib zu einer verstärkten beziehungsweise verminderten Transkription von zentralen Genen des Glukose-Metabolismus führt.

Betrachtet man die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse, konnten keine signifikanten Veränderungen im mRNA-Level der unterschiedlichen Proteine erkannt werden. In den verschiedenen Zelllinien sind nur geringfügige Änderungen der untersuchten Gene auf mRNA-Ebene erkennbar.

Bei der Zelllinie A253 führt die Behandlung mit HGF über 24 Stunden zu einer leichten Reduktion der Gene für die PKM, die HK1 sowie den GLUT1.

Bei der Zelllinie Detroit 562 kommt es zu einer Herunterregulierung des Gens für den SLC16A1 sowie für das Gen der HK1 zu einer Hochregulierung bei der Inhibition mit Foretinib.

Außerdem sind substanzielle Änderungen auf mRNA-Ebene bei der Zelllinie FaDu für die HK2 nach der Behandlung mit HGF über 24 und 48 Stunden erkennbar, so wird dieses Gen nämlich leicht hochreguliert. Ebenso führt die 24-stündige Behandlung mit HGF dazu, dass das Gen des SLC16A1 substanziell leicht hochreguliert wird. Die 24-stündige Behandlung mit Foretinib führt dazu, dass die Gene der PKM1 sowie des SLC2A1 leicht herunterreguliert werden, wohingegen es zu einem substanziellen Anstieg des mRNA-Levels des MCT4 über einen 48-stündigen Zeitraum kommt.

Bei der Zelllinie SCC9 ist eine substanzielle Hochregulierung der Gene für den GLUT1 sowie den MCT1 nach der 48-stündigen Behandlung mit HGF erkennbar. Außerdem kommt

Diskussion

es bei der Zelllinie SCC9 nach 24-stündiger Inhibition mit Foretinib zu einem substanziellen Anstieg des mRNA-Levels für den MCT4.

Bei der Zelllinie SCC25 kann bei der 48-stündigen Behandlung mit HGF eine verminderte Expression des Gens für PDK2 gemessen werden, des Weiteren kommt es durch die 24-stündige Behandlung mit Foretinib führt zu einer verstärkten Expression des Gens für den MCT4.

Kumar und Mitarbeiter konnten in einer experimentellen Arbeit herausfinden, dass HGF die Induktion der Hexokinase 2 auf der Proteinebene bewirkt.⁷⁸

In der vorliegenden experimentellen Arbeit konnte allerdings keine so deutliche Beeinflussung der Hexokinase 2 durch HGF gezeigt werden, dennoch sind ähnliche Ergebnisse erkennbar, wie sich bei der Zelllinie FaDu zeigt (siehe Abbildung 10).

Die Volatilität der Veränderungen auf mRNA-Ebene der untersuchten Gene aufgrund der unterschiedlichen Stimulationen lässt auf die Komplexität der Regulierung des Glukosemetabolismus schließen. Des Weiteren könnten die Konditionen, der Zeitpunkt und nicht zuletzt auch Ungenauigkeiten im Ablauf der PCR dazu beigetragen haben, dass die Ergebnisse nicht in derselben Signifikanz erzielt werden konnten wie bei Kumar et. al.

Im Signalweg des Met-Rezeptors führen verschiedenste Kaskaden, unter anderem die Ras-Raf-Map-, STAT3-, PI3K-Kaskaden⁷⁹, zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern, welche wiederum alle Auswirkungen auf die Transkription von Proteinen haben.

De Rosa und Mitarbeiter haben drei NSCLC-Zelllinien mit zwei EGFR-Inhibitoren sowie einem Met-Inhibitor PHA-665752 behandelt. Die Zelllinien HCC827 und H1993 wurden mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor PHA-665752 behandelt und unter anderem die Proteinlevel der Enzyme HK1, HK2, PKM1 und PKM2 sowie der GLUT1 und GLUT3 untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass es bei der Zelllinie HCC827 unter Inhibition des Met-Rezeptors keine Veränderungen im Protein-Level der HK1, HK2, PKM1, PKM2 und GLUT1 gab. Bei der Zelllinie H1993 kam es zu einer Verminderung auf der HK2-Protein-Ebene und die Wirksamkeit des Met-Rezeptor-Inhibitors korreliert mit der genetischen Veränderung der Zelllinie, da diese Met-Amplifikationen aufweist.⁶⁶

Diskussion

Die Zelllinie HCC827, die im Vergleich zu H1993 keine Met-Rezeptor-Amplifikationen enthält, exprimiert große Mengen des Met-Rezeptors an der Zelloberfläche und ähnelt dadurch den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien in diesem Punkt, der die Wirksamkeit von gegen den Met-Rezeptor gerichteten Medikamenten beeinflusst.^{66, 80} Die Zelllinien SCC9 und SCC25 weisen, wie Seiwert et al. zeigten, keine Met-Rezeptor-Amplifikationen auf.⁵² Da aus der Literatur für Kopf-Hals-Karzinome niedrige Frequenzen für Met-Amplifikationen beschrieben sind, ist auch bei den anderen drei Zelllinien davon auszugehen, dass keine Met-Rezeptor-Amplifikationen vorliegen.⁵² Das Western-Blot-Ergebnis der Zelllinie HCC827 ähnelt insofern den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit, da es trotz der Behandlung mit Rezeptorinhibitoren zu keinen signifikanten Änderungen kommt. Somit ist auch bei den in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien davon auszugehen, dass Effekte auf mRNA-Ebene, der untersuchten Proteine des Glukose-Metabolismus, von den genetischen Eigenschaften abhängig sind.

5.5 FACS zum Nachweis von GLUT1 auf den Zelllinien

Um dem erhöhten Bedarf an Energie gerecht zu werden, benötigen die Zellen Glukose-Transporter. In diesem Versuch lag der Fokus dabei auf dem Glukose-Transporter 1, da dieser ubiquitär vorhanden und außerdem für die basale Glukose-Aufnahme verantwortlich ist. Die fünf Zelllinien wurden mit dem Wachstumsfaktor HGF und dem Tyrosinkinase-Inhibitor Foretinib behandelt, um anschließend im FACS auf eine vermehrte beziehungsweise verminderte Plasmamembranlokalisation des GLUT1 untersucht zu werden.

Die beiden aufgestellten Hypothesen, dass die Stimulation mit HGF zu einer vergrößerten Menge von GLUT1 in der Membran führt, und zum anderen, dass die Hemmung des Met-Rezeptors zu einer dementsprechend geringeren Menge an GLUT1 führt, stützen sich auf die Erkenntnisse unterschiedlicher Studien.

Perdomo et al. haben aufgezeigt, dass die Stimulation mit HGF zu einem substantiellen Anstieg des Glukose-Transports und des Glukose-Stoffwechsels in den Skelettmuskelzellen der Wadenmuskulatur bei Mäusen führt. Die Forschungsgruppe konnte des Weiteren herausfinden, dass die Stimulation mit 25 ng/ml HGF über einen Zeitraum von einer Stunde zu keinem signifikanten Anstieg des Glukose-Transporters 1 in der Plasmamembran von Myotuben der Ratten führt. Nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden kann ein leichter Anstieg des GLUT1 in der Membran beobachtet werden. Auch kommt es zu einem generellen Anstieg der Proteinmenge des GLUT1 bei einer chronischen Behandlung mit HGF.⁶⁷ Ebenso untersuchte die Forschungsgruppe den Glukosetransporter GLUT4, bei dem es unabhängig von der Dauer der Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der Menge des Transporters in der Membran kam.

Kumar et al. konnten in einer Studie aus dem Jahr 2018 den Zusammenhang zwischen Tumor-assoziierten Fibroblasten und HNSCC-Zelllinien bezüglich der Glykolyse belegen. Das sezernierte HGF der Tumor-assoziierten Fibroblasten führt in den HNSCC zu einer gesteigerten glykolytischen Aktivität. Des Weiteren konnte in der Studie nachgewiesen werden, dass es durch die Behandlung der HNSCC-Zelllinien mit dem konditionierten Medium der Tumor-assoziierten Fibroblasten zu einer verstärkten Proteinexpression der Hexokinase 2, eines der Schlüsselenzyme der Glykolyse, kommt. Die gleichzeitige Inhibition des Met-Rezeptors mit dem Wirkstoff Crizotinib führt zu einer geringeren Expression

desselben Proteins. In der Studie wurde allerdings nicht die Expression beziehungsweise die Plasmamembranmenge des GLUT1 untersucht.⁷⁸

Die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Stimulation mit HGF in der Gesamtheit der Resultate nicht zu einem Anstieg der Plasmamembranlokalisation des GLUT1 führt. Bei den Zelllinien Detroit 562, SCC9 sowie SCC25 kommt es zu keiner wesentlichen Änderung, während bei der Zelllinie FaDu die Stimulation über 24 Stunden zu einem Absinken der Menge des GLUT1 führt (siehe Abbildung 13). Bei der Zelllinie A253 kommt es durch eine HGF-Stimulation über 24 und 48 Stunden zu einer verminderten Plasmamembranlokalisation des GLUT1.

Es ist davon auszugehen, dass die gesteigerte glykolytische Aktivität auf anderen Ebenen stattfindet, zum Beispiel auf der Ebene der Enzyme, wie Kumar et al. herausfinden konnten.

Beim zweiten Teil der FACS-Analyse wurden die Tumorzellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Foretinib behandelt und daraufhin auf die Plasmamembranlokalisation des GLUT1 analysiert.

Die Hypothese, dass die Inhibition des Met-Rezeptors zu einer verminderten Plasmamembranlokalisation des GLUT1 führt, stützt sich ebenso auf Ergebnisse anderer Studien. Kumar et al. haben zu den oben genannten Erkenntnissen zusätzlich herausgefunden, dass die glykolytische Aktivität der HNSCC-Zelllinien durch eine Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Crizotinib sinkt.

Die Ergebnisse der vorliegenden FACS-Analyse aus Kapitel 4.6 Abbildung 13 zeigen, dass es bei der Behandlung der fünf Zelllinien mit dem Medikament Foretinib in der Gesamtheit tendenziell zu einer Zunahme der Plasmamembranlokalisation des GLUT1 kommt. Abbildung 14 und Abbildung 15 kann entnommen werden, dass nach der 24-stündigen Inhibition noch keine nennenswerten Unterschiede in der Menge des GLUT1 erkennbar sind. Nach der 48-stündigen Behandlung mit Foretinib kommt es allerdings zu einer Zunahme der Transportermenge in der Zellmembran. Die beiden Zelllinien FaDu und Detroit 562 weisen eine geringe Zunahme auf, während es bei der Zelllinie A253 zu einer mehr

als doppelt so großen Menge kommt, wie in Abbildung 16 und Abbildung 17 dargestellt ist.

In einer Studie von Hudson et al. wurden Zelllinien von Pankreas-Adenokarzinomzellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Axitinib, welches gegen den VEGF-Rezeptor gerichtet ist, behandelt und daraufhin deren Glukose-Metabolismus erforscht. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Medikament Foretinib wirkt unter anderem auch am VEGF-Rezeptor, allerdings ist Axitinib ausschließlich gegen VEGFR gerichtet.

Auch diese Forschungsgruppe ging der Hypothese nach, dass eine Blockade wichtiger Signalkaskaden mit Tyrosinkinase-Inhibitoren zu einer verminderten Glukoseaufnahme der Tumorzellen führt. In der genannten Studie wurden die Zelllinien mit dem Medikament Axitinib in verschiedenen Konzentrationen behandelt und daraufhin deren Glukoseaufnahme untersucht.

Entgegen der Erwartung stieg die Glukoseaufnahme der Zellen bei Behandlung mit dem Inhibitor. In weiteren Versuchen konnte die Forschungsgruppe mit der FACS-Analyse herausfinden, dass sich bei der Behandlung mit Axitinib eine Zunahme der Plasmamembranlokalisation des Glukose-Transporters 1 in Abhängigkeit von der Konzentration des Medikaments ergab.

Allerdings kam es durch die Behandlung mit Axitinib zu keiner deutlichen Veränderung auf der mRNA-Ebene sowie auf der Protein-Ebene des GLUT1.

Dies deckt sich unter anderem mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Eine Erklärung für das vermehrte Auftreten von GLUT1 bei den HNSCC-Zelllinien könnten ebenfalls, wie bei den Zelllinien des Pankreas-Adenokarzinoms, Resistenzmechanismen gegenüber dem RTKI sein, da selbst bei hohen Konzentrationen Pankreas-Adenokarzinomzelllinien überlebt haben.⁸¹

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HNSCC-Zelllinien, die im direkten Vergleich resistenter als die Magenkarzinom-Zelllinien sind, wurden ebenfalls mit Konzentrationen im μM -Bereich behandelt. Neben der ohnehin schlechten Wirksamkeit des Medikaments Foretinib bei HNSCC-Zelllinien könnte das vermehrte Auftreten von GLUT1 in der Zellmembran dieser Zellen bei der Behandlung mit Foretinib ein weiterer Grund für die schlechtere Wirksamkeit sein.

6 Zusammenfassung

Die Versuche der vorliegenden experimentellen Studie wurden unter sterilen Bedingungen im S1-Labor der Universitätsklinik Würzburg, Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie durchgeführt. Es wurden hierbei fünf etablierte Tumorzelllinien des Kopf- und Halsbereichs untersucht.

Zu Beginn der Studie wurden die Zelllinien auf das Vorkommen des Met-Rezeptors untersucht, der auf allen fünf Zelllinien in unterschiedlich starkem Ausmaß nachgewiesen werden konnte. Ebenso wurde der Hypothese, dass die Zelllinien selbst kein HGF sekretieren können, nachgegangen. Anhand der erzielten Ergebnisse bestätigte sich diese Annahme. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss des Wachstumsfaktors HGF sowie des Tyrosinkinase-Inhibitors Foretinib analysiert. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Zusammenhang zwischen dem Signalweg des Met-Rezeptors und dem Glukose-Metabolismus gelegt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit HGF eine proliferationsfördernde Wirkung auf die Zelllinien hat. Es konnte auch festgestellt werden, dass es durch die Inhibition des Met-Rezeptors durch den RTKI Foretinib zu einer Abnahme der relativen Zellzahl kommt. Aufgrund der Tatsache, dass die HNSCC-Zelllinien keine Met-Rezeptor-Amplifikationen aufweisen, ist deren Responsivität für Foretinib deutlich geringer als die anderer Tumorentitäten (zum Beispiel Magenkarzinome). Des Weiteren konnte der proliferationsfördernde Effekt von HGFs durch die Behandlung mit Foretinib komplett aufgehoben werden.

Bei der Untersuchung, inwiefern sich die Behandlung der HNSCC-Zelllinien auf deren Glukose-Metabolismus auswirkt, wurden die Zellen mit HGF stimuliert beziehungsweise mit Foretinib inhibiert. In der Echtzeit-PCR wurden acht Gene untersucht. Hierbei konnten zelllinienübergreifend keine signifikanten Änderungen in der Expression der untersuchten Gene herausgefunden werden.

Bei der Analyse der Plasmamembranlokalisation des Glukose-Transporters 1 konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation mit HGF keine wesentlichen Änderungen in der Menge von GLUT1 auf der Zelloberfläche stattfinden. Bei der Inhibition mit Foretinib

Zusammenfassung

kommt es hingegen in der Gesamtheit der Ergebnisse tendenziell zu einer Zunahme der Glukose-Transporter1-Menge in der Zellmembran, was wiederum für Resistenzmechanismen verantwortlich sein könnte.

7 Literaturverzeichnis

1. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:49-70.
2. Blaszcak W, Barczak W, Wegner A, et al. Clinical value of monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Med Oncol.* 2017;34(4):60.
3. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(4):489-501.
4. Robert-Koch-Institut. Krebsgeschehen 2016. 2016.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.
6. Jemal A, Siegel RL, Ward E. Cancer statistics 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006;56:106-130.
7. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol.* 2013;31(36):4550-4559.
8. Kim L, King T, Agulnik M. Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology and Public Health Implications. *Cancer Network.* 2010;24(10):915-919.
9. Zaravinos A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget.* 2014;5(12):3956-3969.
10. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, et al. Head and neck cancer. *The Lancet.* 2008;371(9625):1695-1709.
11. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2004;108(5):741-749.
12. Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.* 2010;39(1):182-196.

Literaturverzeichnis

13. Zhang Z, Morgenstern H, Spitz M, et al. Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(10):1043-1049.
14. Gillison ML. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck.* 2007;29(8):779-792.
15. Ragin C, Modugno F, Gollin S. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res.* 2007;86(2):104-114.
16. Zhou J, Michaud DS, Langevin SM, et al. Smokeless tobacco and risk of head and neck cancer: evidence from a case-control study in New England. *Int J Cancer.* 2013;132(8):1911-1917.
17. Wyss AB, Hashibe M, Lee YA, et al. Smokeless Tobacco Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis of US Studies in the INHANCE Consortium. *Am J Epidemiol.* 2016;184(10):703-716.
18. Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, et al. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer.* 2003;105(5):681-686.
19. Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, et al. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(6):1061-1077.
20. Munoz N, Bosch F, de Sanjose S, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-527.
21. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. 1998;338(7):423-428.
22. Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, et al. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(1):57-81.

Literaturverzeichnis

23. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. 1983;12(6):418-424.
24. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, et al. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):612-619.
25. Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, et al. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*. 2005;125(12):1327-1336.
26. Randhawa T, Shameena PM, Sudha S, et al. Squamous cell carcinoma of tongue in a 19-year-old female. *Indian Journal of Cancer*. 2008;5(3):128-130.
27. Chuang SC, Jenab M, Heck JE, et al. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Causes Control*. 2012;23(1):69-88.
28. Rao LP, Das SR, Mathews A, et al. Mandibular invasion in oral squamous cell carcinoma: investigation by clinical examination and orthopantomogram. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(5):454-457.
29. Imaizumi A, Yoshino N, Yamada I, et al. A potential pitfall of MR imaging for assessing mandibular invasion of squamous cell carcinoma in the oral cavity. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006;27(1):114-122.
30. DGMKG. S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom 2012.
31. Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 1990;66(1):109-113.
32. Mehanna H, McConkey CC, Rahman JK, et al. PET-NECK: a multicentre randomised Phase III non-inferiority trial comparing a positron emission tomography-computerised tomography-guided watch-and-wait policy with planned neck dissection in the management of locally advanced (N2/N3) nodal metastases in patients with squamous cell head and neck cancer. *Health Technol Assess*. 2017;21(17):1-122.

Literaturverzeichnis

33. Huang J, Barbera L, Brouwers M, et al. Does delay in starting treatment affect the outcomes of radiotherapy? A systematic review. *J Clin Oncol*. 2003;21(3):555-563.
34. Lavaf A, Genden EM, Cesaretti JA, et al. Adjuvant radiotherapy improves overall survival for patients with lymph node-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2008;112(3):535-543.
35. Monnier L, Touboul E, Durdux C, et al. Hypofractionated palliative radiotherapy for advanced head and neck cancer: the IHF2SQ regimen. *Head Neck*. 2013;35(12):1683-1688.
36. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *The Lancet*. 2006;368(9538):843-854.
37. Furness S, Glenny AM, Worthington HV, et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(4):CD006386.
38. Ma† J, Liu† Y, Yang X, et al. Induction chemotherapy in patients with resectable head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*. 2013;11:67.
39. Budach W, Bölke E, Kammers K, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials. *Radiotherapy and Oncology*. 2016;118(2):238-243.
40. Bourhis J, Amand C, Pignon J. Update of MACH-NC (Meta-Analysis of Chemotherapy in Head & Neck Cancer) database focused on concomitant chemoradiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(14):5505-5505.
41. Saleh K, Eid R, Haddad FG, et al. New developments in the management of head and neck cancer - impact of pembrolizumab. *Ther Clin Risk Manag*. 2018;14:295-303.
42. Moskovitz J, Moy J, Ferris RL. Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Oncol Rep*. 2018;20(2):22.

Literaturverzeichnis

43. Wheeler S, Siwak DR, Chai R, et al. Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(8):2278-2289.
44. Martinelli E, De Palma R, Orditura M, et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol.* 2009;158(1):1-9.
45. Markovic A, Chung CH. Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012;12(9):1149-1159.
46. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2008;359:1116-1127.
47. Madoz-Gurpide J, Zazo S, Chamizo C, et al. Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *J Transl Med.* 2015;13:282.
48. Organ SL, Tsao M-S. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3(1):S7-S19.
49. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, et al. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(12):915-925.
50. Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(1):85-94.
51. Choe JY, Yun JY, Nam SJ, et al. Expression of c-Met Is Different along the Location and Associated with Lymph Node Metastasis of Head and Neck Carcinoma. *Korean J Pathol.* 2012;46(6):515-522.
52. Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, et al. The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2009;69(7):3021-3031.

Literaturverzeichnis

53. Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, et al. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene*. 2000;19(12):1547-1555.
54. Aebbersold DM, Landt O, Berthou S, et al. Prevalence and clinical impact of Met Y1253D-activating point mutation in radiotherapy-treated squamous cell cancer of the oropharynx. *Oncogene*. 2003;22(52):8519-8523.
55. Lacroix L, Post SF, Valent A, et al. MET genetic abnormalities unreliable for patient selection for therapeutic intervention in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(1):e84319.
56. Zhang YW, Graveel C, Shinomiya N, et al. Met decoys: will cancer take the bait? *Cancer Cell*. 2004;6(1):5-6.
57. Gozdzik-Spychalska J, Szyszka-Barth K, Szychalski L, et al. C-MET inhibitors in the treatment of lung cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2014;15(4):670-682.
58. Warburg O WF, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol*. 1926;8(6):519-530.
59. Mellanen P, Minn H, Grénman., et al. Expression of glucose transporters in head and neck tumors. *Int J Cancer*. 1994;56(5):622-629.
60. Chandan VS, Faquin WC, Wilbur DC, et al. The utility of GLUT-1 immunolocalization in cell blocks: An adjunct to the fine needle aspiration diagnosis of cystic squamous lesions of the head and neck. *Cancer*. 2006;108(2):124-128.
61. Kunkel M, Reichert TE, Benz P, et al. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2003;97(4):1015-1024.
62. Eckert AW, Lautner MH, Schutze A, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology*. 2011;58(7):1136-1147.

Literaturverzeichnis

63. Kang SS, Chun YK, Hur MH, et al. Clinical Significance of Glucose Transporter 1 (GLUT1) Expression in Human Breast Carcinoma. *Japanese Journal of Cancer Research*. 2002;93(10):1123-1128.
64. Kurata T, Oguri T, Isobe T, et al. Differential expression of facilitative glucose transporter (GLUT) genes in primary lung cancers and their liver metastases. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90(11):1238-1243.
65. Li SJ, Guo W, Ren GX, et al. Expression of Glut-1 in primary and recurrent head and neck squamous cell carcinomas, and compared with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose accumulation in positron emission tomography. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008;46(3):180-186.
66. De Rosa V, Iommelli F, Monti M, et al. Reversal of Warburg Effect and Reactivation of Oxidative Phosphorylation by Differential Inhibition of EGFR Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(22):5110-5120.
67. Perdomo G, Martinez-Brocca MA, Bhatt BA, et al. Hepatocyte growth factor is a novel stimulator of glucose uptake and metabolism in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2008;283(20):13700-13706.
68. Fleigel J, Sedwick J, Kornberg LJ. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates mitogenesis and migration of a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;127(4):271-278.
69. Kim CH, Moon SK, Bae JH, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2006;126(1):88-94.
70. Lo Muzio L, Leonardi R, Mignogna MD, et al. Scatter factor receptor (c-Met) as possible prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2004;24(2C):1063-1069.
71. Yucel OT, Sungur A, Kaya S. c-met overexpression in supraglottic laryngeal squamous cell carcinoma and its relation to lymph node metastases. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130(6):698-703.

Literaturverzeichnis

72. Galeazzi E, Olivero M, Gervasio FC, et al. Detection of MET oncogene/hepatocyte growth factor receptor in lymph node metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997;254(Suppl. 1):S138-S143.
73. Knowles LM, Stabile LP, Egloff AM, et al. HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(11):3740-3750.
74. Liu L, Shi H, Liu Y, et al. Synergistic effects of foretinib with HER-targeted agents in MET and HER1- or HER2-coactivated tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(3):518-530.
75. Kataoka Y, Mukohara T, Tomioka H, et al. Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks. *Invest New Drugs.* 2012;30(4):1352-1360.
76. Dufies M, Jacquel A, Robert G, et al. Mechanism of action of the multikinase inhibitor Foretinib. *Cell Cycle.* 2011;10(23):4138-4148.
77. Liu T, Li Q, Sun Q, et al. Met inhibitor suppresses the HGF-induced cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014;449(1):49-54.
78. Kumar D, New J, Vishwakarma V, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Drive Glycolysis in a Targetable Signaling Loop Implicated in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression. *Cancer Res.* 2018;78(14):3769-3782.
79. Hong SY, Yu FX, Luo Y, et al. Oncogenic activation of the PI3K/Akt pathway promotes cellular glucose uptake by downregulating the expression of thioredoxin-interacting protein. *Cell Signal.* 2016;28(5):377-383.
80. Kubo T, Yamamoto H, Lockwood WW, et al. MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer.* 2009;124(8):1778-1784.
81. Hudson CD, Hagemann T, Mather SJ, et al. Resistance to the tyrosine kinase inhibitor axitinib is associated with increased glucose metabolism in pancreatic adenocarcinoma. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1160.

Abbildungsverzeichnis

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Signalwege der ErbB-Familie (Quelle: AACR).....	11
Abbildung 2: Molekularer Signalweg des Met-Rezeptors (Quelle: AACR)	14
Abbildung 3: Darstellung der Histogramme zum Nachweis des Met-Rezeptors auf den Zelllinien.	38
Abbildung 4: T-Test der Stimulation mit humanem HGF der Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25	42
Abbildung 5: Zellviabilitätsassays der Zelllinien mit Foretinib	44
Abbildung 6: T-Test der Monotherapie mit Foretinib bei den Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25	46
Abbildung 7: Simultane Stimulation mit HGF und Inhibition mit Foretinib.....	49
Abbildung 8: PCR der Zelllinie A253.....	52
Abbildung 9: PCR der Zelllinie Detroit 562.....	53
Abbildung 10: PCR der Zelllinie FaDu.....	54
Abbildung 11: PCR der Zelllinie SCC9.....	55
Abbildung 12: PCR der Zelllinie SCC25.....	56
Abbildung 13: Relative Anzahl des GLUT1 bei den Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25.....	59
Abbildung 14: Darstellung der FACS-Ergebnisse aus der 24-stündigen Behandlung der Zelllinien FaDu und Detroit 562	60
Abbildung 15: Darstellung der FACS-Ergebnisse nach der 24-stündigen Behandlung der Zelllinien A253, SCC9 und SCC25	61
Abbildung 16: Darstellung der FACS-Ergebnisse aus der 48-stündigen Behandlung der Zelllinien FaDu und Detroit 562	62
Abbildung 17: Darstellung der FACS-Ergebnisse aus der 48-stündigen Behandlung der Zelllinien A253, SCC9 und SCC25	63

Abbildungsverzeichnis

8.1 Literaturverzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: (Mit Erlaubnis des Rechteinhabers) Reprinted from Clinical Cancer Research; 2006; 12/18; 5269; Maurizio Scaltriti and Jose Baselga; „The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy“, with permission from AACR.

Abbildung 2: (Mit Erlaubnis des Rechteinhabers) Reprinted from Clinical Cancer Research; 2016; 22/16; 4006; Stefan Hartmann, Neil E. Bholra and Jennifer R. Grandis; „HGF/Met Signaling in Head and Neck Cancer: Impact on the Tumor Microenvironment“, with permission from AACR.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HNSCC-Zelllinien. Lokalisation und Art der vier HNSCC-Zelllinien sowie der Epidermoidkarzinom-Zelllinie A253, die in der Forschungsarbeit verwendet wurden.	19
Tabelle 2: Auflistung der benötigten Kulturmedien.....	19
Tabelle 3: Auflistung der benötigten Medienzusätze	20
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	20
Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten gebrauchsfertigen Kits.....	21
Tabelle 6: Liste der verwendeten Medikamente	21
Tabelle 7: Verwendeter Wachstumsfaktor HGF	21
Tabelle 8: Auflistung der eingesetzten Primer.....	22
Tabelle 9: Liste der verwendeten Chemikalien.....	22
Tabelle 10: Kristallviolettlösung.....	22
Tabelle 11: Auflistung der eingesetzten Geräte	22
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Produktionsnummer, Hersteller und Herkunft.....	24
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Computerprogramme.....	26
Tabelle 14: Zelllinien, Splittungsverhältnis, Medien und Mediumszusätze	27
Tabelle 15: Well-Belegungsplan (Stimulation mit HGF).....	30
Tabelle 16: Well-Belegungsplan (Monotherapie Foretinib).....	31
Tabelle 17: Well-Belegungsplan (Stimulations- und Inhibitionsversuch).....	32
Tabelle 18: PCR-Schema	34
Tabelle 19: Auflistung der Primer und Proteine, für welche die verschiedenen Gene codieren, sowie deren Aufgabe.....	34
Tabelle 20: Darstellung der Mean-Werte bei den fünf Zelllinien und der Menge des Met-Rezeptors, die sich im Durchschnitt auf jeder Zelllinie befindet (siehe Abbildung 3).....	37
Tabelle 21: Konzentration des endogen produzierten HGFs bei den fünf Zelllinien.....	39
Tabelle 22: Ausmaß der HGF-induzierten Zunahme der Zellen in Prozent bei den fünf Zelllinien A253, Detroit 562, FaDu, SCC9, SCC25.	41
Tabelle 23: IC50-Konzentration Monotherapie mit Foretinib (graphisch bestimmt aus allen Kurven)	45
Tabelle 24: Relative Zellzahl sowie Foretinib-Konzentration bei maximaler Inhibition	45

10 Abkürzungsverzeichnis

μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
ACTB	Actin Beta
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AREG	Amphiregulin
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	complementary DNA
Cn I	boviner Kollagentyp I
Cn IV	boviner Kollagentyp IV
ct	cycle threshold
CT	Computertomographie
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor-Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
Erk1	Extracellular Signal-regulated Kinase 1
Erk2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 2
FACS	Fluoreszenz-activated Cell Sorting
Fn	Fibronectin
Fore	Foretinib
GAB1	GRB2-assoziierte Bindeprotein
GLUT	Glukose-Transporter
GRB2	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
HER1	Human Epidermal Growth Factor Receptor 1
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HER3	Human Epidermal Growth Factor Receptor 3
HER4	Human Epidermal Growth Factor Receptor 4
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGFR	Hepatocyte Growth Factor-Receptor
HK1	Hexokinase 1
HNC	Head and neck cancer
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Abkürzungsverzeichnis

<i>HPV</i>	<i>Humane Papillomaviren</i>
<i>Ig</i>	<i>Immunglobulin</i>
<i>kDa</i>	<i>kilo Dalton</i>
<i>Ln</i>	<i>Murinlaminin</i>
<i>mAb</i>	<i>monoklonale Antikörper</i>
<i>MAP</i>	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
<i>Met-Rezeptor</i>	<i>Mesenchymal epithelial transition-Rezeptor</i>
<i>ml</i>	<i>Milliliter</i>
<i>mRNA</i>	<i>messenger RNA</i>
<i>MRT</i>	<i>Magnetresonanztomographie</i>
<i>NH₂</i>	<i>Aminogruppe</i>
<i>nm</i>	<i>Nanometer</i>
<i>OPG</i>	<i>Orthopantomogramm</i>
<i>P/S</i>	<i>Penicillin/Streptomycin</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PDK2</i>	<i>Pyruvat Dehydrogenase Kinase 2</i>
<i>PE</i>	<i>Phycoerythrin</i>
<i>PI3K</i>	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
<i>PKM</i>	<i>Pyruvat-Kinase</i>
<i>PLCy</i>	<i>Phospholipase Cy</i>
<i>pRb</i>	<i>Retinoblastom-Protein</i>
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i>
<i>RTKI</i>	<i>Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor</i>
<i>SCC</i>	<i>Squamous Cell Carcinoma</i>
<i>SGLT</i>	<i>Sodium dependent glucose transporter</i>
<i>SHC</i>	<i>Src Homology-2-containing</i>
<i>SLC16A1</i>	<i>Solute carrier family 16 member 1</i>
<i>SLC16A4</i>	<i>Solute carrier family 16 member 4</i>
<i>SLC2A1</i>	<i>Solute carrier family 2 member 1</i>
<i>SOS</i>	<i>Son of Sevenless</i>
<i>STAT3</i>	<i>Transcription Factor Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
<i>TME</i>	<i>Tumor-Micro-Environment</i>
<i>UICC</i>	<i>Union internationale contre le cancer</i>
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

11 Veröffentlichungen

Teile der Arbeit befinden sich derzeit im Begutachtungsverfahren einer Publikation mit dem Titel "HGF-induced glycolytic reprogramming in HNSCC depends on Met receptor level".

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Axel Seher, Leiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, der immer ein offenes Ohr hatte und stets Fragen rund um die Experimente ausführlichst beantwortete.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Urs Müller-Richter, Leitender Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, für die Erstellung des Referats danken.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhauf, Direktor der Poliklinik für Parodontologie der Universität Würzburg, für die Erstellung des Koreferats.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Joachim Nickel, Leiter des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, sowie seinem ganzen Team danken, dass ich immer das FACS-Gerät benutzen konnte.

Ebenso gilt Margit Schleyer mein Dank für die außergewöhnliche Hilfe im wissenschaftlichen Labor. Außerdem möchte ich mich bei Mario Scheurer, Nicola Klenk und Valentin Steinacker für interessante, lustige und aufschlussreiche Gespräche und sowie eine „helpende Hand“ bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Betreuer Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Stefan Hartmann, Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, für die Idee und die entschlossene und ausdauernde Unterstützung.

