

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

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

**DIE WIRKSAMKEIT VON CISPLATIN UND 5-FLUORURACIL IM ORALEN
PLATTENEPIHELKARZINOM IN ABHÄNGIGKEIT VON MAGE-
TUMORANTIGEN-EXPRESSION MIT BESONDEREM FOKUS AUF
MAGE-A11**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Leonie Zwick

aus Schwäbisch Gmünd

Schwäbisch Gmünd, März 2021

Referent/Referentin: Priv.-Doz. Dr. Dr. Stefan Hartmann

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. Stephan Hackenberg

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

20.12.2021

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner kleinen Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Kopf-Hals-Karzinome	1
Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome	1
Risikofaktoren	2
Präkanzerosen	3
TNM-Klassifikation, Stadien-Einteilung und Diagnostik.....	4
Therapie	5
1.2 MAGE-Tumorantigene	7
2 Ziele der Arbeit	9
3 Material	10
3.1 Zelllinien	10
3.2 Puffer, Medien und Reagenzien	10
3.3 Commercial Kits	12
3.4 qPCR-Primer	13
3.5 Antikörper Westernblot.....	13
3.6 Geräte	13
3.7 Verbrauchsmaterialien	15
3.8 Software	15
4 Methoden	17
4.1 Zellkulturelle Methoden	17
Zelllinien	17
Medien	17
Zellpflege und Zellernte	17
Zellzählung	18
4.2 Inhibitionsversuche.....	19
Aussaat der Zellen	19
Inhibition	19

Kristallviolett-Assay	20
4.3 qPCR	21
RNA-Isolierung	21
cDNA-Herstellung.....	22
Quantifizierung mit qPCR.....	23
4.4 Westernblot	23
Lysatgenerierung.....	23
Verwendete Puffer	24
Verwendete Gele	25
Gelelektrophorese.....	25
4.5 Klonierung.....	26
Plasmide	26
Amplifikation des Inserts, Verdau und Aufreinigung der DNA	27
Ligation.....	29
Transformation.....	30
Isolierung des Plasmids	31
4.6 Transfektion	31
5 Ergebnisse	33
5.1 MAGE-A-Expressionsprofile	33
SCC9 - MAGE-A-Expressionsprofil	33
SCC25 - MAGE-A Expressionsprofil	34
Detroit562 - MAGE-A Expressionsprofil.....	36
FaDu - MAGE-A Expressionsprofil	37
5.2 Wirksamkeit von Chemotherapeutika	41
Wirksamkeit von Cisplatin.....	41
Wirksamkeit von 5-Fluoruracil	43
5.4 Korrelationsanalyse	44
5.5 Wirksamkeit von Cisplatin und 5-FU auf FaDu nach MAGE-A11-Überexpression	47
Nachweis der MAGE-A11 Überexpression in FaDu+	47
Auswirkungen der MAGE-A11-Überexpression auf die Zellproliferation in FaDu...	49
Wirksamkeit von Cisplatin auf FaDu+ (mit Überexpression von MAGE-A11)	51

Wirksamkeit von 5-Fluoruracil auf FaDu+ (mit Überexpression von MAGE-A11)...	52
6 Diskussion	54
6.1 MAGE-A-Expressionsprofile	54
6.2 Zusammenhang zwischen MAGE-A-Expression und Cisplatin- und 5-Fluoruracil- Wirksamkeit	55
6.3 Klonierung.....	57
6.4 MAGE-A11-Überexpression und dessen Einfluss auf die Zellproliferation	58
7 Zusammenfassung	62
8 Abkürzungsverzeichnis	64
9 Literaturverzeichnis	66
10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	76
10.1 Abbildungsverzeichnis	76
10.2 Tabellenverzeichnis.....	77
11 Publikationen	
Danksagung	
Lebenslauf.....	

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab publiziert:

MAGE-A11 expression contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer.

Hartmann S, Zwick L, Scheurer MJJ, Fuchs AR, Brands RC, Seher A, et al. Clin Oral Investig. 2018;22(3).

Melanoma-associated antigen A11 reduces erlotinib and afatinib efficacy in head and neck cancer. Hartmann S, Zwick L, Maurus K, Fuchs AR, Brands RC, Seher A, et al. J

Cranio-Maxillofacial Surg. 2018;46(3).

1 Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Karzinome

Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome

Die heterogene Gruppe der Kopf-Hals-Karzinome fasst Karzinome der Mundhöhle, des Rachens, der Speicheldrüsen, des Larynx sowie der Lippen zusammen. Histologisch handelt es sich dabei größtenteils um Plattenepithelkarzinome. Des Weiteren treten Adenokarzinome, lymphoepitheliale Karzinome und Lymphome auf.

Die weltweite Inzidenz betrug 2012 ca. 600.000, wobei allein 300.400 Neuerkrankungen auf Karzinome der Mundhöhle und Lippen zurückzuführen waren¹. Laut dem vom Robert-Koch-Institut verfassten „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016“ lag die Inzidenz für Kopf-Hals-Karzinome 2012 in Deutschland bei 12.992 (Männer), beziehungsweise 4.532 (Frauen). Das relative 5-Jahres-Überleben lag für Männer bei 61 %, für Frauen bei 51 %. Nach 10 Jahren lebten noch 39 % der Männer und 50 % der Frauen. Die absolute Zahl an Sterbefällen betrug im Jahr 2013 5.494 (Männer) und 1.700 (Frauen). Männer und Frauen unterschieden sich zudem im Erkrankungsalter: Männer erkrankten durchschnittlich mit 63,8, Frauen mit 66,2 Jahren².

Obwohl in den letzten Jahrzehnten bei Männern in Mittel- und Westeuropa ein leichter Rückgang der Neuerkrankungen beobachtet werden konnte, kam es bei Frauen zu einem Anstieg der Fallzahlen³. Beispielsweise nahm die Inzidenz der Kopf-Hals-Tumore in Rheinland-Pfalz im Zeitraum von 2000 bis 2009 bei Frauen um 2,2 % zu, davon 2,7 % bei Karzinomen der Mundhöhle und 3,6 % bei Karzinomen des Oropharynx, unter Männern war im gleichen Zeitraum ein Gesamtrückgang von - 0,9 % zu verzeichnen⁴. In derselben Studie beschrieben die Autoren BAYER ET AL. bei beiden Geschlechtern eine Zunahme an HPV-assoziierten Tumoren. Demnach stieg die Inzidenz bei den Männern hier um 3,3 %, bei den Frauen um 4,3 %⁴. Dieses Ergebnis deckt sich mit einem internationalen Trend, wonach trotz insgesamt abnehmender Zahlen an Neuerkrankungen, steigende Erkrankungszahlen bei HPV-assoziierten Tumoren beobachtet werden⁵.

Risikofaktoren

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren sind Tabak- und Alkoholkonsum sowie die Infektion mit humanen Papilloma-Viren (HPV). Abhängig von der Tumor-Lokalisation gibt es unterschiedliche Entstehungsursachen: So sind Karzinome des Oropharynx häufig mit HPV-Infektionen assoziiert^{6,7}, die restlichen Karzinome der Kopf-Hals-Region eher mit Tabak- und Alkoholkonsum⁸⁻¹². Für Lippenkarzinome sind zusätzlich die Risikofaktoren der Hauttumore mitverantwortlich, insbesondere die UV-Exposition¹³ ist hier zu nennen.

Ein besonderer Fokus bei der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen scheint in der Kombination von Tabak- und Alkoholkonsum zu liegen, hierbei wird von einem synergistischen Effekt^{8,10} ausgegangen. HASHIBE ET AL. fanden in einer 2009 veröffentlichten großen internationalen gepoolten Analyse heraus, dass 4 % aller Kopf-Hals-Tumore auf Alkohol allein, 33 % auf Rauchen allein und 35 % auf den kombinierten Konsum zurückzuführen seien⁸. Die Studie zeigte auch geschlechtsspezifische Unterschiede: 97,9 % der erkrankten Männer konsumierten Alkohol oder Tabak, allein oder in Kombination, bei den Frauen waren es 83,7 %⁸. Dies führt zu einem weiteren Risikofaktor: dem humanen Papillomavirus (HPV). Gerade Karzinome des Oropharynx sind mit HPV-Infektionen assoziiert^{6,7,14,15}. Insbesondere die Zunahme der Erkrankungsfälle in jüngerem Alter sind auf die sich ausbreitende Zahl an HPV-Infektionen zurückzuführen^{5,16}. Nicht nur weltweit sondern auch in Europa hat die Zahl der HPV-positiven Oropharynx-Karzinome stark zugenommen: Hier verdoppelte sich die Prävalenz von 35,3 % im Zeitraum vor 2000 auf 73,1 % im Zeitraum 2005 bis 2009¹⁷. Diese Entwicklung wird sich wahrscheinlich auch in den nächsten Jahren fortsetzen. Die Kanzerogenität einzelner Formen des Humanen Papillomavirus ist seit langem vom Cervix-Karzinom bekannt¹⁸. Die beim Cervix-Karzinom am häufigsten vorkommende „High-Risk“-Form HPV 16 ist gleichzeitig auch die am häufigsten vorkommende im HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinom⁷. Daneben werden HPV 18, HPV 33 sowie HPV 52 mit Kopf-Hals-Tumoren in Verbindung gebracht^{6,7,19,20}. Seit Juni 2018 empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) des Robert-Koch-Instituts eine Impfung gegen die „High-Risk“-Formen des Humanen Papillomavirus nun auch für Jungen zwischen 9 und 14 Jahren,

die bislang nur für Mädchen und junge Frauen galt²¹. Dies dient neben dem aufgrund von Herdenimmunität nun ausgedehnterem Schutz für Frauen vor Cervix-Karzinomen, auch dem Schutz beider Geschlechter vor Oropharynx-Karzinomen.

Als weiterer Risikofaktor für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren wird eine schlechte Mundhygiene diskutiert. HASHIM ET AL. kamen zu dem Ergebnis, dass ein inverser Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Kopf-Hals-Tumoren und regelmäßigem Zahnarztbesuch, täglichem Zähneputzen und niedrigem Zahnverlust besteht. Ebenso kann schlecht-sitzender Zahnersatz und damit assoziierte Druckstellen und Läsionen das Risiko erhöhen²². Weitere Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren sind ionisierende Strahlung, Vitaminmangel, Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV) (nur Nasopharynx-Karzinom), Fanconi-Anämie, Konsum von Kautabak und die beispielsweise berufliche Exposition mit Benpyren und Holzstaub^{2,12,14,23}.

Präkanzerosen

Bezüglich des oralen Plattenepithelkarzinoms gibt es eine Vielzahl von Präkanzerosen, welche unter OPMD (*oral potentially malignant disorders*) zusammengefasst werden. Hierzu zählen unter anderem die Leukoplakie, Lichen Planus, orale lichenoidale Läsionen, die orale submucöse Fibrose und die Erythroplakie^{24,25}. Laut WHO-Kriterien handelt es sich bei der Leukoplakie um einen weißlichen, nicht wegwischtbaren Belag, für den es weder histopathologisch noch klinisch eine andere Ursache gibt²⁶. Unterschieden werden die mit niedrigem malignen Entartungsrisiko assoziierte homogene Leukoplakie von der mit hohem Entartungsrisiko assoziierten inhomogenen Leukoplakie²⁷. Das Risiko für eine maligne Entartung liegt bei der inhomogenen Form bis zu siebenfach höher²⁸. Hinter einer Erythroplakie als Teil der inhomogenen Leukoplakie stecken bei Biopsien bereits zu 90 % epitheliale Dysplasien, carcinoma-in-situ oder invasive Plattenepithelkarzinome²⁸. Prinzipiell können Leukoplakien im gesamten Mundraum auftreten, singular oder multipel. Die Erscheinungsform variiert hierbei stark, ebenso das Auftreten von Begleitsymptomatik wie Brennen oder Schmerzen²⁵.

TNM-Klassifikation, Stadien-Einteilung und Diagnostik

Im Folgenden sollen die aktuelle TNM-Klassifikation (2017) und UICC-Stadien-Einteilung exemplarisch für das orale Plattenepithelkarzinom dargestellt werden^{29,30}. Auf die Darstellung der Einteilungen der anderen Untergruppen der Kopf-Hals-Tumore wird hier verzichtet, da diese nur wenig abweichen.

Tabelle 1 | TNM-Klassifikation orales Plattenepithelkarzinom

TNM	
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumorgröße ≤ 2 cm und Invasionstiefe ≤ 0.5 cm
T2	Tumorgröße ≤ 2 cm und Invasionstiefe > 0.5 aber ≤ 1 cm oder Tumorgröße 2 – 4 cm und Invasionstiefe ≤ 1 cm
T3	Tumorgröße > 4 cm oder Invasionstiefe > 1 cm
T4	Infiltration in benachbarte Strukturen
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastase ≤ 3 cm
N2a	Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastase 3 – 6 cm
N2b	Mehrere ipsilaterale Lymphknotenmetastasen ≤ 6 cm
N2c	Bi- oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen ≤ 6 cm
N3	Lymphknotenmetastase(n) ≥ 6 cm
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2 | UICC-Stadien-Einteilung des oralen Plattenepithelkarzinoms

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVb	Jegliches T	N3	M0
	T4b	Jegliches N	M0
IVc	Jegliches T	Jegliches N	M1

Bezüglich der Diagnostik empfiehlt die „Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie“ in ihren Leitlinien eine Abklärung jeglicher mehr als zwei Wochen bestehender Schleimhautveränderung. Diese beinhaltet zunächst eine klinische Untersuchung. Bildgebende Diagnostik wie Sonographie, CT- oder MRT-Untersuchung, Röntgen-Thorax oder CT-Thorax sowie eine bioptische Probeentnahme sind dann Bestandteil eines leitliniengerechten Stagings. Außerdem wird zum Ausschluss möglicher Zweitkarzinome in der Regel eine HNO-ärztliche Untersuchung und Endoskopie durchgeführt.³¹ Eine interdisziplinäre Besprechung im Rahmen einer Tumor-Konferenz ermöglicht sodann die Therapieentscheidung.

Therapie

Wie bei Karzinomen anderer Körperregionen variiert die Therapie der Kopf-Hals-Tumore in Abhängigkeit von Ausdehnung der Tumorerkrankung, technischer Machbarkeit und Patientenwunsch. Laut der S3-Leitlinien der „Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie“ aus dem Jahre 2012, welche zum gegenwärtigen Zeitpunkt überarbeitet wird, sind Operation und Strahlentherapie bei kleineren Tumoren (T1 und T2) gleichwertig, wobei frühe Tumorstadien mit einer weitaus besseren Prognose einhergehen als Karzinome im Spätstadium. Fortgeschrittene Karzinome sollen mit einer Kombination aus Operation und Strahlentherapie (mit oder ohne Chemotherapie) behandelt werden. Die Operation beinhaltet auch eine elektive Neck-Dissection, wenn diagnostisch kein Hinweis auf eine Lymphknotenmetastasierung besteht oder eine kurative Neck-Dissection bei Verdacht auf Lymphknotenmetastasen.³¹

Eine alleinige Chemotherapie hat bei Kopf-Hals-Tumoren im kurativen Setting keinen therapeutischen Stellenwert. Ein Überlebensvorteil für die Patienten bietet sich aber in der Radiochemotherapie³². In einer großen Meta-Analyse von 93 randomisierten Studien über die Wirksamkeit von Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren mit insgesamt > 17.000 Patienten fanden PIGNON ET AL. bei Mundhöhlenkarzinomen für die Radiochemotherapie einen Überlebensvorteil von 17 % gegenüber der alleinigen Strahlentherapie. Besonders die Gruppe der Patienten unter 66 Jahren würde demnach

mit einem Überlebensvorteil von 22 – 24 % gegenüber einer singulären Strahlentherapie profitieren³². Grundsätzlich sind Aussagen, die sich aus der genannten Studie ableiten differenziert zu betrachten, da hier Patientendaten von 1965 bis 2000 eingeschlossen wurden. Die multimodale Therapie des Mundhöhlenkarzinoms hat sich innerhalb dieser Jahrzehnte teilweise deutlich verändert (Einzug der Mikrochirurgie, intensitätsmodulierte Radiotherapie, Kombination von Cisplatin mit einer Radiotherapie in den späten 1970er Jahren, etc.), sodass die Homogenität der Behandlungen über diesen langen Zeitraum nicht gegeben ist. Grundsätzlich kann die Chemotherapie beim Mundhöhlenkarzinom adjuvant, also nach der erfolgten Operation oder Bestrahlung, oder neoadjuvant, vor der Operation oder Radiatio erfolgen. Daneben spielt die Mono- und Kombinationstherapie verschiedener zytostatischer Substanzen eine Rolle im Bereich der Palliation.

Der höchste Stellenwert bei der Chemotherapie kommt Cisplatin zu, dessen Monotherapie die gleiche Effektivität wie eine Cisplatin enthaltende Polychemotherapie zeigt^{32–34}. In den USA erhielten schätzungsweise 70 % aller Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren im Zeitraum von 2005 bis 2010 eine Cisplatin-haltige Chemotherapie³⁵.

Tabelle 3 | In dieser Arbeit verwendete Chemotherapeutika Cisplatin und 5-Fluoruracil

Wirkstoff	Summenformel, Molekulargewicht	Wirkmechanismus
Cisplatin Cis-Diamindichloridoplatin	Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂ , 301.1 g/mol,	Bildung von DNA-Quervernetzungen, vorrangiger Angriffspunkt an N7 von Guanin und Adenin; Förderung von Punktmutationen; Hemmung der Telomeraseaktivität ³⁶
5-Fluoruracil (5-FU) 5-Fluor-1H-pyrimidin-2,4-dion	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂ 130.1 g/mol,	Pyrimidin-Analogon, antimetabolischer Einbau in DNA- bzw. RNA-Stränge statt Uracil (RNA), Thymin oder Cytosin (DNA) ³⁷

1.2 MAGE-Tumorantigene

Cancer/testis antigens (CTA) sind eine Gruppe Tumor-assoziiierter Antigene, welche bei einer Vielzahl von malignen Tumoren exprimiert werden. Die Entdeckung geht auf VAN BRUGGEN ET AL. im Jahre 1991 zurück. Sie entdeckten in Zelllinien von Melanomen bis dahin unbekannte Genabschnitte, welche für ein Antigen kodierten, das sie „Melanoma associated antigen-1“, kurz MAGE-1 nannten³⁸. MAGE-1 konnte von zytotoxische T-Lymphozyten erkannt werden, was später auch für die anderen MAGE-Antigene nachgewiesen wurde³⁹. MAGE-Antigene kommen in diversen malignen Tumoren vor; neben Melanomen auch in Tumoren der Lunge, Brust, Prostata, Ovarien, Harnblase, des Gastrointestinal-Trakts und des Kopf-Hals-Bereichs^{40–44}. In gesundem Gewebe konnten MAGE-Antigene bisher nur in männlichen Keimzellen, der Plazenta⁴⁵ und, wie in Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, auch in fetalen Keratozyten⁴⁶ nachgewiesen werden. Diese Tatsache machen MAGE-Antigene besonders als zukünftige Targets für Immuntherapie interessant⁴⁷. Diverse Studien konnten aufzeigen, dass das Vorliegen von MAGE-Tumorantigenen bei Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich⁴⁸, in Brust⁴⁹, Prostata⁵⁰, Magen⁵¹, Ösophagus⁵² und beim hepatozellulären Karzinom⁵³ mit einem schlechteren Outcome verbunden ist.

Die MAGE-Antigene werden in zwei Gruppen, MAGE-I und MAGE-II eingeteilt, wobei sich MAGE-I aus einer großen Gruppe aus X-chromosomal-kodierten Genen zusammensetzt: MAGE-A, MAGE-B und MAGE-C⁵⁴, die meisten davon sind relevante *Cancer/testis antigens* (CTA)⁵⁵. Die Familie der MAGE-A, als Teil von MAGE-I, besteht wiederum aus elf Mitgliedern⁵⁶: MAGE-A1 bis MAGE-A12, wobei MAGE-A7 nicht existiert. Das codierende Gen befindet sich auf dem X-Chromosom in der Region Xq28⁵⁷. Im Aufbau der unterschiedlichen MAGE-Proteine herrscht erhebliche Variabilität, gemein ist allen die sogenannte *MAGE homology domain* (MHD), eine 170 bp große Region innerhalb des Proteins⁵⁴.

Der Fokus dieser Arbeit soll unter anderem auf MAGE-A11 gelegt werden. Die eigene Arbeitsgruppe fand bereits in einer früheren Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen MAGE-A11-Expression und schlechtere Wirksamkeit von Cisplatin, 5-

Fluoruracil, Docetaxel und Paclitaxel für die Zelllinien SCC 9, PC 1-1-, PC 13-1, PC 53 und SCC 68 (Cancer Institute at the University of Pittsburgh (USA)) und konnten bei zwei Zelllinien eine konzentrationsabhängige Wachstumszunahme in den 24 h nach Cisplatin-Therapie nachweisen⁵⁸. Die Forschung bezüglich intrazellulärer Vorgänge und Signalketten an denen MAGE-A11 beteiligt ist steht erst am Anfang. Am Beispiel des Prostata-Karzinoms scheint es sich bei MAGE-A11 um einen humanen Co-Aktivatoren des Androgen-Rezeptors und ein Protoonkogen zu handeln⁵⁹⁻⁶¹. Dass es sich bei der MAGE-A11-Expression um einen negativen Prognosefaktor handelt, konnte bereits für Karzinome des Ösophagus⁶² und der Brust^{41,63} gezeigt werden. Eine aktuelle Studie aus dem Jahre 2020 konnte dies nun auch für die Gruppe der Kopf-Hals-Tumore nachweisen. Hier beschreiben JIA ET AL. ein signifikant schlechteres 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit einer hohen MAGE-A11-Expression im Vergleich zu Tumoren mit niedriger Expression⁶⁴.

2 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit soll folgende Fragestellungen näher beleuchten:

- In welcher Stärke und Diversität exprimieren die untersuchten Zelllinien SCC9, SCC25, FaDu und Detroit562 MAGE-A-Tumorantigene?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit von Cisplatin und 5-Fluoruracil und der Expression der einzelnen MAGE-A-Subgruppen?
- Lässt sich dieser Zusammenhang durch die Überexpression bestätigen und in wie fern wird hiervon die Wirksamkeit von Cisplatin und 5-Fluoruracil beeinflusst?

3 Material

3.1 Zelllinien

Tabelle 4 | Zelllinien

Zelllinie	Entnahmeort	Firma und Cat.-Nr.
SCC 9	Orales Plattenepithelkarzinom der Zunge, männlicher Patient (25 J)	ATCC, Manassas, Virginia, Cat.-Nr. CRL-1629™
SCC 25	Orales Plattenepithelkarzinom der Zunge, männlicher Patient (70 J)	ATCC, Manassas, Virginia, Cat.-Nr. CRL-1628™
Detroit562	Plattenepithelkarzinom des Pharynx, weibliche Patientin (Alter unbekannt)	ATCC, Manassas, Virginia, Cat.-Nr. CCL-138™
FaDu	Plattenepithelkarzinom des Pharynx, männlicher Patient (Alter unbekannt)	ATCC, Manassas, Virginia, Cat.-Nr. HTB-43™

3.2 Puffer, Medien und Reagenzien

Tabelle 5 | Puffer, Medien und Reagenzien

Produkt	Firma und Cat.-Nr.
0,5 % Trypsin / 0,2 % EDTA Solution (10x)	Biochrom KG, Berlin, Cat.-Nr. L 2153
0,5 M EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Cat.-Nr. E7889-100ML
1,4-Dithiothreit	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 6908.2
100 % Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Cat. Nr. 6755.1
5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)	New England biolabs, Cat.-Nr. C29871
5-FU 50 mg/ml Injektionslösung	Medac, Wedel, Cat.-Nr. 41196.00.00
Acrylamid 30 %, Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 3029.2
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Cat.-Nr. A9539-25G
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 %	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 9592.2
Aqua dest.	
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. A512.1
Cisplatin Accord 1 mg/ml Konzentrat	Accord, London, UK, Cat.-Nr. 15120094

3 Material

DMEM/F-12 +L-Glutamin, +15mM Hepes	GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Cat.-Nr. 31330-038
Docetaxel	Bereitstellung durch die Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
DPBS 1x (Dulbecco's Balanced Salt Solution)	GIBCO Life Technologies, Cat.-Nr. 14190144
EcoR1	NEB, Ipswich, Massachusetts, Cat.-Nr. R0101S
FCS (fetales Kälberserum)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Cat.-Nr. 42F9664K
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega, Fitchburg, USA, Cat.-Nr. E2311
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo scientific, Roskilde, Denmark, Cat.-Nr. SM0312
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 4043.1
Glycin	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 3908.2
HCl (Salzsäure 37%)	Merck, Darmstadt, Cat.-Nr. 1.00317.1000
Hydrocortison	Sigma, Taufkirchen, Cat.-Nr. 1001826770
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 6752.2
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. T123.1
McCoy's Medium (1x)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Cat.-Nr. 26600-023
MEM Alpha, no nucleosides	GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Cat.-Nr. 22561-021
Methanol 99,8%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Cat.-Nr. 322415-1L
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. T145.1
Opti-MEM	Thermo Scientific, Roskilde, Denmark, Cat.-Nr. 31985062
Paclitaxel	Bereitstellung durch die Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
pcDNA3.1(+) Plasmid	Invitrogen, Carlsbad, USA, Cat.-Nr. V79020
Penicillin/Streptomycin (10.000U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Cat.-Nr. 15140
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA, Cat.-Nr. 32106
RNAse-freies Wasser	Qiagen, Venlo, Niederlande, Cat.-Nr. 129112
S.O.C.-Medium	Thermo Scientific, Waltham, USA, Cat.-Nr. 15544034

3 Material

SDS ultra pur	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 2326.2
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 2367.1
TRIS (Trishydroxymethylaminomethane)	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 5429.1
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Cat.-Nr. 9127.1
UltraPure™ Ethidium Bromide	Thermo Scientific, Waltham, USA, Cat.-Nr. 15585011
Xho1	NEB, Ipswich, Massachusetts, Cat.-Nr. R0146S
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Cat.-Nr. 6366236001

3.3 Commercial Kits

Tabelle 6 | Commercial Kits

Produktname	Inhalt	Firma und Cat.-Nr.
NucleoSpin, Gel and PCR Clean-up	NucleoSpin® Gel, PCR Clean-up Columns, Collection Tubes (2 mL), NT-Buffer, NT3-Buffer, NE-Buffer	Macherey-Nagel, Düren, Cat.-Nr. 740609.50
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Luminol Enhancer, Peroxide Solution	Thermo Scientific, Waltham, USA, Cat.-Nr. 32106
PureYield Plasmid Midiprep System	Binding Columns, Clearing Columns, Endotoxin Removal Wash, Column Wash, Cell Resuspension Solution (CRA), Cell Lysis Solution (CLA), nuclease-free water	Promega, Fitchburg, USA, Cat.-Nr. A2492
PureYield™ Plasmid Miniprep Kit	Cell lysis Buffer, Neutralisation Solution, Endotoxin Removal Wash, Column Wash Solution	Promega, Fitchburg, USA, Cat.-Nr. A6812
QuantiTect Reverse Transcription Kit	gDNA Wipeout Buffer, Reverse Transcriptase, RT Buffer, RT Primer Mix	Qiagen, Venlo, Niederlande, Cat.-Nr. 205311
QuantiTect SYBR Green Kit	DNA Polymerase, PCR Buffer, dNTP mix, I dye, ROX dye	Qiagen, Venlo, Niederlande, Cat.-Nr. 204143
Rapid DNA Ligation Kit	T4 DNA Ligase, 5x Rapid Ligation Buffer, nuclease-free water	Thermo Scientific, Waltham, USA, Cat.-Nr. K1423,

3 Material

RNeasy Mini Kit 250	Spin Columns, Collection Tubes (1,5 ml, 2 ml), RLT-Buffer, RW1-Buffer, RPE-Buffer, nuclease-free water	Qiagen, Venlo, Niederlande, Cat.-Nr. 74106,
----------------------------	--	---

3.4 qPCR-Primer

Tabelle 7 | qPCR-Primer

Gen	Produktname, Firma: alle Qiagen (Hilden, Deutschland)	Cat.-Nr.
Actin	Hs_ACTB_2_SG	Cat.-Nr. #QT01680476
MAGE-A1	Hs-MAGEA1_2_SG	Cat.-Nr. #QT01669430
MAGE-A2	Hs_MAGEA2_2_SG	Cat.-Nr. #QT01668688
MAGE-A3	Hs_MAGEA3_1_SG	Cat.-Nr. #QT00064799
MAGE-A4	Hs_MAGEA4_1_SG	Cat.-Nr. #QT00008862
MAGE-A5	Hs_MAGEA5_3_SG	Cat.-Nr. #QT01849750
MAGE-A6	Hs_MAGEA6_1_SG	Cat.-Nr. #QT00059129
MAGE-A8	Hs_MAGEA8_1_SG	Cat.-Nr. #QT02409897
MAGE-A9	Hs_MAGEA9_1_SG	Cat.-Nr. #QT00230874
MAGE-A10	Hs_MAGEA10_1_SG	Cat.-Nr. #QT00005376
MAGE-A11	Hs_MAGEA11_1_SG	Cat.-Nr. #QT01004094
MAGE-A12	Hs_MAGEA12_1_SG	Cat.-Nr. #QT00033873

3.5 Antikörper Westernblot

Tabelle 8 | Antikörper Westernblot

Produkt	Firma, Cat.-Nr.
MAGE-A11 (YN-2)	Santa Cruz Biotechnology, USA Cat.-Nr. Sc-101222
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins /HRP	DAKO, Santa Clara, USA, Cat.-Nr. P026002-2

3.6 Geräte

Tabelle 9 | Geräte

Bezeichnung	Name	Firma
Absorbance Microplate reader	Infinite F50	Tecan, Crailsheim
Brutschrank	HeraCell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Einkanalpipette	Einkanal-Mikroliterpipetten Eppendorf Research® plus, variabel	Eppendorf AG, Hamburg

3 Material

	0,5 - 10 µl mittelgrau	
Einkanalpipette	Einkanal-Mikroliterpipetten Eppendorf Research® plus, variabel 10 – 100 µl gelb	Eppendorf AG, Hamburg
Einkanalpipette	Einkanal-Mikroliterpipetten Eppendorf Research® plus, variabel 20 – 200 µl gelb	Eppendorf AG, Hamburg
Einkanalpipette	Einkanal-Mikroliterpipetten Eppendorf Research® plus, variabel 100 – 1000 µl blau	Eppendorf AG, Hamburg
Elektrophoresekammer	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S	Peqlab, 45-1010-C
Gefrierschrank – 8°	Premium BioFresh NoFrost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Premium BioFresh NoFrost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Light Cycler	LightCycler 2.0	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research Plus multi 8- channel 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research Plus multi 8- channel 100 – 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop	CK 40	Olympus, Tokio, Japan
Netzgerät	Peqpower 250V	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	WTW	inoLab
Pipettierhilfe	Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Schaukel	Rocking Platform	VWR, Radnor, USA
Semi-dry Blotter	PerfectBlue Semi-Dry-Elektroblotter	SEDEC 52-1010
Spannungsgerät	PeqPower 250 V	Peqlab, Erlangen
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilbank	Safe 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ultraschall-Zell-Disruptor	SLPe Digital Sonifier Cell Disruptors	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Vakuum-Absaugesystem	HLC AA04	Ditabis, Pforzheim
Vakuum-Macher	Promega Vac-Man Vacuum Manifold	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	Wasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Wasserbad	Julabo 5	Julabo, Seelbach
Zellzähler	CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System (Modell TTC)	Roche, Basel, Schweiz
Zentrifuge	Universal 320R Zentrifuge	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg

3.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10 | Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Name	Firma
6-Well Platte	Nunclon Delta 6-Well MicroWell Plates	Thermo scientific, Roskilde, Denmark
96-Well Platte	Nunclon Delta 96-Well MicroWell Plates	Thermo scientific, Roskilde, Denmark
Blotpapier	Gel-Blotting-Papier Roti-PVDF	Roth, Karlsruhe, A147.1
Film (Westernblot)	Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Chalfont, UK
Handschuhe	Gentle Skin, grip	Meditrade
Kanülen	Microlance 3	BD
Makroreaktionsgefäß	CELLSTAR TUBES 15 ml PP	Greiner bio-one
Makroreaktionsgefäß	CELLSTAR TUBES 50 ml PP	Greiner bio-one
Membranpapier	Nitrocellulose Blotting Membran	Roth, Karlsruhe
Mikroreaktionsgefäß	SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäß	Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf
Parafilm	Parafilm „M“	Pachiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten, lange Form	Kimble
Petrischale	Nunclon Delta Surface	Thermo scientific, Roskilde, Denmark
Petrischale	EASY GRIP Tissue Culture dish	Becton Dickinson, Franklin Lakes, US
Pipetten	CELLSTAR 10 ml in 1/10 ml	Greiner bio-one
Pipetten	CELLSTAR 25 ml in 2/10 ml	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	epTIPS Standard 20 – 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	GELoader Tips 1 – 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	DIAMOND tips 100 – 1000 µl	Gilson
Spritze	Discardit II	BD
Zellkulturflasche	Nunc EasYFlask 75 cm ²	Thermo scientific, Roskilde, Denmark
Zellkulturflasche	Nunc EasYFlask 175 cm ²	Thermo scientific, Roskilde, Denmark
Zellschaber	Cell Scraper	SPL life science

3.8 Software

Tabelle 11 | Software

Name	Firma
CFX Manager Software (PCR)	Bio-Rad Laboratories, California, USA
Excel 2013	Microsoft, Washington, USA
GraphPad Prism7	GraphPad software, California, USA

LightCycler Relative Quantification Software

Roche Diagnostics

NanoDrop Software

Thermo scientific, Roskilde, Denmark

Word 2013

Microsoft, Washington, USA

4 Methoden

4.1 Zellkulturelle Methoden

Zelllinien

Tabelle 12 | Zelllinien und Entnahmeort

Zelllinie	Entnahmeort
SCC 9	Orales Plattenepithelkarzinom der Zunge, männlicher Patient (25 J)
SCC 25	Orales Plattenepithelkarzinom der Zunge, männlicher Patient (70 J)
Detroit562	Plattenepithelkarzinom des Pharynx, weibliche Patientin (Alter unbekannt)
FaDu	Plattenepithelkarzinom des Pharynx, männlicher Patient (Alter unbekannt)

Medien

Tabelle 13 | Zellmedien und Zusätze

Zelllinie	Medium	Zusätze
SCC 9	DMEM/F-12, HEPES	10 % FCS, 1 % PS, 0,1 % Hydrocortison
SCC 25	DMEM/F-12, HEPES	10 % FCS, 1 % PS, 0,1 % Hydrocortison
Detroit562	MEM Alpha, no nucleosides	10 % FCS, 1 % PS
FaDu	MEM Alpha, no nucleosides	10 % FCS, 1 % PS

Zellpflege und Zellernte

Für diese Arbeit wurden die vier Zelllinien SCC9, SCC25, Detroit562 und FaDu der Firma ATCC (Manassas, Virginia, USA) verwendet. Alle Zelllinien sind HPV-negativ. Alle Zelllinien wachsen adhärent und wurden unter sterilen Bedingungen alle 3-4 Tage passagiert. Dies geschah der individuellen Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend, in folgenden Verhältnissen: 1 : 2 (SCC9), 1 : 2,5 (SCC25), 1 : 5 (Detroit562), 1 : 5 (FaDu).

Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C in Flaschen (Nunc EasYFlask 75 cm², Thermo scientific, Roskilde, Denmark) gezüchtet und zweimal pro Woche geerntet.

Hierfür wurde zunächst das alte Nährmedium abgesaugt. Im Anschluss wurde der Zellrasen mit 10 ml DPBS (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gespült und einige Male überschwenkt, um die Zellen keinem pH-Wechsel auszusetzen. Daraufhin wurde die Pufferlösung erneut abgesaugt und 3 ml Trypsin/EDTA (0,5 % Trypsin / 0,2 % EDTA Solution (10x), Biochrom KG, Berlin, Deutschland) hinzugesetzt. Bei Trypsin handelt es sich um ein Verdauungsenzym, welches die für die Adhäsion verantwortlichen Proteine spaltet. Damit sich die adhärenen Zellen vom Boden der Zellkulturflasche lösen, wurden die Zellen zusammen mit Trypsin/EDTA für 15 min bei 37°C inkubiert. Durch sanftes Schwenken wurde nach 15 min überprüft, ob sich die Zellen bereits gelöst hatten, falls nicht wurden die Zellen dann für maximal weitere 10 min inkubiert oder unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (Cell Scraper, SPL life science) manuell gelöst. Die Trypsinisation wurde gestoppt indem 7 ml des zelllinienspezifischen Nährmediums hinzugesetzt und das Gemisch zwei- bis dreimal erneut über den Flaschenboden gespült wurde. Die gelösten Zellen wurden nun in ein vorbereitetes 50 ml Falcon (Cellstar tubes 50 ml PP, Greiner bio-one) überführt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gleichmäßig im Medium lysiert. Die Zellen wurden im Anschluss für Versuche benutzt, beziehungsweise zur Aufrechterhaltung der Zellkultur zusammen mit 25 ml des zelllinienspezifischen Nährmediums erneut in die Zellkulturflaschen gesetzt und erneut bei 37 °C in den Brutschrank gestellt.

Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit dem Zellzähler CASY® (Roche, Basel, Schweiz) gemäß Herstellerprotokoll. Hierbei werden vitale Zellen einer bestimmten Zellgröße bei ihrem Durchtritt durch eine Messpore elektrisch erfasst. Je 10 µl der geernteten Zelllysate wurden in 10 ml Elektrolytlösung CASY®ton (Roche, Basel, Schweiz) gelöst und durch integrierte Pulsflächenanalyse ausgewertet. Auf Protokolle der eigenen Arbeitsgruppe zurückgreifend wurden die Zellen aller Zelllinien im erwarteten Größenmessbereich von 9 – 40 µm gezählt.

4.2 Inhibitionsversuche

Aussaat der Zellen

Um die Zellen mit den Chemotherapeutika stimulieren zu können, wurden die Zellen am Tag vor dem Versuch auf 96-Well-Platten (Nunclon Delta 96-Well MicroWell Plates, Thermo scientific, Roskilde, Denmark) ausgesät. Jedes Well sollte 1000 Zellen, gelöst in 100 μ l Nährmedium enthalten. Der Einfachheit halber wurde pro 96-Well-Platte vom Hundertfachen statt Sechshundneunzigfachen ausgegangen, also von 1 Mio. Zellen in 10 ml Nährmedium. Die geernteten Zellen wurden nun der vom Zellzähler ermittelten Zellzahl und der Zielkonzentration von 1 Mio. Zellen pro 10 ml entsprechend, mit zellspezifischem Medium verdünnt. Mithilfe einer 8-Kanal-Pipette wurden die in Medium gelösten Zellen zu je 100 μ l pro Well ausgebracht und für 24h bei 37°C inkubiert, um eine Adhärenz der Zellen zu erreichen.

Inhibition

Nach 24 h wurde das Medium mit der 8-Kanal-Pipette wieder entfernt, wobei der Inhalt der Rand-Wells belassen wurde. Um so wenig adhärenzte Zellen wie möglich zu verletzen, wurden die Spitzen am Rand der Wells unter Kontakt zur Seitenwand vorsichtig eingetaucht, um 45° zur Gegenseite gekippt und nach Hinabgleiten das Medium abpipettiert. Um eine Verdünnungsreihe aufstellen zu können, wurde in den Wells dem Verdünnungsfaktor entsprechend erneut zelllinienspezifisches Medium vorgelegt. Dies geschah in allen bis auf jenen Wells, die mit höchster Inhibitor-Konzentration befüllt werden sollten. Danach wurden dem Well mit der höchsten Konzentration dem Verdünnungsfaktor entsprechend ein Anteil entnommen und mit dem Medium des zweiten Wells durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren vermengt. Danach wurde dem zweiten Well wieder der gleiche Anteil entnommen und mit dem Medium des dritten Wells dreimalig durchmischt. Dieser Vorgang wurde über die gesamte Platte fortgesetzt (Abbildung 1). Drei Randwells wurden zudem als Totprobe mit 10%iger Salzsäure gefüllt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 48 h bei 37° C.

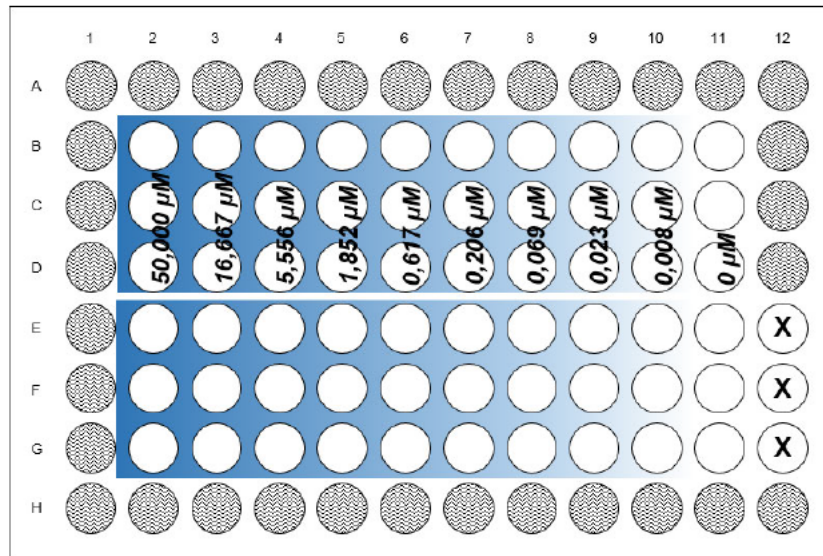


Abbildung 1 | 96-Well-Platte. Inhibitionsversuch hier am Beispiel von Cisplatin: Startkonzentration 50 µM, Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:3. Alle Wells am Rand der Platte blieben frei, Well E12, F12, G12 enthielten die Totprobe mit 10 % Salzsäure.

Kristallviolett-Assay

Nach 48 h Inkubation mit den Inhibitoren erfolgte die Auswertung mithilfe eines Kristallviolett-Assays. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen mit der 8-Kanal-Pipette das Nährmedium und Chemotherapie abpipettiert, und in jedes Well 50 µl Kristallviolett-Lösung gegeben (Zusammensetzung siehe Tabelle 14). Kristallviolett lagert sich unspezifisch in die Nukleoproteine der Zell-DNA ein und eignet sich so für photometrische Messverfahren.

Tabelle 14 | Zusammensetzung der Kristallviolettlösung

Name	Zusammensetzung	Menge
Kristallviolettlösung	Kristallviolett	1 g
	99,8 % Methanol	200 ml
	Aqua dest.	800 ml

Nach 15 min Inkubation wurde die Kristallviolettlösung zusammen mit den apoptotischen und daher nicht mehr adhärenen Zellen in einem dreimaligen Waschschrift mit Aqua dest. entfernt. Die Platten wurden im Anschluss vollständig

getrocknet. Mit 100 % Methanol konnte danach das Kristallviolett wieder gelöst werden und die Absorption wurde im ELISA-Reader Infinite F50 (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bestimmt.

Die Kalkulation und graphische Aufarbeitung der Rohdaten erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 7 (GraphPad software, California, USA). Um eine Vergleichbarkeit der Dosis-Wirkungskurven herstellen zu können, wurde mit selbiger Software auch der EC50-Wert berechnet. Dies entspricht der mittleren effektiven Konzentration, also jener Inhibitor-Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt in der Dosis-Wirkungskurve nach 48-stündiger Inkubation beobachtet worden war.

4.3 qPCR

RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden pro Zelllinie 10 Mio. Zellen isoliert und in ein Falcon überführt. Das Vorgehen entsprach der Zellernte beim Inhibitionsversuch. Das Lysat wurde 2 min bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand mit der Pasteur-Pipette abpipettiert. Für die RNA-Isolierung wurde das Kit „RNeasy Mini Kit 250“ der Firma Qiagen verwendet und die Isolierung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Zur Lyse und Homogenisierung der Zellen wurde auf die verbleibenden Pellets 600 µl RNA-Lyse-Puffer (RLT-Puffer, RNeasy MiniKit, Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben und 3 min bei maximaler Geschwindigkeit (≥ 8000 x g) zentrifugiert. Durch das anschließende Auf- und Abpipettieren kam es zur kompletten Lysierung der Pellets. Mit einer Spritze (2 ml) und Nadel wurden ca. 0,5 ml Luft aufgezogen und durch dreimaliges Aufziehen und Auswerfen des Lysats die DNA-Stränge verkleinert. Zur DNA-Fällung wurden 600 µl Ethanol hinzugefügt, das ganze gemischt und in die Säule des RNA-Spin Columns (RNeasy MiniKit) überführt. Das Gemisch wurde 15 sec bei maximaler Geschwindigkeit (≥ 8000 x g) zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Spin Column auf ein neues Sammelgefäß gesteckt. Nun erfolgten insgesamt drei Waschschrte, wobei nach der ersten und zweiten Waschung 15 sec bei ≥ 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Zuerst wurde mit 700 µl RW1-Puffer, dann mit 500 µl RPE-Puffer

(beides RNeasy MiniKit) gewaschen. Der dritte Waschschrift erfolgte wiederum mit 500 µl RPE-Puffer, im Anschluss wurde 2 min bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert. Das untere Sammelgefäß wurde durch ein neues 1,5 ml - Eppi ersetzt. Zum Eluieren der RNA wurde nun vorsichtig 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran der Spin Column pipettiert und durch einminütiges Zentrifugieren bei $\geq 8000 \times g$ in das untere Eppi überführt. Die gelöste RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren oder sofort in cDNA umgewandelt.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo scientific, Roskilde, Denmark). Der RNA-Gehalt wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die 260/280 Ratio gab Auskunft über die Reinheit der RNA-Probe.

cDNA-Herstellung

Die gewonnene RNA wurde nun in einem nächsten Schritt durch Reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Hierfür wurde „QuantiTect Reverse Transkription Kit“ (Qiagen, Venlo, Niederlande) und entsprechende Herstellerprotokolle verwendet. Je nach RNA-Konzentration wurde pro Probe 1 µg RNA entnommen und mit RNase freiem Wasser auf ein Zielvolumen von 12 µl verdünnt. Danach wurde jeder Probe 2 µl des im Kit enthaltenen „gDNA Wipeout Buffer“ zur Zerstörung eventuell bereits vorhandener DNA hinzugesetzt, das Ganze 2 min bei 42°C auf dem Heizblock inkubiert und im Anschluss auf Eis gesetzt. Es erfolgte die Herstellung des Master-Mixes auf Eis, alle Reagenzien waren ebenfalls Teil des Kits: Pro Probe wurde 1 µl „Reverse Transcriptase mastermix“, 4 µl „RT-Buffer“ und 1 µl „RT-Primer-Mix“ durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut gemischt und jeder RNA-Probe hinzugegeben. Die Proben wurden nun 15 min bei 42°C inkubiert und im Anschluss auf Eis abgekühlt. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben im Anschluss 3 min bei 95°C im Wasserbad aufgeköcht und wiederum auf Eis abgekühlt. Die cDNA war nun stabil und wurde bei -20°C gelagert.

Quantifizierung mit qPCR

Zur Quantifizierung von Genexpressionen wurde das Verfahren der quantitativen Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) angewandt. Hierfür wurde der Cyanin-Farbstoff „SYBR Green I“ und entsprechendes Kit „SYBR Green Kit“ (Qiagen, Venlo, Niederlande) verwendet. Durch die Bindung von „SYBR Green I“ an doppelsträngiger DNA kommt es zur Fluoreszenz, die quantifiziert werden kann. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Pro Well wurde 20 ng cDNA benötigt und mit RNase freiem Wasser auf ein Zielvolumen von 10,5 µl gebracht. Jedem Well wurde 12,5 µl Mastermix „SYBR Green I“ vorgelegt und mit 2 µl Primer und 10,5 µl verdünnter cDNA auf ein Zielvolumen von 25 µl gebracht.

Die qPCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Tabelle 15 | Zyklen, Dauer und Temperatur der qPCR

Zyklus	Dauer	Temperatur
Initiation	30 s	95°C
39 Zyklen	3 s	95°C
	30 s	60°C
Schmelzkurve	15 s	95°C
	60 s	60°C
	15 s	95°C

4.4 Westernblot

Lysatgenerierung

Für die Lysatherstellung wurden im Rahmen der Zellernte 20 Mio. Zellen je Zelllinie in ein Falcon überführt. Das Vorgehen entsprach der Zellernte des Inhibitionsversuchs. Die Zellen wurden 5 min bei Geschwindigkeit 1000 x g herabzentrifugiert, in 1,5 ml Medium resuspendiert und in ein Eppi (1,5 ml) überführt. Nun wurden die Zelllösungen 1 min bei Maximalgeschwindigkeit ($\geq 8000 \times g$) zentrifugiert und im Anschluss vorsichtig das Medium über dem entstandenen Pellet abgesaugt. Jedem Eppi wurden 110 µl Probenpuffer (PP) zugesetzt und Zellen und Probenpuffer via Ultraschall-Lyse vermengt, wobei durch Ultraschall die Zellmembran zerstört und das Zellinnere freigelegt wurde.

Das Röhrchen wurde solange unter der Ultraschallsonde auf und ab bewegt, bis das Pellet komplett im Probenpuffer verteilt war und die Mischung aufschäumte. Das fertige Lysat wurde nun noch 5 min im Wasserbad bei 95°C aufgeköcht und für weiter 5 min bei Maximalgeschwindigkeit ($\geq 8000 \times g$) zentrifugiert. Das Lysat wurde entweder sofort verwendet oder für spätere Versuche bei -20°C eingefroren.

Verwendete Puffer

Tabelle 16 | Zusammensetzung der im Westernblot verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Menge
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris	30,285 g
	0,015 M SDS	2,162 g
	HCl	Bis Ziel-pH 6,8
	Aqua dest.	500 ml
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris	90,755 g
	0,015 M SDS	2,162 g
	HCl	Bis Ziel-pH 8,8
	Aqua dest.	500 ml
Westernpuffer (10x)	Glycin	144 g
	0,5 M Tris	30,3 g
	Aqua dest.	1000 ml
Laufpuffer (1x)	10x Westernpuffer	100 ml
	Aqua dest.	900 ml
	20 % SDS	5 ml
Blotpuffer (1x)	10x Westernpuffer	100 ml
	Aqua dest.	700 ml
	99,8 % Methanol	200 ml
	20 % SDS	1,5 ml
Probenpuffer (2x)	20 % Glycerin	10 ml
	4 % SDS	10 ml
	3 % DTT	1,5 g
	1 M Tris	6,250 ml
	Aqua dest.	Zielvolumen 50 ml
	Bromphenolblau	Wenige Körner
TBS (1x)	Tris	6,05 g
	Natriumchlorid	8,76 g

HCl	Ziel-pH 7,5
Aqua dest.	800 ml

Verwendete Gele

Tabelle 17 | Zusammensetzung der im Westernblot verwendeten Gele

Gel	Zusammensetzung	Menge
Trenngel (für 2 Gele)	Acrylamid	8,8 ml
	Trenngelpuffer	5,5 ml
	Aqua dest.	7,8 ml
	Ammoniumperoxodisulfat (APS)	374 µl
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	30,8 µl
Sammelgel (für 2 Gele)	Acrylamid	2,8 ml
	Sammelgelpuffer	3,5 ml
	Aqua dest.	7,6 ml
	Ammoniumperoxodisulfat (APS)	168 µl
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	14 µl

Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Gelelektrophorese. Hierfür wurde eine vertikale Gelelektrophoresekammer „PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S“ der Firma Peqlap verwendet und Gele auf Polyacrylamid-Basis gegossen.

Zuerst wurde das Trenngel zwischen die zwei auf Dichtigkeit geprüften Glasplatten und den randbegrenzenden Spacern gegossen und das Ganze mit einigen Tropfen Isopropanol überschichtet um eine gerade Oberfläche zu schaffen. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel angemischt und über das Trenngel geschichtet. Um später befüllbare Gelkammern für die Lysate zu haben, wurde mithilfe von Kämmen Lücken im Sammelgel freigehalten. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde die Gelkammer und der darunter befindliche Tank mit Laufpuffer gefüllt und die Kämmen entfernt. Von jedem zuvor hergestellten frischen, beziehungsweise aufgetauten Lysat wurden 30 µl entnommen und in je eine Gelkammer gegeben, wobei die jeweils erste Kammer mit 15

µl „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (Thermo Scientific) befüllt wurde. Danach wurde an die Gele bei konstanter Stromstärke von 35 mA je Gel für 60 min elektrische Spannung angelegt, um die Proteine anhand ihrer Molekülmassen aufzutrennen.

Nach dem Auftrennen der Proteine erfolgte eine Übertragung auf Blotpapier im Semi-Dry-Blotter „PerfectBlue Semi-Dry-Elektroblotter“ (SEDEC). Hierfür wurde zweifach Membranpapier, einfach Blotpapier, das Gel mit den enthaltenden Proteinen und erneut zweifach Membranpapier geschichtet und für 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA je Gel geblottet. Nach Ablauf der Zeit wurde das Blotpapier für 10 Minuten in Milch bestehend aus 5 g Milchpulver und 100 ml 1 x TBS auf der Wippe geschwenkt und über Nacht im Kühlschrank verwahrt. Dies diente der Blockierung von noch proteinfreien Bereichen auf dem Blotpapier mit in der Milch enthaltenen Proteinen, damit diese später nicht von Antikörpern gebunden werden konnten.

Nach dreimaligem Abwaschen der Milch durch 1x TBS, wurde das Blotpapier mit dem Marker nach innen unten eingerollt und in ein 50 ml Falcon gesteckt. Hinzu kamen 10 ml 1 x TBS und 15 µl Primärantikörper. Das ganze wurde zur Inkubation über Nacht bei 5°C auf Rollen gelegt. Zur Entwicklung wurde „Pierce ECL Western Blotting Substrate“ der Firma Thermo Scientific verwendet und gemäß Herstellerprotokoll vorgegangen. Die Entwicklung erfolgte durch Chemilumineszenz auf „Amersham Hyperfilm“.

4.5 Klonierung

Die im Rahmen der Klonierung angewandten Methoden richten sich nach den vom Hersteller im jeweiligen Kit mitgelieferten Protokollen. Zudem wurden die Protokolle aus „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Sambrock and Green, 2012) verwendet.

Plasmide

Bei Plasmiden handelt es sich um kleine doppelsträngige DNA-Ringe in Bakterien, deren Replikation unabhängig der Genom-Replikation abläuft. Plasmide können in ihrer DNA für die Bakterien wichtige Informationen enthalten, wie zum Beispiel ein Resistenzgen

gegen ein Antibiotikum und von Bakterien über sogenannte Pili (sg. Pilus) untereinander ausgetauscht werden, wodurch sich Informationen, zum Beispiel Resistenzgene auch ausbreiten können. In der Gentechnik werden synthetische Plasmide genutzt, um beispielsweise Gene zu vervielfältigen oder um im Rahmen der Klonierung DNA-Fragmente in eukaryotische Zellen zu transportieren und dort für die Überproduktion eines Proteins zu sorgen. In diesem Fall werden Plasmide als Vektoren bezeichnet und besitzen folgende Eigenschaften: Jeder Vektor besitzt ein Replikationsstart, ein Antibiotika-Resistenzgen als Selektionsgen und eine Klonierungsstelle (engl. *multiple cloning site*, MCS), die unterschiedliche Erkennungssequenzen für diverse Restriktionsenzyme, die Restriktionsendonukleasen enthält. Soll der klonierte Vektor später in eine humane Zielzelle eingebracht werden und zur heterologen Expression eines Proteins führen, wird zudem ein Promotor im Plasmid nötig, der die Transkription initiiert. Außerdem wird für die Selektion von transfizierten humanen Zellen und untransfizierten ein weiterer Selektionsmarker benötigt.

Für diese Arbeit wurde der Vektor „pcDNA™3.1 (+) Mammalian Expression Vector“ der Firma Invitrogen verwendet. Dieser Vektor zeichnet sich durch folgende Merkmale aus: Er besitzt den Enhancer-Promotor des Zytomegalovirus (CMV), ein Selektionsmarker für Genticin zur Selektion transfizierter Zellen und ein Antibiotika-Resistenzgen für Ampicillin zur Selektion in transformiertem *E. coli*.

Amplifikation des Inserts, Verdau und Aufreinigung der DNA

Zunächst erfolgte die Vorbereitung des Vektors durch einen Restriktionsverdau. Die Restriktion wurde mit den Restriktionsendonukleasen „EcoRI“ (New England BioLabs) und „XhoI“ (New England BioLabs) durchgeführt (Tabelle 18). Um den DNA-Ring des Vektors für das fremde Insert zu öffnen wurde mithilfe der Restriktionsendonukleasen die DNA des Vektors an der Stelle geschnitten, welche später mit den Rändern des Inserts kompatibel war. Die kommerziell erworbene MAGE-A11-DNA des Inserts wurde in einer PCR vervielfältigt

4 Methoden

Tabelle 18 | Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI

Name	Sequenz	Cat. No. und Firma
EcoRI	5' GAATTC 3'	R0101S New England BioLabs
	3' CTAA'G 5'	
XhoI	5' C'TCGAG 3'	R0146S New England BioLabs
	3' GAGCT'C 5'	

Nun erfolgte die Aufreinigung der DNA mithilfe einer Gelelektrophorese. Für das Agarosegel wurde 0,8 g Agarose mit 60 ml 1x TAE vermischt, geschüttelt, in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung zum Kochen gebracht und mit schnellen Bewegungen auf Eis wieder auf Handwärme abgekühlt. Dem flüssigen Gel wurden nun 3 µl „UltraPure™ Ethidium Bromide“ (ThermoFisher Scientific) hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um einen Phenanthridin-Farbstoff, der an Nukleinsäuren bindet und so ihre Visualisierung unter UV-Licht ermöglicht. Daraufhin wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gegossen und für 20 – 30 min zum Aushärten stehen gelassen.

Tabelle 19 | Zusammensetzung der für die Gelelektrophorese verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Menge
50x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	TRIS	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
	Destilliertes Wasser	Zielvolumen: 1000 ml, Ziel pH: 8,3
1x TAE	50x TAE	20 ml
	Destilliertes Wasser	980 ml

In der Zwischenzeit wurden die Proben hergestellt: Die erste Probe enthielt 5 µl des Inserts, 5 µl Probenpuffer, 1 µl Restriktionsendonuklease „EcoRI“, 1 µl Restriktionsendonuklease „XhoI“ und 38 µl Aqua dest. um das Zielvolumen 50 µl zu erreichen. Die zweite Probe enthielt 2 µl Vektor „pcDNA™3.1 (+) Mammalian Expression Vector“, 5 µl Probenpuffer, 1 µl Restriktionsendonuklease „EcoRI“, 1 µl

Restriktionsendonuklease „XhoI“ und 41 µl Aqua dest. um das Zielvolumen zu erreichen. Die Proben wurden zusammen mit dem Marker „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (ThermoFisher Scientific) in das Agarosegel pipettiert, und bei 100 V für 60 min an das Netzgerät angeschlossen. Am Ende erfolgte unter UV-Licht das Aufreinigen durch Ausschneiden der passenden Bande.

Mit „Nucleo Spin, Gel and PCR Clean-up“ (Macherey-Nagel, Düren) wurde die DNA rückgewonnen. Die ausgeschnittene Agarose-Bande wurde zusammen mit 400 µl des im Kit enthaltenen bindenden „NT-Puffers“ in ein Mikroreaktionsgefäß (2,0 ml) überführt und bis zur vollständigen Lösung des Gels für einige Minuten bei 50 °C im Heizblock erhitzt. Die mitgelieferte „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column“ wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (2,0 ml) gesteckt und das in NT-Puffer gelöste Agarosegel inklusive DNA wurde überführt. Bei maximaler Geschwindigkeit ($\geq 8000 \times g$) wurde die Mischung für 30 sec zentrifugiert und der Durchfluss im Anschluss verworfen. Zum Waschen wurden nun 680 µl „NT3-Puffer“ in das obere Röhrchen gegeben, erneut bei maximaler Geschwindigkeit ($\geq 8000 \times g$) für 30 sec zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Um die DNA vollständig vom „NT3-Puffer“ zu befreien, wurde erneut für 2 min zentrifugiert und danach die „Clean-up Column“ in ein frisches Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) gesetzt. Auf die Membran der „Clean-up Column“ wurde vorsichtig 25 µl eluierender „NE-Puffer“ pipettiert und das Ganze bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert. Danach erfolgte ein letztes Zentrifugieren für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit ($\geq 8000 \times g$) und die DNA befand sich nun gelöst im unteren Mikro-Reaktionsgefäß.

Ligation

Die Ligation zur Bildung des Expressionsplasmids erfolgte mit „Rapid DNA Ligation Kit“ (Thermo Scientific). 4 µl des mitgelieferten Ligationspuffers „5X Rapid Ligation Buffer“ wurden mit 1 µl Vektor „pcDNA™3.1 (+) Mammalian Expression Vector“, 3 µl Insert, 1 µl des mitgelieferten Enzyms „T4 DNA Ligase, 5 u/µl“ und 11 µl nukleasefreiem Wasser in einem Mikro-Reaktionsgefäß gemischt. Nach vorsichtigem Vortexen wurde die

Mischung bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert.

Transformation

Die Vervielfältigung des klonierten Plasmids erfolgte im kompetenten Bakterium „5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency)“ (New England Biolabs). Die Bakterien wurden aus dem Gefrierschrank (- 80° C) genommen und auf Eis aufgetaut. In einem Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) wurde 20 µl des aufgetauten *E. coli* – Lysats unter Rühren 2 µl der Vektor-DNA-Ligatur hinzugesetzt. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis gestellt und danach für 45 sec auf einem Heizblock bei 42 °C hitzegeschockt. Beides erfolgte ohne Mischen. Danach erfolgte das erneute Abkühlen für 5 min auf Eis und im Anschluss wurde 250 µl „S.O.C.-Medium“ (Thermo Scientific) bei Raumtemperatur hinzugesetzt. Das Bakterienlysat wurde nun für eine Stunde bei 37 °C ins Wasserbad gesetzt und am Ende 100 µl auf Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Am nächsten Tag wurden sechs 15 ml - Reaktionsgefäße vorbereitet. Mit einer Pipettenspitze wurde je eine Bakterienkolonie von der Agarplatte entnommen und jeweils in ein eigenes Reaktionsgefäß gesetzt. In der Annahme, dass jede Kolonie auf ein transformiertes Bakterium zurückzuführen ist, sind alle Bakterien innerhalb einer Kolonie identisch. Zu der Pipettenspitze mit den Bakterien wurden 2 ml Nährmedium und 2 µl Ampicillin gegeben und das alles über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Bei Ampicillin handelt es sich um ein β -Lactam-Antibiotikum, was besonders bei grampositiven Bakterien aber auch bei einigen gramnegativen Stäbchen, zu denen *E. coli* gehört, wirkt. Der Vektor „pcDNA™3.1 (+) Mammalian Expression Vector“ enthält ein Ampicillin-Resistenzgen, wodurch nach der Inkubation nur Bakterien überlebten, welche das klonierte Plasmid aufgenommen und vervielfältigt hatten.

Isolierung des Plasmids

Zur Rückgewinnung der von *E. coli* vervielfältigten Plasmiden wurde „Plasmid Mini Kit“ (Qiagen) und entsprechendes Herstellerprotokoll verwendet. Die Bakterien, welche über Nacht im Ampicillin-Medium inkubiert worden waren, wurden nun 15 min bei 4°C bei 6000 x g zentrifugiert und das Pellet in 0,3 ml „Buffer P1“ (Plasmid Mini Kit) resuspendiert. Nun wurde 0,3 ml „Buffer P2“ (Plasmid Mini Kit) hinzugegeben, das Ganze fünfmal invertiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert, im Anschluss 0,3 ml „Buffer P3“ hinzugegeben, wieder fünfmal invertiert und auf Eis 5 min invertiert. Die Mischung wurden nun für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit ($\geq 8000 \times g$) zentrifugiert und der Überstand mit der darin gelösten Plasmid-DNA entfernt. Mithilfe von „Qiagen-tip 20“ Reaktionsgefäßen zur Aufreinigung von Plasmiden durch Schwerkraft erfolgte das zweimalige Waschen mit „Buffer QC“ (Plasmid Mini Kit), wonach der Durchfluss verworfen wurde. Das erneute Lösen der Plasmid-DNA erfolgte durch den Zusatz von 0,8 ml „Buffer QT“ (Plasmid Mini Kit). Die gelöste DNA wurde in 1,5 ml Eppis aufgefangen.

Das Konstrukt wurde durch eine Sequenzierung analysiert.

4.6 Transfektion

Die Transfektion erfolgte unter Zuhilfenahme von „FuGENE® HD Transfection Reagent“ der Firma Promega. Für die Transfektion wurden die Zelllinien FaDu und Detroit562 ausgewählt, da sich bei ihnen sowohl in der Realtime-PCR eine geringe MAG-E-A11-Expression als auch im Westernblot eine geringe MAG-E-A11-Proteinmenge gezeigt hatte. Zudem waren diese Zelllinien laut Herstellerfirma für Transfektionen geeignet. Auf bestehende Protokolle der eigenen Arbeitsgruppe zurückgreifend, erfolgte 24 Stunden vor Transfektion eine Aussaat in eine 6er-Well-Platte von 600.000 Zellen pro Well bei FaDu und 1,5 Mio. Zellen pro Well bei Detroit562. Pro Zelllinie wurden zwei Wells gefüllt, da je eine Transfektion mit reinem Vektor und eine mit kloniertem Vektor angestrebt wurde. Die Transfektion mit reinem unklonierten Plasmid erfolgte zur Herstellung einer Kontrollzelllinie, um in späteren Versuchen herausfinden zu können,

welche Ergebnisse allein auf die MAGE-A11-Überexpression, welche auf den Eingriff in die Zellmechanismen durch den Vorgang der Klonierung zurückzuführen seien. Nach 24 h erfolgte zuerst ein Medienwechsel, danach die Transfektion. Die DNA des unklonierten Vektors „pcDNA3.1 (+)“ lag in einer Konzentration von 1,37 µg / µl, die des MAGE-A11 enthaltenden klonierten Vektors lag in einer Konzentration von 1,77 µg / µl vor. Für die „FuGENE® HD Transfection Reagent“/DNA-Mischung wurden in einem sterilen Röhrchen 6 µg DNA mit 15 µl FuGENE® gemischt und mit Medium „Opti-MEM®“ der Firma Thermo Fisher auf ein Zielvolumen von 300 µl gebracht. Das Ganze wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Mischung den adhären Zellen zugesetzt, sodass jede Zelllinie in einem Well mit dem reinen Plasmid und in dem anderen mit dem klonierten Plasmid transfiziert wurde. Die Zellen wurden nun für weitere 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein weiterer Medienwechsel mit dem herkömmlichen zelllinienspezifischen Medium „MEM alpha“, wodurch das Transfektions-Reagenz entfernt wurde. Die transfizierten Zellen wurden nun hochgezüchtet und zweimal in herkömmlichem Verhältnis passagiert. Die Selektion erfolgte daraufhin mit Geneticin, wogegen die transfizierten Zellen dank eines Resistenzgens im Plasmid resistent waren. Hierfür wurde Geneticin in „MEM alpha“ mit einer Konzentration von 6 mg / ml gelöst, was der maximalen Löslichkeit des Antibiotikums entspricht. Eine vorherige Geneticin-Exposition auf nicht-transfizierten Zellen hatte keine bestehende Geneticin-Resistenz der Zelllinien Detroit562 und FaDu gezeigt. Nach erfolgreicher Selektion und nach mehrfachem Splitten in Geneticin-Medium wurden die transfizierten Zelllinien für 3 – 4 Monate in Kultur gehalten. Die Generierung einer stabilen Zelllinie über diesen Zeitraum gelang jedoch nur bei FaDu.

5 Ergebnisse

5.1 MAGE-A-Expressionsprofile

Die Erstellung der MAGE-A-Expressionsprofile erfolgte mit Hilfe der quantitativen real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR). Hierbei zeigte sich in jeder Zelllinie ein unterschiedliches Expressionsprofil der MAGE-A-Tumorantigene, wenngleich im Allgemeinen von einer schwachen Expression gesprochen werden muss. Im Verhältnis zum Referenzgen β -Aktin lag die stärkste Expression bei $1,167 \times 10^{-2} (\pm 0,143 \times 10^{-3})$ für die Subgruppe MAGE-A4 in der Zelllinie FaDu. Die meisten anderen Expressionslevel lagen jedoch in deutlich niedrigeren Bereichen. Die MAGE-A-Tumorantigene A1 und A10 wurden nur von einer Zelllinie exprimiert (beide SCC9), alle anderen von zwei oder mehr Zelllinien. Die MAGE-A-Antigene A2, A3, A5, A6, A8 und A11 konnten in allen vier Zelllinien nachgewiesen werden.

SCC9 - MAGE-A-Expressionsprofil

Die Zelllinie SCC9 zeigte das breiteste Spektrum an MAGE-Expression. Alle MAGE-A-Tumorantigene konnten in dieser Zelllinie nachgewiesen werden. Die Subgruppen A1 und A10 wurden außerdem allein in SCC9 exprimiert. Auffallend in dieser Zelllinie ist zudem die Expressionsstärke der Tumorantigene. Drei der fünf höchsten Expressionslevel (in Relation zum Referenzgen β -Aktin) fanden sich hier, nämlich für die Subtypen MAGE-A12 ($4,671 \times 10^{-3} \pm 0,288 \times 10^{-3}$), -A3 ($4,118 \times 10^{-3} \pm 0,089 \times 10^{-3}$) und -A6 ($3,153 \times 10^{-3} \pm 0,318 \times 10^{-3}$). Lediglich die Expression von MAGE-A4 in der Zelllinie FaDu überstieg diese Werte ($1,167 \times 10^{-2} (\pm 0,143 \times 10^{-3})$) (

Tabelle 20, Abbildung 2, Abbildung 6 und Abbildung 7).

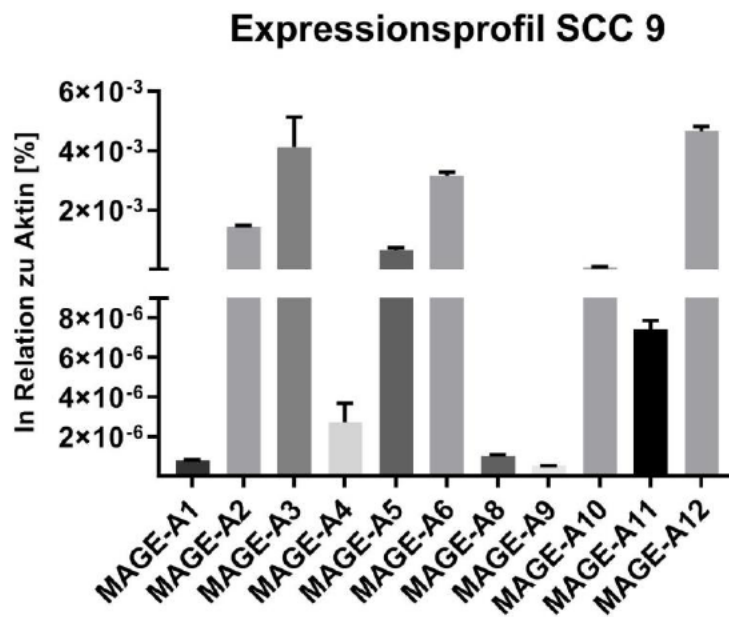


Abbildung 2 | Expressionsprofil der Zelllinie SCC9 für MAGE-A-Tumorantigene in Relation zum Kontrollgen β -Aktin. Segmentierte y-Achse zur besseren Übersicht. Standardabweichung durch Fehlerbalken dargestellt.

Tabelle 20 | Expressionslevel der MAGE-A-Tumorantigene in SCC9

MAGE-A	Expressionslevel (in Relation zu β -Aktin)	Standardabweichung
1	$8,088 \times 10^{-07}$	$\pm 8,165 \times 10^{-09}$
2	$1,442 \times 10^{-03}$	$\pm 4,404 \times 10^{-05}$
3	$1,410 \times 10^{-03}$	$\pm 1,010 \times 10^{-03}$
4	$2,703 \times 10^{-06}$	$\pm 9,983 \times 10^{-07}$
5	$6,512 \times 10^{-04}$	$\pm 8,978 \times 10^{-05}$
6	$3,153 \times 10^{-03}$	$\pm 1,185 \times 10^{-04}$
8	$1,024 \times 10^{-06}$	$\pm 5,552 \times 10^{-08}$
9	$5,338 \times 10^{-07}$	$\pm 9,828 \times 10^{-09}$
10	$7,882 \times 10^{-05}$	$\pm 1,186 \times 10^{-05}$
11	$7,411 \times 10^{-06}$	$\pm 4,403 \times 10^{-07}$
12	$4,671 \times 10^{-03}$	$\pm 1,485 \times 10^{-04}$

SCC25 - MAGE-A Expressionsprofil

In der Zelllinie SCC25 zeigte sich ein weniger breites Expressionsprofil wie in SCC9. Insgesamt konnten hier acht Subtypen nachgewiesen werden: A2, A3, A5, A6, A8, A9,

A11, A12. In SCC25 wurden für alle 8 Subtypen ähnliche Expressionslevel gemessen. Am schwächsten exprimiert war MAGE-A5 ($8,532 \times 10^{-7} \pm 0,615 \times 10^{-7}$) am stärksten A2 ($8,599 \times 10^{-6} \pm 0,242 \times 10^{-6}$), alle anderen Expressionslevel lagen dazwischen. Die Subtypen A8 ($4,750 \times 10^{-6} \pm 0,615 \times 10^{-6}$) und A9 ($2,562 \times 10^{-6} \pm 0,857 \times 10^{-6}$) wurden in SCC25 stärker als in jeder anderen Zelllinie exprimiert (Tabelle 21, Abbildung 3, Abbildung 6 und Abbildung 7).

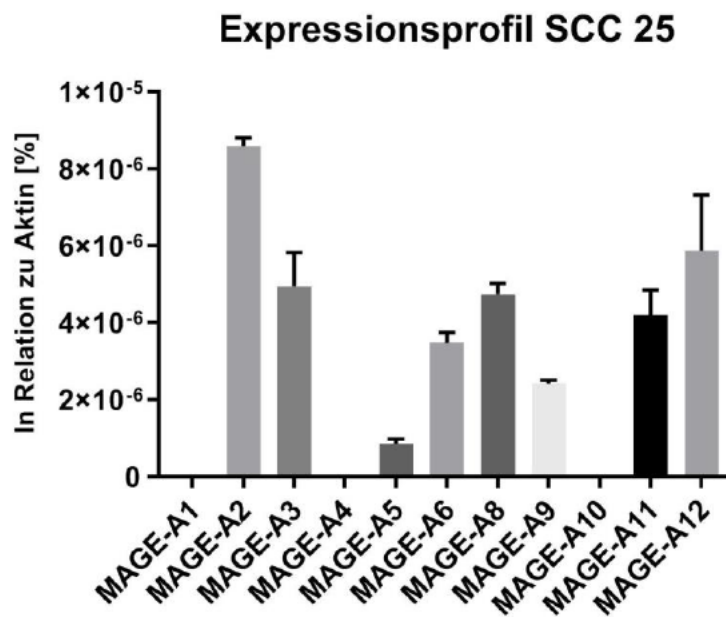


Abbildung 3 | Expressionsprofil der Zelllinie SCC25 für MAGE-A-Tumorantigene in Relation zum Kontrollgen β -Aktin. Standardabweichung durch Fehlerbalken dargestellt.

Tabelle 21 | Expressionslevel der MAGE-A-Tumorantigene in SCC25

MAGE-A	Expressionslevel (in Relation zu β -Aktin)	Standardabweichung
2	$8,599 \times 10^{-6}$	$\pm 2,147 \times 10^{-7}$
3	$8,569 \times 10^{-6}$	$\pm 8,763 \times 10^{-7}$
5	$8,532 \times 10^{-7}$	$\pm 1,195 \times 10^{-7}$
6	$3,478 \times 10^{-6}$	$\pm 2,633 \times 10^{-7}$
8	$4,750 \times 10^{-6}$	$\pm 2,737 \times 10^{-7}$
9	$2,411 \times 10^{-6}$	$\pm 9,578 \times 10^{-8}$
11	$7,908 \times 10^{-5}$	$\pm 4,940 \times 10^{-5}$
12	$5,870 \times 10^{-6}$	$\pm 1,447 \times 10^{-6}$

Detroit562 - MAGE-A Expressionsprofil

In der Zelllinie Detroit562 konnten acht der elf MAGE-A Tumorantigene nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um die Subtypen A2, A3, A5, A6, A8, A9, A11, A12. MAGE-A5 war innerhalb von Detroit562 der am stärksten vertretene Subtyp ($4,072 \times 10^{-6} \pm 3,593 \times 10^{-7}$), gefolgt von MAGE-A2 und A3. Der Subtyp MAGE-A12 soll an dieser Stelle bei hoher Standardabweichung im Vergleich der Expressionslevel nicht beachtet werden ($2,231 \times 10^{-6} \pm 1,723 \times 10^{-6}$). Die Subtypen A11 und A6 waren am schwächsten exprimiert ($3,994 \times 10^{-6} \pm 4,731 \times 10^{-8}$, $4,000 \times 10^{-7} \pm 1,751 \times 10^{-7}$) (Tabelle 22, Abbildung 4, Abbildung 6 und Abbildung 7).

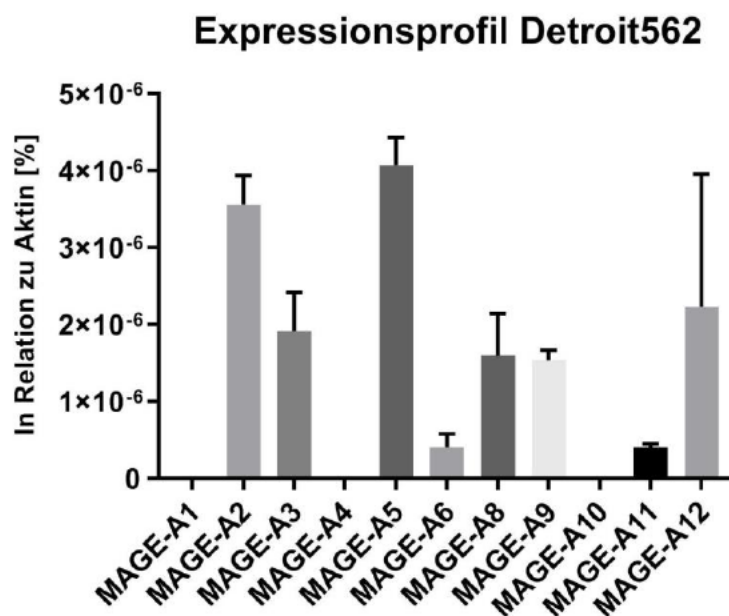


Abbildung 4 | Expressionsprofil der Zelllinie Detroit562 für MAGE-A-Tumorantigene in Relation zum Kontrollgen β -Aktin. Standardabweichung durch Fehlerbalken dargestellt.

Tabelle 22 | Expressionslevel der MAGE-A-Tumorantigene in Detroit562

MAGE-A	Expressionslevel (in Relation zu β -Aktin)	Standardabweichung
2	$3,558 \times 10^{-6}$	$\pm 3,776 \times 10^{-7}$
3	$3,291 \times 10^{-6}$	$\pm 5,010 \times 10^{-7}$
5	$4,072 \times 10^{-6}$	$\pm 3,593 \times 10^{-7}$
6	$4,000 \times 10^{-7}$	$\pm 1,751 \times 10^{-7}$
8	$1,600 \times 10^{-6}$	$\pm 5,397 \times 10^{-7}$

9	$1,530 \times 10^{-06}$	$\pm 1,340 \times 10^{-07}$
11	$3,994 \times 10^{-07}$	$\pm 4,731 \times 10^{-08}$
12	$2,231 \times 10^{-06}$	$\pm 1,723 \times 10^{-06}$

FaDu - MAGE-A Expressionsprofil

Mit sieben vertretenen Subtypen der MAGE-A Antigene zeigte die Zelllinie FaDu die geringste Vielfalt an MAGE-A-Expression. Folgende Subtypen konnten nachgewiesen werden: A2, A3, A4, A5, A6, A8, A11. Am stärksten wurde MAGE-A4 exprimiert ($1,167 \times 10^{-02} \pm 3,613 \times 10^{-03}$). Keine andere Zelllinie enthielt mehr MAGE-A4, zugleich trat hier das über alle Zelllinien hinweg höchstgemessene Expressionslevel auf. Ebenfalls stark exprimiert wurde MAGE-A5 ($1,883 \times 10^{-03} \pm 2,699 \times 10^{-04}$), keine andere Zelllinie enthielt mehr MAGE-A5 als FaDu. Am schwächsten exprimierte FaDu MAGE-A11 ($6,106 \times 10^{-07} \pm 3,669 \times 10^{-07}$), lediglich die Zelllinie Detroit562 erreichte hier niedrigere Expressionswerte ($3,994 \times 10^{-07} \pm 4,731 \times 10^{-08}$). (Tabelle 23, Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung 7)

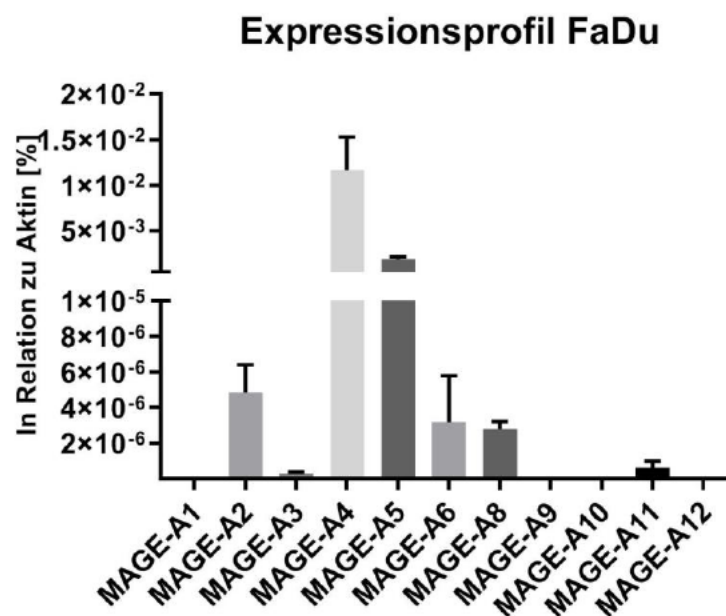


Abbildung 5 | Expressionsprofil der Zelllinie FaDu für MAGE-A-Tumorantigene in Relation zum Kontrollgen β -Aktin. Segmentierte y-Achse zur besseren Übersicht. Standardabweichung durch Fehlerbalken dargestellt.

Tabelle 23 | Expressionslevel der MAGE-A-Tumorantigene in FaDu

MAGE-A	Expressionslevel (in Relation zu β -Aktin)	Standardabweichung
2	$4,832 \times 10^{-06}$	$\pm 1,563 \times 10^{-06}$
3	$4,832 \times 10^{-06}$	$\pm 5,811 \times 10^{-08}$
4	$1,167 \times 10^{-02}$	$\pm 3,613 \times 10^{-03}$
5	$1,883 \times 10^{-03}$	$\pm 2,699 \times 10^{-04}$
6	$3,162 \times 10^{-06}$	$\pm 2,613 \times 10^{-06}$
8	$2,788 \times 10^{-06}$	$\pm 4,157 \times 10^{-07}$
11	$6,106 \times 10^{-07}$	$\pm 3,669 \times 10^{-07}$

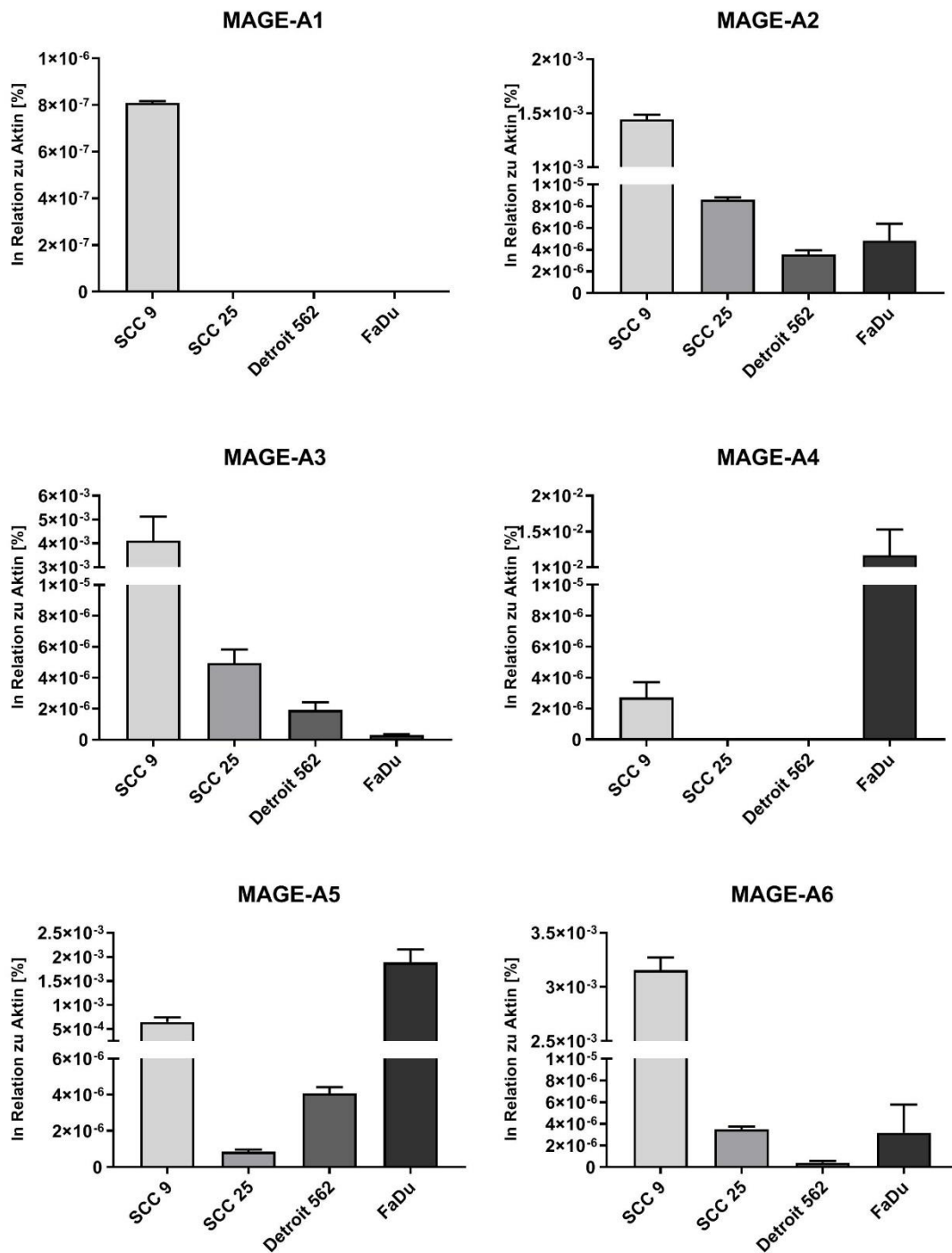


Abbildung 6 | Expressionsprofile MAGE-A1 bis -A6 in Relation zu Kontrollgen β -Aktin. Teilweise segmentierte y-Achse zur besseren Übersicht. Standardabweichung durch Fehlerbalken dargestellt.

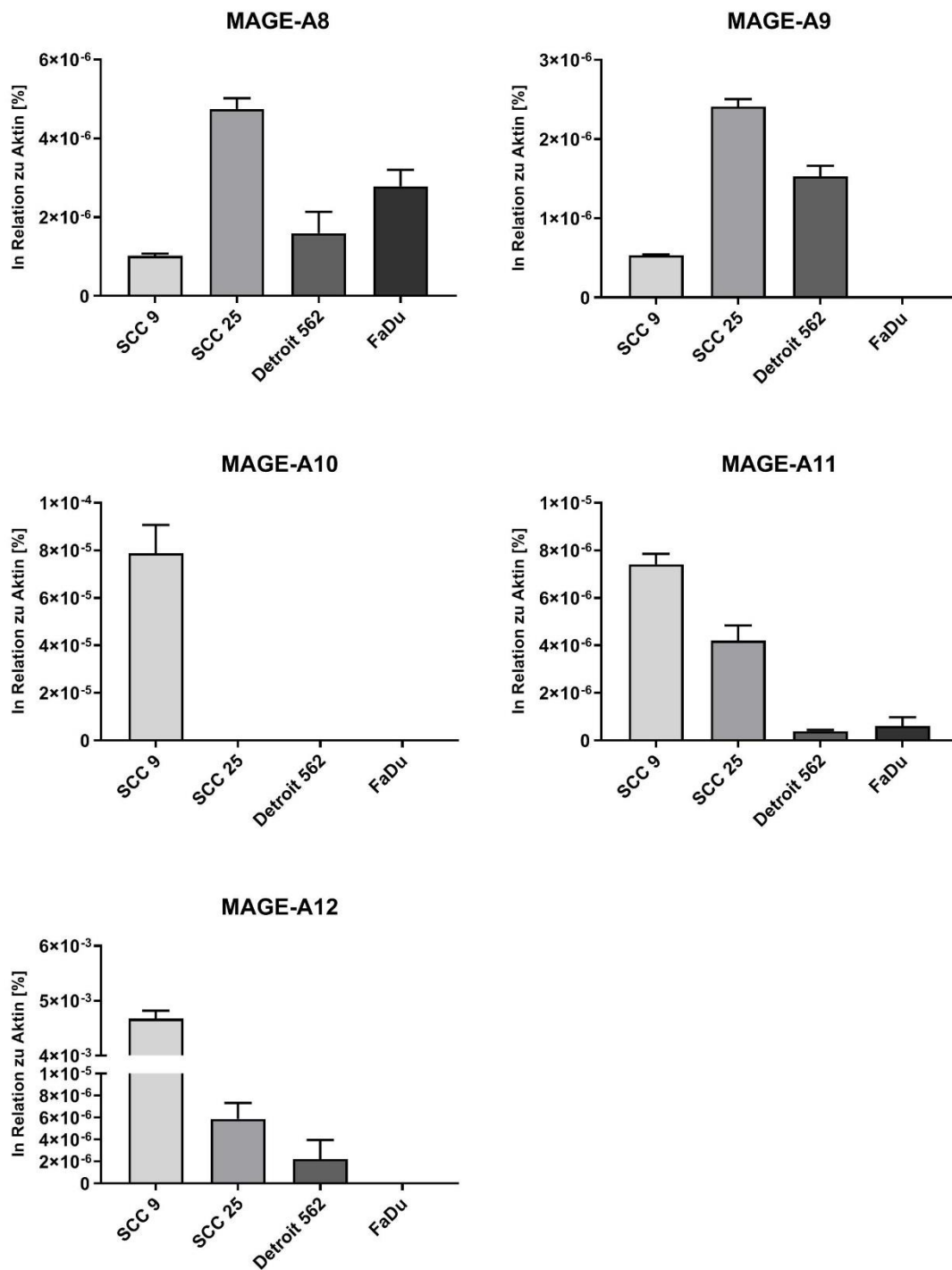


Abbildung 7 | Expressionsprofile MAGE-A8 bis-A12 in Relation zu Kontrollgen β -Aktin. Teilweise segmentierte y-Achse zur besseren Übersicht. Standardabweichung durch Fehlerbalken dargestellt.

5.2 Wirksamkeit von Chemotherapeutika

Des Weiteren sollte nun die Wirksamkeit der Chemotherapeutika Cisplatin und 5-Fluoruracil auf die Zelllinien SCC9, SCC25, Detroit562 und FaDu untersucht werden. Hierzu wurden *in vitro*-Versuche mit Kristallviolett-Assays durchgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden mit Chemotherapeutika in Verdünnungsreihen behandelt und im Anschluss via Kristallviolett-Assay ausgewertet. Die Auswertung erfolgte in Dosis-Wirkungskurven. Die Abszisse entspricht demnach der Konzentration des Inhibitors, angegeben in logarithmischer Form. Die Ordinate gibt die relative Zellzahl [%] an, also jenen Zellanteil, der die 48-stündige Simulation überlebte. Um eine Vergleichbarkeit der Wirksamkeit zwischen den unterschiedlichen Zelllinien zu ermöglichen, wurde die mittlere effektive Konzentration (EC50) bestimmt. Der EC50-Wert gibt die Konzentration an, bei der der halbmaximale-Effekt eingetreten ist. Die Qualität der Dosis-Wirkungskurven wird mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 beurteilt. Das Bestimmtheitsmaß trifft eine Aussage über Güte der Kurvenanpassung, wobei 1 der höchstmögliche Wert darstellt und 0 der geringste (Tabelle 24 und Tabelle 25).

Wirksamkeit von Cisplatin

Die Inhibition mit Cisplatin erfolgte in einem Verdünnungsverhältnis von 1:3, beginnend bei einer Wirkstoffkonzentration von 50 μM . Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche nach 48 h Inhibition sind in den Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 8 dargestellt. Tabelle 24 gibt Auskunft, über die mittlere effektive Konzentration (EC50-Wert) sowie über das Bestimmtheitsmaß (R^2).

Für alle Zelllinien ließ sich der charakteristische sigmoidale Verlauf der Dosis-Wirkungskurve darstellen. Das früheste Ansprechen auf Cisplatin zeigte die Zelllinie Detroit562, welche bereits bei einer Konzentration von $c = 0,354 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9401$) ihre mittlere effektive Konzentration erreichte, gefolgt von FaDu mit $c = 0,457 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,8922$) und SCC25 mit $c = 1,313 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9714$). SCC9 benötigte die höchste Konzentration an Cisplatin zum Erreichen ihrer mittleren effektiven Konzentration und zeigte somit die größte Resistenz ($c = 8,143 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9789$)).

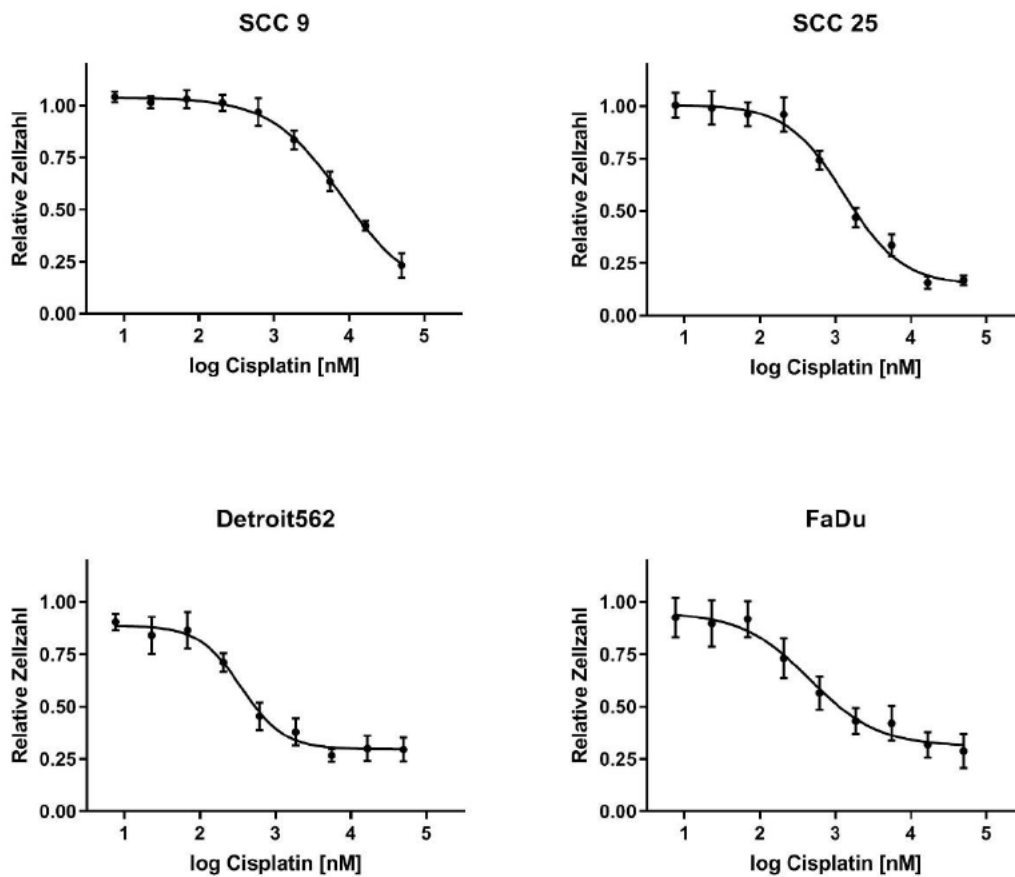


Abbildung 8 | Dosis-Wirkungskurven von Cisplatin nach 48 h Inkubation

Tabelle 24 | LogEC50, EC50 und R² der Monotherapie mit Cisplatin

Zelllinie	LogEC50	Kalkulierte EC50	R ²
SCC9	3,911	8,143 µM	0,9789
SCC25	3,118	1,313 µM	0,9714
Detroit562	2,549	0,354 µM	0,9401
FaDu	2,660	0,457 µM	0,8922

Wirksamkeit von 5-Fluoruracil

Nach gleichem Schema erfolgte die Inhibition der Zelllinien mit 5-Fluoruracil. Die Verdünnungsreihen erfolgten ebenfalls im Verhältnis 1:3, hier beginnend bei einer Konzentration von $c = 100 \mu\text{M}$. Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche sind in Form von Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 9 dargestellt, die Tabelle 25 gibt Auskunft über die berechnete mittlere effektive Konzentration (EC50-Wert) sowie über das Bestimmtheitsmaß (R^2).

Für alle Zelllinien ließ sich auch hier der charakteristische sigmoidale Verlauf der Dosis-Wirkungskurve darstellen. Die Zelllinie FaDu zeigte mit einem EC50-Wert von $c = 0,022 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9582$) das früheste Ansprechen auf die Chemotherapie. Es folgte SCC25 mit $c = 0,543 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9457$), SCC9 mit $c = 1,046 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,8981$) und Detroit562 mit $c = 1,260 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,8603$).

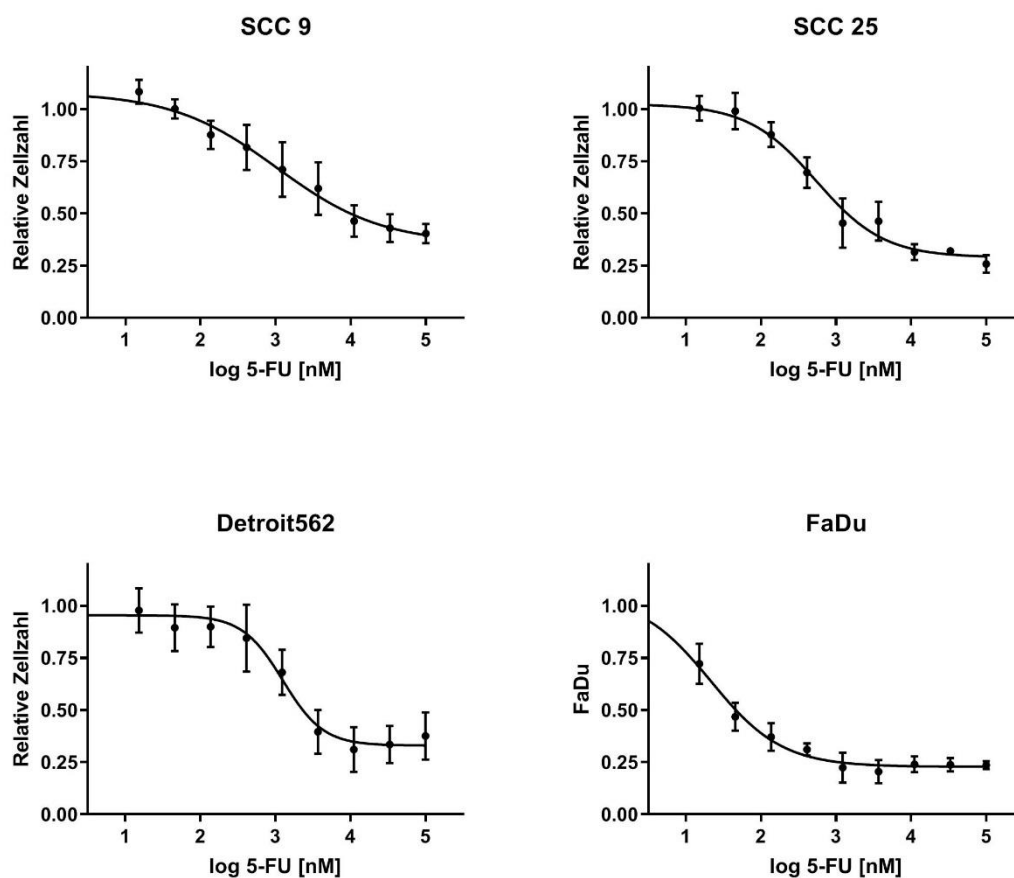


Abbildung 9 | Dosis-Wirkungskurven von 5-FU nach 48 h Inkubation

Tabelle 25 | LogEC50, EC50 und R² der Monotherapie mit 5-FU

Zelllinie	LogEC50	Kalkulierte EC50	R ²
SCC9	3,020	1,046 µM	0,8981
SCC25	2,735	0,543 µM	0,9457
Detroit562	3,100	1,260 µM	0,8603
FaDu	1,335	0,022 µM	0,9582

5.4 Korrelationsanalyse

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der MAGE-A-Expression bestimmter Subgruppen und der Wirksamkeit von Cisplatin und 5-FU besteht, wurde nun eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die EC50-Werte jeder Zelllinie nach Cisplatin-, beziehungsweise 5-FU-Monotherapie (Tabelle 24 und Tabelle 22) mit den MAGE-A-Expressionsprofilen aller MAGE-A-Subgruppen korreliert. Da die Zahl der Korrelationspaare mit $n = 4$ niedrig ist, wurde hierfür die Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Bei dieser Rangkorrelation handelt es sich um ein nichtparametrisches Verfahren.

Hierbei konnte in Hinblick auf die Cisplatin-Monotherapie eine Korrelation zwischen der Expression der MAGE-A-Subgruppe A11 und hohen EC50-Werten, also geringer Cisplatin-Wirksamkeit hergestellt werden. Dieses Ergebnis war mit $p = 0,0417$ signifikant. Konkret bedeutet dies, dass die Zelllinien SCC9 und SCC25, in welchen eine hohe Expression von MAGE-A11 vorlag ($7,411 \times 10^{-06} \pm 4,403 \times 10^{-07}$ (SCC9), $7,908 \times 10^{-05} \pm 4,940 \times 10^{-05}$ (SCC25), beide Ergebnisse im Verhältnis zum Referenzgen β -Aktin) einen hohen EC50-Wert ($7,919 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9774$, SCC9), $1,307 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9722$, SCC25)) erreichen, also eine höhere Cisplatin-Konzentration zur Erreichung des halbmaximalen Effekts benötigen (Abbildung 7,

Tabelle 20, Tabelle 21, Tabelle 24). Für die Zelllinien Detroit562 und FaDu, welche im Verhältnis weniger MAGE-A11 exprimiert haben ($3,994 \times 10^{-07} \pm 4,731 \times 10^{-08}$ (Detroit562), $6,106 \times 10^{-07} \pm 3,669 \times 10^{-07}$ (FaDu) beide Ergebnisse im Verhältnis zum

Referenzgen β -Aktin), waren weitaus niedrigere EC50-Werte (0,311 μ M ($R^2 = 0,9367$, Detroit562), 0,414 μ M ($R^2 = 0,8968$, FaDu)) gefunden worden, das heißt sie haben sensibler auf Cisplatin reagiert (Abbildung 7, Tabelle 22, Tabelle 23 und Tabelle 24).

Die Expression der Subgruppen A1 ($r = 0,7746$, $p = 0,2500$), A2 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$), A3 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$), A6 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$), A10 ($r = 0,7746$, $p = 0,2500$) und A12 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$) zeigte ebenfalls eine starke Korrelation mit hohen EC50-Werten, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant (Tabelle 26).

Tabelle 26 | Korrelationsanalyse nach Spearman zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen MAGE-A-Subtypen und EC50-Werten der Zelllinien nach Cisplatin-Monotherapie

MAGE-A	R	p (one-tailed)	Signif.	Paare
MAGE-A1	0,7746	0,2500	Nein	4
MAGE-A2	0,8000	0,1667	Nein	4
MAGE-A3	0,8000	0,1667	Nein	4
MAGE-A4	0,2108	0,4167	Nein	4
MAGE-A5	0	0,5417	Nein	4
MAGE-A6	0,8000	0,1667	Nein	4
MAGE-A8	-0,2000	0,4583	Nein	4
MAGE-A9	0	0,5417	Nein	4
MAGE-A10	0,7746	0,2500	Nein	4
MAGE-A11	1	0,0417	Ja*	4
MAGE-A12	0,8000	0,1667	Nein	4

Des Weiteren erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Spearman zwischen der MAGE-A-Expression der einzelnen Zelllinien und den EC50-Werten der 5-Fluoruracil-Monotherapie. Hierbei fanden sich zwar hohe Korrelationen zwar für die Subgruppen MAGE-A3 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$), -A12 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$), -A1 ($r = 0,7746$, $p = 0,2500$) und -A10 ($r = 0,7746$, $p = 0,2500$), allerdings waren davon keine Werte signifikant. Der Subtyp A8 scheint negativ zu korrelieren ($r = -0,8000$, $p = 0,1667$), das heißt sein Auftreten geht eventuell mit einem besseren Ansprechen der Zellen auf 5-FU

einher, dieses Ergebnis war jedoch ebenfalls nicht signifikant. Es ließ sich folglich keine Korrelation zwischen MAGE-A Expression und 5-FU-Wirksamkeit herstellen (

Tabelle 27).

Tabelle 27 | Korrelationsanalyse nach Spearman zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen MAGE-A-Subtypen und EC50-Werten der Zelllinien nach 5-FU-Monotherapie

MAGE-A	R	p (one-tailed)	Signif.	Paare
MAGE-A1	0,7746	0,2500	Nein	4
MAGE-A2	0,4000	0,3750	Nein	4
MAGE-A3	0,8000	0,1667	Nein	4
MAGE-A4	-0,3162	0,3333	Nein	4
MAGE-A5	-0,2000	0,4583	Nein	4
MAGE-A6	0,4000	0,3750	Nein	4
MAGE-A8	-0,8000	0,1667	Nein	4
MAGE-A9	0,2000	0,4583	Nein	4
MAGE-A10	0,7746	0,2500	Nein	4
MAGE-A11	0,4000	0,3750	Nein	4
MAGE-A12	0,8000	0,1667	Nein	4

5.5 Wirksamkeit von Cisplatin und 5-FU auf FaDu, nach MAGE-A11-Überexpression

Im nächsten Schritt wurde nun untersucht ob eine gesteigerte Expression des Tumorantigens MAGE-A11 die Wirksamkeit von Cisplatin und 5-FU beeinflussen kann. Hierfür wurde die Zelllinie FaDu, welche sich durch eine im Verhältnis zu den anderen Zelllinien eher niedrigeren MAGE-A11-Expression auszeichnete, kloniert und eine stabile Zelllinie mit MAGE-A11-Überexpression generiert. Die Klonierung mit der laut Hersteller ebenfalls zur Klonierung geeigneten Zelllinie Detroit562 scheiterte, da keine Stabilität der klonierten Zelllinie erreicht werden konnte. Neben der Zelllinie mit MAGE-A11-Überexpression erfolgte auch die Generierung einer Kontrollzelllinie, welche mit dem unklonierten Vektor erfolgte. Im Folgenden soll die klonierte Zelllinie mit MAGE-A11-Überexpression „FaDu+“, die klonierte Zelllinie mit Kontrollplasmid „FaDu-“ genannt werden.

Nachweis der MAGE-A11 Überexpression in FaDu+

Zunächst erfolgte mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR) der Nachweis, dass durch die erfolgte Klonierung in FaDu+ eine erhöhte MAGE-A11-Expression erreicht worden war als in der unklonierten FaDu und erhöhte mRNA-Level an MAGE-A11 in den Zellen vorlagen. Hierbei zeigte sich in der klonierten Zelllinie FaDu+ ein 48.135-fach höheres Level an MAGE-A11-mRNA, als in der unklonierten Zelllinie FaDu (Abbildung 10). Dieses Ergebnis konnte reproduziert werden.

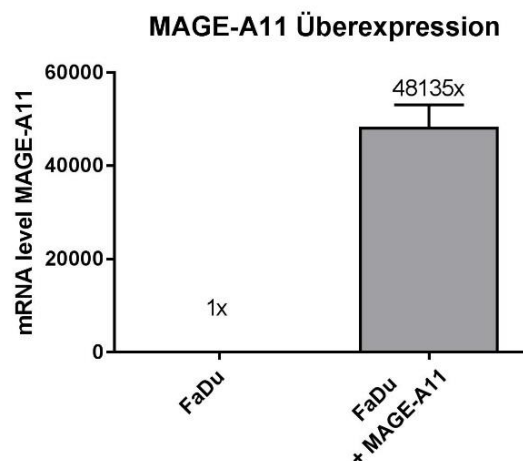


Abbildung 10 | Nachweis der MAGE-A11 Überexpression in klonierter FaDu+ durch qPCR anhand von mRNA-Level

Neben dem Nachweis mit der quantitativen Real-Time PCR wurde ebenfalls untersucht, ob die Überexpression auf Proteinebene nachgewiesen werden kann. Dieser Nachweis sollte durch Westernblots erfolgen. In vorherigen Westernblots konnte in der Zelllinie SCC9 das höchste Protein-Aufkommen für MAGE-A11 nachgewiesen werden, woraufhin das Lysat von SCC9 als Positivkontrolle verwendet wurde. Es wurden Westernblots, die die Expression von MAGE-A11 in den vier Zelllinien SCC9, SCC25, Detroit562 und FaDu zeigten, den Westernblots mit SCC9 als Positivkontrolle, FaDu- (+Kontrollplasmid) und FaDu+ (+MAGE-A11) gegenübergestellt. Hierbei konnte eine leichte Zunahme der MAGE-A11-Proteinmenge für FaDu+ nachgewiesen werden. Abbildung 11 zeigt je ein repräsentatives Ergebnis.

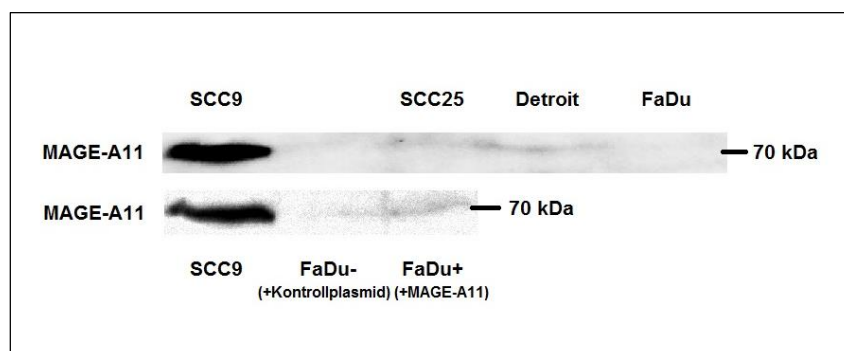


Abbildung 11 | MAGE-A11 Expression in den Zelllinien SCC9, SCC25, Detroit562, FaDu (1. Reihe) sowie MAGE-A11 Expression nach Klonierung mit Kontrollplasmid (FaDu-) und mit MAGE-A11 (FaDu+) (2. Reihe)

Auswirkungen der MAGE-A11-Überexpression auf die Zellproliferation in FaDu

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die MAGE-A11-Überexpression der Zelllinie FaDu+ eine Auswirkung auf die Zellproliferation aufweist. Hierfür erfolgte die Aussaat von 1000, 2000 und 4000 Zellen der Zelllinien FaDu+ (mit Überexpression von MAGE-A11) und der Kontrolle FaDu-. Nach 96-stündiger Inkubation der Zellen in üblicher Art und Weise und anschließender Auswertung im Kristallviolett-Assay zeigte sich folgendes Ergebnis: Der *two-tailed t-test* ergab in der Zellproliferation keinen signifikanten Unterschied zwischen FaDu+ und der Kontrolle FaDu- (Abbildung 12, Tabelle 28).

Tabelle 28 | Korrelationsanalyse in two-tailed t-test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen FaDu+ (mit MAGE-A11-Überexpression) und Kontrolle FaDu- bezüglich der Zellproliferation nach 96-stündiger Inkubation

Zellzahl	Paare	Durchschnitt FaDu+ / FaDu-	Differenz	R ²	p (two-tailed)	Signif.
1000	10	0,3547 / 0,3417	0,01306 ± 0,01440	0,04371	0,3472	Nein
2000	10	0,4509 / 0,4455	0,00539 ± 0,01983	0,004087	0,7889	Nein
4000	10	0,6809 / 0,7048	-0,02399 ± 0,03218	0,02995	0,4656	Nein

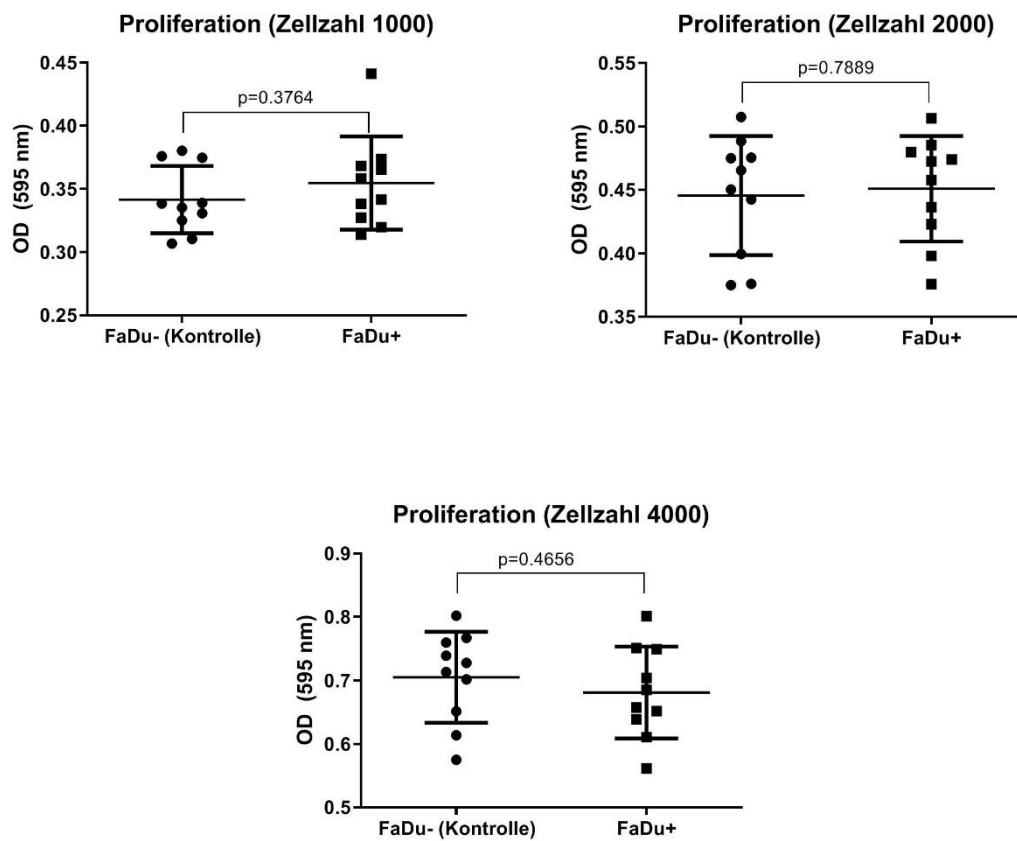


Abbildung 12 | Nachweis der Zellproliferation nach 96-stündiger Inkubation durch Messung der optischen Dichte von FaDu+ und Kontrolle.

Wirksamkeit von Cisplatin auf FaDu+ (mit Überexpression von MAGE-A11)

Zur Untersuchung der Cisplatin-Wirksamkeit auf die Zelllinie FaDu+ (mit MAGE-A11 Überexpression) und der Kontrollzelllinie FaDu- erfolgte nun die erneute Durchführung der Inhibitionsversuche mit Cisplatin-Therapie. Wieder wurden die Zellen in üblicher Art und Weise ausgesät, 48 Stunde inkubiert und mit einem Kristall-Violett Assay ausgewertet. Hierbei zeigte sich die Zelllinie FaDu+ resistenter gegenüber Cisplatin, als die Kontrollzelllinie FaDu-. Dieses Ergebnis erwies sich im *two-tailed t-test* mit $p < 0,0001$ signifikant. Durchschnittlich sprach FaDu+ um 9 % schlechter auf Cisplatin an als die Kontrollzelllinie. Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien betragen im Einzelnen: 20 % bei einer Konzentration von 50 μM Cisplatin, 6 % bei 16,67 μM , 11 % bei 5,56 μM , 6 % bei 1,85 μM , 5 % bei 0,62 μM , 9 % bei 0,07 μM und 6 % bei 0,02 μM (Abbildung 13, Tabelle 29 und Tabelle 30).

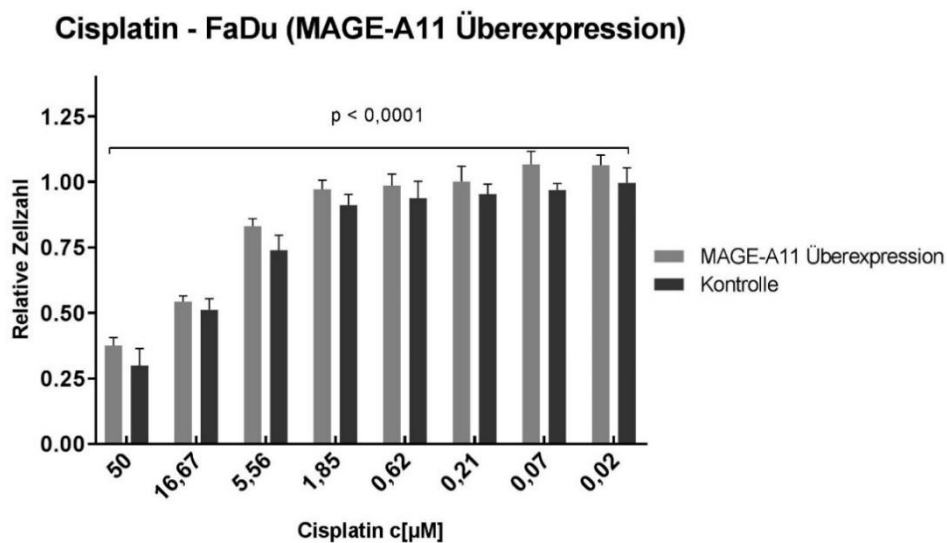


Abbildung 13 | Wirksamkeit von Cisplatin auf FaDu+ mit MAGE-A11 Überexpression im Vergleich zur Kontrollzelllinie.

Tabelle 29 | Analyse der einzelnen Spalten durch *multiple-t-test*. Wirksamkeit von Cisplatin in FaDu+ im Vergleich zur Kontrolle FaDu- nach 48-stündigem Inhibitionsversuch.

Cisplatin [μ M]	Durchschnittl. rel. Zellzahl FaDu+ / FaDu-	Differenz	p-Wert
50	0,3756 / 0,3000	0,07556 \pm 0,02473	0,00921
16,67	0,5433 / 0,5117	0,03167 \pm 0,01685	0,08276
5,56	0,8314 / 0,7400	0,09143 \pm 0,02447	0,00329
1,85	0,9722 / 0,9122	0,06000 \pm 0,01784	0,00395
0,62	0,9867 / 0,9378	0,04889 \pm 0,02608	0,07918
0,21	1,003 / 0,9544	0,04806 \pm 0,02319	0,05592
0,07	1,067 / 0,9700	0,09667 \pm 0,02069	0,00036
0,02	1,064 / 0,9967	0,06778 \pm 0,02310	0,00973

Tabelle 30 | Korrelationsanalyse im *two-tailed t-test* zeigt eine signifikante Differenz der Wirksamkeit von Cisplatin zwischen FaDu+ und der Kontrolle FaDu- nach 48-stündigem Inhibitionsversuch. Für die Wirksamkeit von 5-Fluoruracil kann keine signifikante Differenz gefunden werden.

	Paare	Durchschnittliche Differenz	R ²	p (<i>two-tailed</i>)	Signif.
Cisplatin	8	-0,06500 \pm 0,02237	0,9061	< 0,0001	Ja
5-FU	8	0,01351 \pm 0,05343	0,0680	0,4978	Nein

Wirksamkeit von 5-Fluoruracil auf FaDu+ (mit Überexpression von MAGE-A11)

Obwohl durch die Spearman-Korrelation keinen signifikanten Zusammenhang zwischen MAGE-A11-Expression und der Wirksamkeit von 5-FU zeigte, erfolgten Inhibitionsversuche der Zelllinie FaDu+ mit 5-Fluoruracil. Hier führte die MAGE-A11 Überexpression im Vergleich zur Kontrollzelllinie FaDu- zu keiner signifikanten Differenz in der Wirksamkeit von 5-Fluoruracil (p = 0.4978) (Abbildung 14, Tabelle 30 und Tabelle 31).

5-FU - FaDu (MAGE-A11 Überexpression)

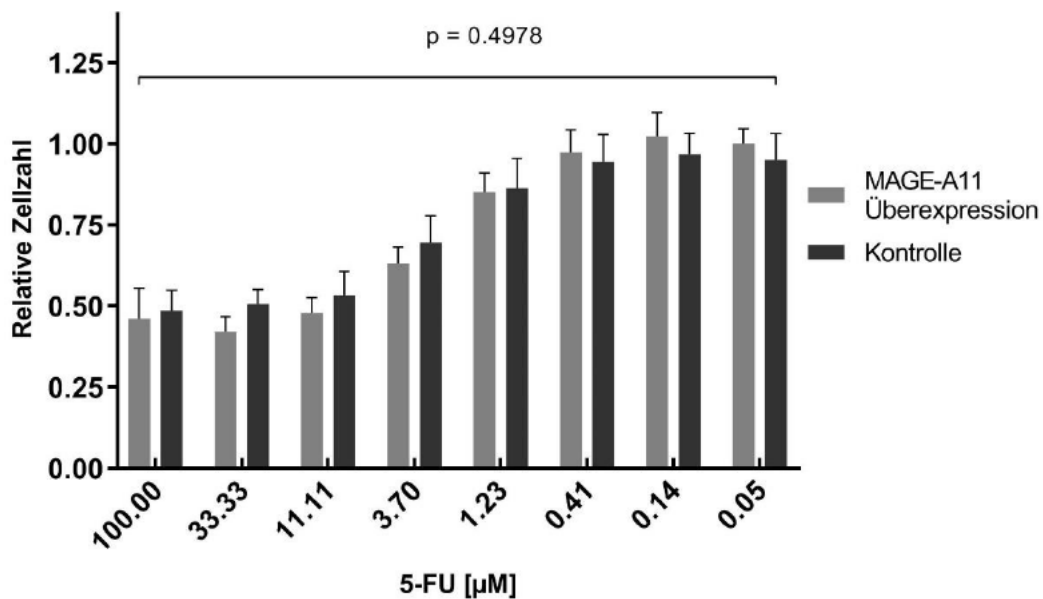


Abbildung 14 | Wirksamkeit von 5-FU in klonierter FaDu+ im Vergleich zu Kontrollzelllinie

Tabelle 31 | Analyse der einzelnen Spalten durch *multiple-t-test*. Wirksamkeit von 5-FU in FaDu+ im Vergleich zur Kontrolle FaDu- nach 48-stündigem Inhibitionsversuch im invitro-Modell.

5-FU [µM]	Durchschnittl. rel. Zellzahl FaDu+ / FaDu-	Differenz	p-Wert
100	0,4622 / 0,4863	-0,02413 ± 0,03719	0,52560
33,33	0,4210 / 0,5057	-0,08473 ± 0,02185	0,00133
11,11	0,4791 / 0,5336	-0,05444 ± 0,02947	0,08323
3,70	0,6304 / 0,6959	-0,06549 ± 0,03255	0,06137
1,23	0,8510 / 0,8635	-0,01254 ± 0,03658	0,73614
0,41	0,9738 / 0,9445	0,02928 ± 0,03627	0,43140
0,14	1,023 / 0,9691	0,05360 ± 0,03235	0,11697
0,05	1,001 / 0,9507	0,05042 ± 0,03101	0,12349

6 Diskussion

6.1 MAGE-A-Expressionsprofile

Wie es die Literatur erwarten ließ, konnten MAGE-A Tumorantigene in allen vier untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei unterschieden sich die Zelllinien in ihren Expressionsprofilen hinsichtlich der Diversität der MAGE-A-Subtypen sowie deren Expressionsstärke. Die Zelllinie SCC9 zeigte das breiteste Spektrum an MAGE-A-Tumorantigenen: Alle elf bekannten MAGE-A Tumorantigene (MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A5, -A6, -A8, -A9, -A10, -A11 und -A12) konnten hier nachgewiesen werden. Die Subtypen MAGE-A1 und MAGE-A10 konnten zudem allein in SCC9 nachgewiesen werden. Außerdem lagen mit den Expressionslevel von MAGE-A12, -A3 und -A6 drei der fünf höchsten überhaupt gemessenen Expressionslevel in SCC9 vor. Die Zelllinie SCC25 exprimierte acht von elf MAGE-A-Subtypen, die Subtypen MAGE-A8 und MAGE-A9 wurden nirgendwo stärker exprimiert als hier. Dieselben acht Subtypen wie in SCC25 konnten auch in Detroit562 nachgewiesen werden. Das Expressionsprofil von FaDu stach insofern heraus, als dass zwar mit nur sieben exprimierten MAGE-A-Subtypen in dieser Zelllinie die geringste Diversität vorlag, jedoch für MAGE-A4 das über alle Zelllinien hinweg höchste Expressionslevel gemessen wurde und zudem keine andere Zelllinie mehr MAGE-A5 exprimierte, als FaDu.

Mit dieser Diversität an MAGE-A-Expression konnte somit das Ergebnis von CUFFEL ET AL. aus dem Jahre 2011 bestätigt werden, wonach Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs in 80 % mehr als ein CTA (*Cancer/testis antigene*) und mehrheitlich mehr als drei CTAs exprimieren⁶⁵. Kollegen aus der eigenen Arbeitsgruppe hatten in einer Arbeit vom Jahr 2015 ebenfalls mittels qPCR Expressionsprofile der CTA MAGE-A1 bis MAGE-A12 erstellt. Hierfür hatten HARTMANN ET AL. die Zelllinien PCI-1, PCI-9, PCI-13, PCI-52 und PCI-68 verwendet und bei vier der fünf Zelllinien (allen außer PCI-68) eine Expression von mindestens sechs MAGE-A-Subgruppen nachgewiesen⁶⁶. Mehrfach wird in der Literatur berichtet, dass ein breiteres Expressionsspektrum an MAGE-A-Subgruppen positiv mit Malignität, fortgeschrittener Erkrankung, Grading und lymphonodaler Metastasierung korreliert^{67,68}. Aufgrund fehlender Herstellerangaben bezüglich des

jeweiligen Tumorstadiums der hier verwendeten Zelllinien, konnte dieser Zusammenhang nicht untersucht werden.

6.2 Zusammenhang zwischen MAGE-A-Expression und Cisplatin- und 5-Fluoruracil-Wirksamkeit

Alle Zelllinien zeigten den typischen sigmoidalen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven nach 48-stündiger Cisplatin-Therapie. Am schlechtesten sprach die Zelllinie SCC9 auf Cisplatin an. Der halbmaximale Effekt (EC50) trat hier erst bei einer Konzentration von $c = 8,143 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9789$) ein und SCC9 zeigte sich somit deutlich resistenter gegenüber Cisplatin, als die übrigen Zelllinien. Am besten sprach Detroit562 auf Cisplatin an, deren EC50-Konzentration bei $c = 0,354 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9401$) lag. Mit ähnlichem gutem Ansprechen reagierte FaDu ($c = 0,457 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,8922$)), gefolgt von SCC25 ($c = 1,313 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9714$)). Auch die Chemotherapie mit 5-Fluoruracil zeigte in allen Zelllinien sigmoidale Verläufe der Dosis-Wirkungskurven. Im Gegensatz zur Reaktion auf Cisplatin kam es bei der Chemotherapie mit 5-Fluoruracil allerdings zu einem gänzlich anderen Ansprechen der einzelnen Zelllinien: Detroit562 erwies sich als am resistantesten gegenüber der Therapie (EC50-Konzentration $c = 1,260 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,8603$)), gefolgt von SCC9 ($c = 1,046 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,8981$)) und SCC25 ($c = 0,543 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9457$)). FaDu zeigte das sensibelste Ansprechen auf 5-Fluoruracil mit einer EC50-Konzentration von $c = 0,022 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9582$).

Dieses hier für jede Zelllinie individuelle Ansprechen auf Cisplatin und 5-Fluoruracil muss zusammen mit der individuellen Expressionsbreite an MAGE-A-Subtypen betrachtet werden. In mehreren Studien wurde bisher ein Zusammenhang zwischen hohem Aufkommen an unterschiedlichen CTAs und zunehmender Malignität gestellt^{68,69}. Dieser Zusammenhang kann auch in dieser Arbeit belegt werden: Die Zelllinie SCC9, welche neben dem breitesten Expressionsspektrum mit allen elf MAGE-A-Subtypen zudem drei der fünf stärksten Expressionslevel aufwies, zeigte sich deutlich resistenter gegenüber Cisplatin, als die übrigen Zelllinien. Der kalkulierte halbmaximale Wert (EC50-Wert) von Cisplatin entsprach dem Sechsfachen des EC50-Werts von SCC25 und gar dem 25-fachen

von Detroit562. Auch gegenüber 5-Fluoruracil zeigte sich SCC9 zweifach resistenter als SCC25 und 48-fach resistenter als FaDu. Lediglich die Zelllinie Detroit562 reagierte sensibler auf die Therapie mit 5-Fluoruracil. Die Zelllinie FaDu, welche mit der Expression von sieben MAGE-A-Subtypen (MAGE-A2, -A3, -A4, -A5, -A6, -A8, -A11) die geringste Breite an MAGE-A-Subtypen aufwies, reagierte deutlich sensibler auf die Chemotherapie mit 5-Fluoruracil als alle anderen Zelllinien. Auch auf die Therapie mit Cisplatin reagierte FaDu deutlich sensibler als SCC9 und SCC25. Lediglich Detroit562 reagierte noch sensibler.

Die höchste MAGE-A11-Expression zeigten in diesen Versuchen die Zelllinien SCC9 und SCC25 (Abbildung 7). Gleichzeitig wurde in diesen Zelllinien mit EC50-Werten von 7,919 μM ($R^2 = 0,9774$, SCC9) und 1,307 μM ($R^2 = 0,9722$, SCC25) die größte Cisplatin-Resistenz beobachtet (Tabelle 24). Die Zelllinien Detroit562 und FaDu, welche verhältnismäßig eine nur geringe MAGE-A11-Expression zeigten, sprachen weitaus sensibler auf die Cisplatin-Monotherapie an, was sich in niedrigeren EC50-Werten zeigte (0,311 μM ($R^2 = 0,9367$, Detroit562), 0,414 μM ($R^2 = 0,8968$, FaDu), Tabelle 24).

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der individuellen MAGE-A-Expression einer jeder Zelllinie und deren Ansprechen auf Cisplatin und 5-Fluoruracil besteht, erfolgte eine Analyse der Daten mit der Spearman-Korrelation. Hierbei handelt es sich um eine Methode der Rangkorrelation, ein nicht-parametrisches Verfahren. Die Spearman-Korrelation bei Cisplatin-Therapie zeigte eine signifikante Korrelation ($p = 0,0417$, $r = 1,000$) zwischen der Expression des Subtyps MAGE-A11 und einem hohen halbmaximalen Effekt (EC50-Wert), also einer geringen Cisplatin-Wirksamkeit (Tabelle 26).

Auch andere MAGE-A-Subtypen korrelierten mit hohen EC50-Werten, hier lag jedoch keine Signifikanz vor. Im Einzelnen könnte somit ein Zusammenhang zwischen der Expression der Subtypen MAGE-A1 ($r = 0,7746$, $p = 0,2500$), -A2 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$), -A3 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$), -A6 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$), -A10 ($r = 0,7746$, $p = 0,2500$)

und -A12 ($r = 0,8000$, $p = 0,1667$) und einer erhöhten Cisplatin-Resistenz bestehen (Tabelle 26). Zu diskutieren ist, dass die Zelllinien SCC9 welche die größte Cisplatin-Resistenz aufwies, neben der höchsten MAGE-A11-Expression auch das breiteste Expressionsspektrum aller Zelllinien aufweist, indem alle bekannten MAGE-A-Subtypen vorkommen. Alle sechs oben genannter Subtypen, die ebenfalls im Verdacht stehen für eine Cisplatin-Resistenz (mit-)verantwortlich zu sein, werden gar von keiner Zelllinie stärker exprimiert, als von SCC9 (Abbildung 2, Abbildung 6, Abbildung 7). Hier könnte folglich ein synergistischer Effekt bestehen. Die Zelllinie SCC25 wies zwar eine deutlich kleinere Expressionsbreite an MAGE-A-Subgruppen auf, nämlich acht von elf, dennoch wurden aber neben dem zweithöchsten Expressionslevel für MAGE-A11 auch hier vier der sechs im Verdacht für eine Cisplatin-Resistenz (mit-)verantwortlich zu sein stehenden Zelllinien gefunden. Das Expressionslevel von SCC25 für diese Subtypen (MAGE-A2, -A3, -A6 und -A12) war ebenfalls hoch, nur SCC9 exprimierte stärker (Abbildung 3, Abbildung 6, Abbildung 7).

6.3 Klonierung

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von MAGE-A11 auf die untersuchten Zelllinien sollten nun MAGE-A11-überexprimierende Zelllinien generiert werden. Hierfür wurden die Zelllinien FaDu und Detroit562 ausgewählt, welche sich gemäß Herstellerangaben zur Transfektion eigneten. Beide Zelllinien hatten sich vorab durch ein rasches Ansprechen auf Cisplatin im Inhibitionsversuchen ausgezeichnet (EC50-Wert von Detroit562 $c = 0.354 \mu\text{M}$, von FaDu $c = 0.457 \mu\text{M}$) bei gleichzeitig im Vergleich zu SCC9 und SCC25 deutlich niedrigeren Expressionslevel von MAGE-A11 (Detroit562: $3,994 \times 10^{-07} \pm 4,731 \times 10^{-08}$. FaDu: $6,106 \times 10^{-07} \pm 3,669 \times 10^{-07}$). Die Transfektion mit Plasmid und Kontrollplasmid gelang zunächst bei beiden Zelllinien, jedoch konnte bei Detroit562 keine Stabilität der Zelllinie erreicht werden.

Sowohl konnten durch qPCR nach erfolgter Transfektion erhöhte Level an MAGE-A11 auf mRNA-Ebene, als auch durch Westernblots erhöhte Proteinlevel nachgewiesen werden. Das Ergebnis der qPCR ergab ein 48.135-fach höheres MAGE-A11-Vorkommen

als in der unklonierten FaDu-Zelllinie. Die Ergebnisse der Westernblots waren weniger deutlich. Im Vergleich zur Positiv-Probe, einem Lysat aus der Zelllinie SCC9, konnte aber auch hier nach Klonierung ein höheres MAGE-A11-Aufkommen nachgewiesen werden. Generelle Aussagen über ein Proteinaufkommen durch das Westernblot-Verfahren als nicht quantitative Methode sind aber schwierig, zumal die MAGE-A11-Menge in FaDu+ noch immer weit hinter der in der Positiv-Kontrolle SCC9 zurückblieb. Zu diskutieren ist, dass Unterschiede zwischen dem Westernblot- und qPCR-Ergebnis auch in den unklonierten ursprünglichen Zelllinien auftraten. Zwar zeigt sich bei der Zelllinie SCC9, mit dem in der qPCR höchstgemessenem Expressionslevel und stärkstem Signal im Westernblot eine Übereinstimmung der Ergebnisse, nicht so jedoch für SCC25. Hier ließ das zweithöchste Expressionslevel von MAGE-A11 in der qPCR auch auf hohe Proteinlevel in der Zelle schließen, im Westernblot blieb die MAGE-A11-Menge jedoch sogar hinter der von Detroit562 zurück (Abbildung 7, Abbildung 11). Für die beiden klonierten Zelllinien FaDu+ und FaDu- bleibt dennoch festzuhalten, dass die Zelllinie FaDu+ auch im Westernblot mehr MAGE-A11-Protein nachweist, als die mit dem Kontrollplasmid klonierte Zelllinie FaDu-. Der Nachweis der erfolgreichen Klonierung gelang somit sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene.

6.4 MAGE-A11-Überexpression und dessen Einfluss auf die Zellproliferation

Nach 96-stündiger Inkubation der MAGE-A11 überexprimierenden Zelllinie FaDu+ ließ sich bezüglich der Zellproliferation kein signifikanter Unterschied zur Kontrollzelllinie FaDu- feststellen. Dies traf sowohl für eine Aussaat von 1.000, 2.000 und 4.000 Zellen zu. Dies steht im Kontrast zu dem Ergebnis einer im Jahre 2013 von XIA ET AL. veröffentlichten Studie, in der bei Brustkarzinom-Zellen von einer signifikanten Zunahme der Zellproliferation nach MAGE-A11-Überexpression berichtet wird.⁶³ Dieses Ergebnis kann für die hier verwendeten Zelllinien der Kopf-Hals-Karzinome nicht bestätigt werden und lässt vermuten, dass durch MAGE-A11 in Brust- und Kopf-Hals-Karzinomen unterschiedliche für die Zellproliferation verantwortlichen Mechanismen in

Gang gesetzt werden. Für die Versuche dieser Arbeit lässt sich hinsichtlich des Kopf-Hals-Karzinoms folgern, dass etwaige Unterschiede in der Wirksamkeit von Cisplatin und 5-Fluoruracil im 48-stündigen Inhibitionsversuch nicht von abweichendem Proliferationsverhalten der klonierten Zelllinien herrühren.

In dieser Arbeit gelang der Nachweis, dass sich die MAGE-A11 überexprimierende Zelllinie FaDu+ im Vergleich zur Kontrollzelllinie FaDu- im Inhibitionsversuch um durchschnittlich 9 % resistenter gegenüber der Cisplatin-Therapie zeigte. Dieses Ergebnis erwies sich mit $p < 0,0001$ signifikant. Die größte Wirkungsdifferenz zwischen FaDu+ und FaDu- lag bei der maximalen Cisplatin-Konzentration von $c = 50 \mu\text{M}$ vor. Hier lag die relative Zellzahl von FaDu+ 20 % über der von FaDu-. Der geringste Unterschied mit 5 % trat bei der Konzentration von $0,62 \mu\text{M}$ auf.

Somit gelang der Nachweis, dass MAGE-A11-Überexpression zur Cisplatin Resistenz führt.

Eine Studie von SANG ET AL. aus dem Jahre 2016 untersuchte die Auswirkung von MAGE-A11-Expression im ösophagealen Plattenepithelkarzinom. Hier zeigte sich, dass MAGE-A11-Vorkommen neben einer kürzeren Überlebensdauer der Patienten und einer höheren lymphogenen Metastasierungsrate auch mit erhöhter Zellproliferation und Tumor-Invasivität einher gehen⁶². Die Kollegen schlussfolgerten, dass es sich bei MAGE-A11 um einen negativen Prognosefaktor handle. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine chinesische Studie von LIAN ET AL. aus dem Jahre 2012. Hier war in einer retrospektiven Studie die MAGE-A11-Expression bei Brustkrebs hinsichtlich der Prognose untersucht worden. Neben einer Korrelation von MAGE-A11-Expression und HER-2-Expression, zeigte sich in der Gruppe der MAGE-A11-positiven Brustkarzinome ein signifikant kürzeres Überleben⁷⁰. Dieses Ergebnis konnte in der bereits erwähnten, von JIA ET AL. in im Jahre 2020 veröffentlichten Studie für Kopf-Hals-Tumore bestätigt werden. Hier zeigte sich ein signifikant schlechteres 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit einem MAGE-A11-positiven ($n = 55$) Kopf-Hals-Tumor im Vergleich zu Patienten ohne MAGE-A11-Nachweis ($n = 20$). Dieser Effekt war besonders deutlich nach 2 Jahren, wo 50 % der MAGE-A11-positiven Patienten im Gegensatz zu 5 % der MAGE-A11-negativen Patienten

verstorben waren⁶⁴.

Es häufen sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt somit Ergebnisse, die MAGE-A11-Aufkommen als negativen Prognosefaktor bei Karzinomen sehen. Mehrfach wurde bereits von einer zunehmenden Malignität, kürzerem Überleben, wahrscheinlicheren Metastasierung und nun auch erstmalig von einer zunehmenden Resistenz gegenüber einem Chemotherapeutikum berichtet. MAGE-A11, als Subtyp von MAGE-I scheint eine zentrale Rolle in der Gruppe der CTAs (*Cancer/testis antigens*) einzunehmen. Die Forschung steht hier jedoch noch am Anfang. Die meisten Forschungsergebnisse konnte bisher lediglich eine Korrelation zwischen MAGE-A11-Expression und dem jeweilig untersuchten Tumor-Zellverhalten (Invasivität, Zellproliferation, Metastasierungsrate, etc.) nachweisen. Die intrazelluläre Mechanismen, Interaktionen und Signalketten, welche zur beobachteten zunehmenden Malignität der Zellen führen, sind zum jetzigen Zeitpunkt noch weitestgehend unbekannt und bedürfen in den nächsten Jahren zusätzlicher Forschung.

Im Gegensatz zu den Kopf-Hals-Tumoren sind die intrazellulären Mechanismen an denen MAGE-A11 beteiligt ist, am Prostata-Karzinom bereits besser erforscht. Hier scheint es sich beim Subtyp MAGE-A11 um einen Ko-Regulator bei der Transkription des Androgen-Rezeptors zu handeln. MAGE-A11 nimmt Einfluss auf androgen-abhängiges Zellwachstum durch Aktivierung des Ko-Faktors (SRC)/p160^{50,59,61,71}. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass MAGE-A11 als Proto-Onkogen durch Bindung an das *retinoblastoma-related* Protein p107 jenes aktiviert und so ebenfalls die Transkription am Androgen-Rezeptor anregt. MAGE-A11 scheint zudem zusammen mit dem Androgen-Rezeptor das Protein Follistatin-like 1 (FSTL1) hoch zu regulieren und so zum Progress des Prostatakarzinoms beizutragen^{72,73}.

Welcher Mechanismus zur Aktivierung von MAGE-A11 im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus führt, untersuchten LIU ET AL. in einer 2017 veröffentlichten Studie. Sie kamen hierin zu dem Ergebnis, dass MAGE-A11 durch einen DNA-Demethylierungsprozess sowie Acetylierung und Methylierung von Histonen aktiviert wird^{74,75}.

Der klinische Einsatz von Cisplatin bei soliden Tumoren ist breit. Beispielsweise findet Cisplatin neben Kopf-Hals-Karzinomen auch Verwendung bei Hoden-, Blasen-, Ovarial- und Lungen-Karzinomen. Zwar kommt es mitunter zu Cisplatin-Resistenz von Therapiebeginn an, häufiger jedoch entwickelt sich diese erst nach anfänglichem Ansprechen der Therapie⁷⁶⁻⁷⁸. Mechanismen, die zur Cisplatin-Resistenz führen sind vielfältig. Galluzzi et al. formulierten in einem 2012 veröffentlichtem Review eine Übersicht und Klassifizierung, welche Resistenzmechanismen unterscheiden, die die Cisplatin-DNA-Bindung (*pre-target resistance*) verhindern, die mit der erfolgreichen Bindung im Zusammenhang stehen (*on-target resistance*), die den durch Cisplatin-Bindung ausgelösten Apoptose-Signalweg unterbinden (*post-target resistance*) und die Signalwege ohne bekannten Cisplatin-Zusammenhang behindern (*off-target resistance*)⁷⁹. An welchen Resistenzmechanismen das in dieser Studie untersuchte MAGE-A11 beteiligt ist, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unklar und bedarf weiterer intensiver Forschung.

7 Zusammenfassung

Bei der Gruppe der Kopf-Hals-Karzinome handelt es sich um die weltweit sechsthäufigste Tumorentität. Therapiekonzepte beinhalten Operation, Radiatio und Chemotherapie, für deren Erfolg besonders eine Diagnose in einem frühen Tumorstadium entscheidend ist. Die Chemotherapie, welche bei den Kopf-Hals-Tumoren im kurativen Setting besonders zusammen mit der Bestrahlung (Radiochemotherapie) Anwendung findet, ist oftmals mit starken Nebenwirkungen für den Patienten verbunden und bedarf daher einer strengen Auswahl an Patienten, orientierend am potentiellen Therapieerfolg. In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der Chemotherapie mit Cisplatin und 5-Fluoruracil in Abhängigkeit zur Tumor-Antigen-Expression von MAGE-A (MAGE-A1 bis MAGE-A12) untersucht, mit besonderem Fokus auf MAGE-A11. Hierfür wurden folgende Zelllinien des oralen und pharyngealen Plattenepithelkarzinoms verwendet: SCC9, SCC25, Detroit562, FaDu.

- Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle vier untersuchten Zelllinien ein breites Expressionsspektrum an MAGE-A-Tumorantigenen aufweisen und mindestens sieben der elf bekannten Subtypen exprimieren. Die Zelllinie SCC9 zeigte alle Subtypen, MAGE-A1 und MAGE-A10 konnten nur hier nachgewiesen werden. SCC25 und Detroit562 exprimierten je acht Subtypen (MAGE-A2, -A3, -A5, -A6, -A8, -A9, -A11 und -A12). In der Zelllinie FaDu ließen sich sieben MAGE-A-Tumorantigene nachweisen, für MAGE-A4 wurde hier das über alle Zelllinien hinweg höchstgemessene Expressionslevel erreicht. Der im Fokus stehende Subtyp MAGE-A11 kam in allen 4 Zelllinien vor und wurde von SCC9 am stärksten und FaDu und Detroit562 am schwächsten exprimiert.
- Alle Zelllinien reagierten auf die 48-stündige Inkubation mit Cisplatin und 5-Fluoruracil mit typischem sigmoidalen Verlauf in den Dosis-Wirkungskurven. Die kalkulierte halbmaximale Konzentration (EC50-Wert) ergab für jede Zelllinie ein individuelles Ansprechen auf die Therapie. Detroit562 und FaDu reagierten am sensibelsten auf Cisplatin, wohingegen bei SCC9 eine 23-fach höhere

- Konzentration zum Erreichen des halbmaximalen Effekts benötigt wurde. Auf 5-Fluoruracil reagierte FaDu mit Abstand am sensibelsten, die Zelllinie SCC9 erreichte erst nach 48-facher 5-Fluoruracil-Konzentration denselben Effekt.
- Im Rahmen der Korrelationsanalyse nach Spearman konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen MAGE-A11-Expression und geringer Cisplatin-Wirksamkeit hergestellt werden ($p = 0.0417$). Für die Therapie mit 5-Fluoruracil und MAGE-A-Expression zeigte sich keine signifikante Korrelation.
 - Es gelang die erfolgreiche Generierung einer MAGE-A11 überexprimierenden Zelllinie FaDu+ aus FaDu, welche zuvor nur gering MAGE-A11 exprimiert hatte. Sowohl in qPCR und Westernblot konnten erhöhte MAGE-A11-Level nachgewiesen werden. Die Überexpression mit MAGE-A11 hatte keinen Einfluss auf das Zellproliferationsverhalten der Zelllinie.
 - Die Zelllinie FaDu+ mit Überexpression von MAGE-A11 zeigte durchschnittlich ein um 9 % schlechteres Ansprechen auf Cisplatin als die Kontrollzelllinie. Somit konnte eine von MAGE-A11 verursachte Cisplatin-Resistenz nachgewiesen werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

°	Grad		ohne MAGE-A11-Überexpression
° C	Grad Celcius	FaDu+	Klonierte Zelllinie FaDu mit MAGE-A11-Überexpression
µg	Mikrogramm		
µl	Mikroliter	FCS	fetales Kälberserum
µm	Mikrometer	FSTL1	Engl. <i>Follistatin-like protein</i>
µM	Mikromol	g	Gramm
5-FU	5-Fluoruracil	h	Stunde(n)
A	Ampere	HCl	Salzsäure
Abb.	Abbildung	HPV	Humanes-Papilloma-Virus
APS	Ammoniumperoxodisulfat	J	Jahre
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	kb	Kilobasenpaar
bp	Basenpaar	l	Liter
c	Konzentration	M	Stoffmengenkonzentration Mol
Cat.-Nr.	Katalog-Nummer	mA	Miliampere
cDNA	Engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS	MAGE	Melanoma-associated Antigenes
Cis	carcinoma in situ	MCS	Engl. <i>multiple cloning site</i>
cm ²	Quadratzentimeter	mg	Miligramm
CMV	Zytomegalievirus	MHD	Engl. <i>MAGE homology domain</i>
CTA	Engl. <i>Cancer/testis antigenes</i>	min	Minute(n)
d	Tag(e)	Mio.	Million
Diff.	Differenz	ml	Mililiter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	mRNA	Engl. <i>messenger-RNA</i>
DNA	Engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure	mV	Milivolt
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution	n	Anzahl der Paare
E. coli	Escherichia coli	ng	Nanogramm
EBV	Epstein-Barr-Virus	nm	Nanometer
EC50	EC50-Wert, halbmaximale Wert	OPMD	Engl. <i>oral potentially malignant disorders</i> , Präkanzerosen oraler Karzinome
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	p	Signifikanzwert
et al.	Lat. <i>et alii</i> (m), <i>et aliae</i> (f), und andere	PCR	Engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
FaDu-	Klonierte Kontrollzelllinie FaDu	qPCR	Engl. <i>Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction</i>

R ²	Bestimmtheitsmaß R ²
rel.	relativ
RNA	Engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
SCC	Engl. <i>Squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tis	Tumor in situ
TNM	Tumor Nodus Metastase, Tumorklassifikationssystem
TRIS	Trishydroxymethylaminomethane
U	Atomare Maßeinheit, 1 U = 1 g/mol
UICC	Engl. <i>Union for international cancer control</i>
UV	Ultra-Violett, gemeint ultraviolette Strahlung
V	Volt
WHO	Engl. <i>world health organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
x	-fach, z.B. „2x“ zweifach

9 Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:87-108. doi:10.3322/caac.21262
2. Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. *Bericht zum Krebsgeschehen Deutschl 2016 Zent für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg) Berlin, 2016.* 2016:16-77. doi:10.17886/rkipubl-2016-014
3. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.01.016
4. Bayer O, Krüger M, Koutsimpelas D, et al. Veränderung von Inzidenz und Mortalität von Kopf-Hals-Malignomen in Rheinland-Pfalz, 2000–2009. *Laryngo-Rhino-Otologie.* 2014;94(07):451-458. doi:10.1055/s-0034-1390455
5. 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. doi:10.1200/JCO.2013.50.3870
6. Spence T, Bruce J, Yip K, Liu F-F. HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel).* 2016;8(8):75. doi:10.3390/cancers8080075
7. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, et al. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide : A Systematic Review Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide : A Systematic Review. 2005;14(February):467-475.
8. Hashibe M, Brennan P, Chuang S -c., et al. Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541-550. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0347
9. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, Vecchia C La. *Alcohol and Tobacco Use, and Cancer Risk for Upper Aerodigestive Tract and Liver.* Vol 17. Wolters

- Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
<https://journals.lww.com/eurjcancerprev>.
10. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, Vecchia C La. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health*. 2006.
 11. Blot WJ, Mclaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. 1988:3282-3287.
 12. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262.
 13. Gordon R. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. *Semin Oncol Nurs*. 2013;29(3):160-169. doi:10.1016/j.soncn.2013.06.002
 14. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):379-396. doi:10.1016/j.soc.2015.03.001
 15. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3235-3242. doi:10.1200/JCO.2015.61.6995
 16. Young D, Xiao CC, Murphy B, Moore M, Fakhry C, Day TA. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol*. 2015;51(8):727-730. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.03.015
 17. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region. Eisele DW, ed. *Head Neck*. 2013;35(5):747-755. doi:10.1002/hed.22015
 18. Chelimo C, Wouldes TA, Cameron LD, Elwood JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *J Infect*. 2013;66(3):207-217. doi:10.1016/J.JINF.2012.10.024
 19. Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, et al. High-risk HPV types and head and neck

- cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(7):1653-1661. doi:10.1002/ijc.28811
20. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):612-619. doi:10.1200/JCO.2007.14.1713
21. Typ H. Tabelle 1 : Impfkalender (Standardimpfungen) für Säuglinge , Kinder , Jugendliche und Erwachsene Impfung Alter in Wochen Tetanus Diphtherie Pertussis Hib Alter in Monaten G2 Alter in Jahren A1 A2 Poliomyelitis Hepatitis B Pneumokokken Rotaviren Meningok. 1970:1970.
22. Hashim D, Sartori S, Brennan P, et al. The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1619-1625. doi:10.1093/annonc/mdw224
23. Velleuer E, Dietrich R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr*. 2014;1(1). doi:10.1186/s40348-014-0009-8
24. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck*. 2020;42(3):539-555. doi:10.1002/hed.26006
25. Lupus D. Orale Leukoplakie / Erythroplakie. *Clin Oral Investig*. 2005:1-7.
26. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van Der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):575-580. doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x
27. Amagasa T, Yamashiro M, Uzawa N. Oral premalignant lesions: From a clinical perspective. *Int J Clin Oncol*. 2011;16(1):5-14. doi:10.1007/s10147-010-0157-3
28. Farah CS, Woo S Bin, Zain RB, Sklavounou A, McCullough MJ, Lingen M. Oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Int J Corros*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/853479

29. Wittekind, Christian; Meyer H-J. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2010.
30. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(7):40. doi:10.1007/s11864-017-0484-y
31. Leitlinienprogramm Onkologie. Leitlinienreport der S3 Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [Online im Internet] http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007_1000Lm_S3_Mundhoehlenkarzinom_112012-verlaengert.pdf [Stand 28.12.2015]. 2012;(September):1-119.
32. Pignon J-P, le Maître A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009;92(1):4-14. doi:10.1016/j.radonc.2009.04.014
33. Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C, Dietz K. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer*. 2006;6:28. doi:10.1186/1471-2407-6-28
34. Pignon J., Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta analysis of chemotherapy on head and neck cancer. *Cancer/Radiothérapie*. 2001;5(2):201-202. doi:10.1016/s1278-3218(00)00073-1
35. Ang KK, Chen A, Curran WJ, et al. Head and neck carcinoma in the United States: first comprehensive report of the Longitudinal Oncology Registry of Head and Neck Carcinoma (LORHAN). *Cancer*. 2012;118(23):5783-5792. doi:10.1002/cncr.27609
36. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular

- mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
37. Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, et al. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ros production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoS One.* 2015;10(2). doi:10.1371/journal.pone.0115686
38. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991;254(5038):1643-1647. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840703>. Accessed July 31, 2018.
39. Whitehurst AW. Cause and Consequence of Cancer / Testis Antigen Activation in Cancer. 2014. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140326
40. Zhai X, Xu L, Zhang S, Zhu H, Mao G, Huang J. High expression levels of MAGE-A9 are correlated with unfavorable survival in lung adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(4):4871-4881. doi:10.18632/oncotarget.6741
41. Hou S, Sang M, Geng C, et al. Expressions of MAGE-A9 and MAGE-A11 in Breast Cancer and their Expression Mechanism. *Arch Med Res.* 2014;45(1):44-51. doi:10.1016/j.arcmed.2013.10.005
42. Xu Y, Wang C, Zhang Y, Jia L, Huang J. Overexpression of MAGE-A9 Is Predictive of Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Sci Rep.* 2015;5(1):12104. doi:10.1038/srep12104
43. Yin B, Zeng Y, Liu G, Wang X, Wang P, Song Y. MAGE-A3 is highly expressed in a cancer stem cell-like side population of bladder cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(6):2934-2941. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031712>. Accessed July 31, 2018.
44. Noh ST, Lee HS, Lim SJ, et al. MAGE-A1–6 expression in patients with head and neck squamous cell carcinoma: impact on clinical patterns and oncologic

- outcomes. *Int J Clin Oncol*. 2016;21(5):875-882. doi:10.1007/s10147-016-0989-6
45. Chomez P, Backer O De, Bertrand M, Plaen E De, Boon T, Lucas S. An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family 1. *Cance Res*. 2001;61(August):5544-5551. doi:10.1126/science.1840703
46. Müller-Richter UDA, Dowejko A, Zhou W, Reichert TE, Driemel O. Different expression of MAGE-A-antigens in foetal and adult keratinocyte cell lines. *Oral Oncol*. 2008;44(7):628-633. doi:10.1016/j.oraloncology.2007.08.007
47. Meek DW, Marcar L. MAGE-A antigens as targets in tumour therapy. *Cancer Lett*. 2012;324(2):126-132. doi:10.1016/J.CANLET.2012.05.011
48. Laban S, Giebel G, Klümper N, et al. MAGE expression in head and neck squamous cell carcinoma primary tumors, lymph node metastases and respective recurrences-implications for immunotherapy. *Oncotarget*. 2017;8(9):14719-14735. doi:10.18632/oncotarget.14830
49. Hou S, Sang M, Zhao L, Hou R, Shan B. The expression of MAGE-C1 and MAGE-C2 in breast cancer and their clinical significance. *Am J Surg*. 2016;211(1):142-151. doi:10.1016/j.amjsurg.2015.05.028
50. Minges JT, Grossman G, Zhang P, Kafri T, Wilson EM. Post-translational down-regulation of melanoma antigen-A11 (MAGE-A11) by human p14-ARF tumor suppressor. *J Biol Chem*. 2015;290(41):25174-25187. doi:10.1074/jbc.M115.663641
51. Wu J, Wang J, Shen W. Identification of MAGEA12 as a prognostic outlier gene in gastric cancers. *Neoplasma*. 2017;64(02):238-243. doi:10.4149/neo_2017_210
52. Chen X, Wang L, Yue D, et al. Correlation between the high expression levels of cancer-germline genes with clinical characteristics in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2017;32(8):793-803. doi:10.14670/HH-11-847

53. HASHIMOTO R, KANDA M, TAKAMI H, et al. Aberrant expression of melanoma-associated antigen-D2 serves as a prognostic indicator of hepatocellular carcinoma outcome following curative hepatectomy. *Oncol Lett.* 2015;9(3):1201-1206. doi:10.3892/ol.2014.2823
54. Sang M, Wang L, Ding C, et al. Melanoma-associated antigen genes - An update. *Cancer Lett.* 2011;302(2):85-90. doi:10.1016/j.canlet.2010.10.021
55. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(8):615-625. doi:10.1038/nrc1669
56. De Plaen E, Arden K, Traversari C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics.* 1994;40(5):360-369. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927540>. Accessed July 31, 2018.
57. Rogner UC, Wilke K, Steck E, Korn B, Poustka A. The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics.* 1995;29(3):725-731. doi:10.1006/geno.1995.9945
58. Hartmann S, Kriegebaum U, K?chler N, et al. Correlation of MAGE-A tumor antigens and the efficacy of various chemotherapeutic agents in head and neck carcinoma cells. *Clin Oral Investig.* 2014;18(1):189-197. doi:10.1007/s00784-013-0936-0
59. Willett CS, Wilson EM. Evolution of Melanoma Antigen-A11 (MAGEA11) During Primate Phylogeny. *J Mol Evol.* 2018;86(3-4):240-253. doi:10.1007/s00239-018-9838-8
60. Minges JT, Grossman G, Zhang P, Kafri T, Wilson EM. Post-translational Down-regulation of Melanoma Antigen-A11 (MAGE-A11) by Human p14-ARF Tumor Suppressor. *J Biol Chem.* 2015;290(41):25174-25187. doi:10.1074/jbc.M115.663641
61. Askew EB, Bai S, Parris AB, Minges JT, Wilson EM. Androgen receptor regulation

- by histone methyltransferase Suppressor of variegation 3-9 homolog 2 and Melanoma antigen-A11. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;443:42-51. doi:10.1016/j.mce.2016.12.028
62. Sang M, Gu L, Liu F, et al. Prognostic Significance of MAGE-A11 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Identification of Related Genes Based on DNA Microarray. *Arch Med Res.* 2016;47(3):151-161. doi:10.1016/j.arcmed.2016.06.001
63. Xia LP, Xu M, Chen Y, Shao WW. Expression of MAGE-A11 in breast cancer tissues and its effects on the proliferation of breast cancer cells. *Mol Med Rep.* 2013;7(1):254-258. doi:10.3892/mmr.2012.1126
64. Jia S, Zhang M, Li Y, Zhang L, Dai W. MAGE-A11 Expression Predicts Patient Prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2020;12:1427-1435. doi:10.2147/CMAR.S237867
65. Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, et al. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2011;128(11):2625-2634. doi:10.1002/ijc.25607
66. Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, et al. MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int J Mol Med.* 2015;35(6):1675-1682. doi:10.3892/ijmm.2015.2174
67. Ries J, Mollaoglu N, Toyoshima T, et al. A novel multiple-marker method for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Dis Markers.* 2009;27(2):75-84. doi:10.3233/DMA-2009-0652
68. Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, et al. Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer.* 1995;64(5):304-308. doi:10.1002/ijc.2910640504
69. Figueiredo DLA, Mamede RCM, Proto-Siqueira R, Neder L, Silva WA, Zago MA. Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas.

- Head Neck*. 2006;28(7):614-619. doi:10.1002/hed.20380
70. Lian Y, Sang M, Ding C, et al. Expressions of MAGE-A10 and MAGE-A11 in breast cancers and their prognostic significance: A retrospective clinical study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(3):519-527. doi:10.1007/s00432-011-1122-x
71. Bai S, He B, Wilson EM. Melanoma Antigen Gene Protein MAGE-11 Regulates Androgen Receptor Function by Modulating the Interdomain Interaction. *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1238-1257. doi:10.1128/mcb.25.4.1238-1257.2005
72. Su S, Parris AB, Grossman G, Mohler JL, Wang Z, Wilson EM. Up-Regulation of Follistatin-Like 1 By the Androgen Receptor and Melanoma Antigen-A11 in Prostate Cancer. *Prostate*. 2017;77(5):505-516. doi:10.1002/pros.23288
73. Su S, Minges JT, Grossman G, Blackwelder AJ, Mohler JL, Wilson EM. Proto-oncogene activity of melanoma antigen-A11 (MAGE-A11) regulates retinoblastoma-related p107 and E2F1 proteins. *J Biol Chem*. 2013;288(34):24809-24824. doi:10.1074/jbc.M113.468579
74. Sang M, Gu L, Liu F, et al. Prognostic Significance of MAGE-A11 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Identification of Related Genes Based on DNA Microarray. *Arch Med Res*. 2016;47(3):151-161. doi:10.1016/j.arcmed.2016.06.001
75. Liu S, Liu F, Huang W, et al. MAGE-A11 is activated through TFCP2/ZEB1 binding sites de-methylation as well as histone modification and facilitates ESCC tumor growth. *Oncotarget*. 2018;9(3):3365-3378. doi:10.18632/oncotarget.22973
76. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2010;1806(2):172-182. doi:10.1016/j.bbcan.2010.07.004
77. Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*. 2000;59(SUPPL. 4):9-17. doi:10.2165/00003495-200059004-00002
78. Ozols RF. Ovarian cancer: new clinical approaches. *Cancer Treat Rev*.

1991;18(SUPPL. A):77-83. doi:10.1016/0305-7372(91)90027-W

79. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012;31:1869-1883. doi:10.1038/onc.2011.384

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 96-WELL-PLATTE. INHIBITIONSVERSUCH HIER AM BEISPIEL VON CISPLATIN: STARTKONZENTRATION 50 μ M, VERDÜNNUNGSREIHE MIT DEM FAKTOR 1:3. ALLE WELLS AM RAND DER PLATTE BLIEBEN FREI, WELL E12, F12, G12 ENTHIELTEN DIE TOTPROBE MIT 10 % SALZSÄURE.	20
ABBILDUNG 3 EXPRESSIONSPROFIL DER ZELLINIE SCC9 FÜR MAGE-A-TUMORANTIGENE IN RELATION ZUM KONTROLLGEN B-AKTIN. SEGMENTIERTE Y-ACHSE ZUR BESSEREN ÜBERSICHT. STANDARDABWEICHUNG DURCH FEHLERBALKEN DARGESTELLT.	34
ABBILDUNG 4 EXPRESSIONSPROFIL DER ZELLINIE SCC25 FÜR MAGE-A-TUMORANTIGENE IN RELATION ZUM KONTROLLGEN B-AKTIN. STANDARDABWEICHUNG DURCH FEHLERBALKEN DARGESTELLT.	35
ABBILDUNG 5 EXPRESSIONSPROFIL DER ZELLINIE DETROIT562 FÜR MAGE-A-TUMORANTIGENE IN RELATION ZUM KONTROLLGEN B-AKTIN. STANDARDABWEICHUNG DURCH FEHLERBALKEN DARGESTELLT.	36
ABBILDUNG 6 EXPRESSIONSPROFIL DER ZELLINIE FADu FÜR MAGE-A-TUMORANTIGENE IN RELATION ZUM KONTROLLGEN B-AKTIN. SEGMENTIERTE Y-ACHSE ZUR BESSEREN ÜBERSICHT. STANDARDABWEICHUNG DURCH FEHLERBALKEN DARGESTELLT.	37
ABBILDUNG 7 EXPRESSIONSPROFILE MAGE-A1 BIS -A6 IN RELATION ZU KONTROLLGEN B-AKTIN. TEILWEISE SEGMENTIERTE Y-ACHSE ZUR BESSEREN ÜBERSICHT. STANDARDABWEICHUNG DURCH FEHLERBALKEN DARGESTELLT.	39
ABBILDUNG 8 EXPRESSIONSPROFILE MAGE-A8 BIS-A12 IN RELATION ZU KONTROLLGEN B-AKTIN. TEILWEISE SEGMENTIERTE Y-ACHSE ZUR BESSEREN ÜBERSICHT. STANDARDABWEICHUNG DURCH FEHLERBALKEN DARGESTELLT.	40
ABBILDUNG 9 DOSIS-WIRKUNGSKURVEN VON CISPLATIN NACH 48 H INKUBATION	42
ABBILDUNG 10 DOSIS-WIRKUNGSKURVEN VON 5-FU NACH 48 H INKUBATION	43
ABBILDUNG 11 NACHWEIS DER MAGE-A11 ÜBEREXPRESSION IN KLONIRTER FADu+ DURCH QPCR ANHAND VON MRNA-LEVEL	48
ABBILDUNG 12 MAGE-A11 EXPRESSION IN DEN ZELLINIEN SCC9, SCC25, DETROIT562, FADu (1. REIHE) SOWIE MAGE-A11 EXPRESSION NACH KLONIERUNG MIT KONTROLLPLASMID (FADu-) UND MIT MAGE-A11 (FADu+) (2. REIHE)	48
ABBILDUNG 13 NACHWEIS DER ZELLPROLIFERATION NACH 96-STÜNDIGER INKUBATION DURCH MESSUNG DER OPTISCHEN DICHTEN VON FADu+ UND KONTROLLE.	50
ABBILDUNG 14 WIRKSAMKEIT VON CISPLATIN AUF FADu+ MIT MAGE-A11 ÜBEREXPRESSION IM VERGLEICH ZUR KONTROLLZELLINIE.	51
ABBILDUNG 15 WIRKSAMKEIT VON 5-FU IN KLONIRTER FADu+ IM VERGLEICH ZU KONTROLLZELLINIE	53

10.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 TNM-KLASSIFIKATION ORALES PLATTENEPITHELKARZINOM	4
TABELLE 2 UICC-STADIEN-EINTEILUNG DES ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOMS.....	4
TABELLE 3 IN DIESER ARBEIT VERWENDETE CHEMOTHERAPEUTIKA CISPLATIN UND 5-FLUORURACIL	6
TABELLE 4 ZELLINIEN	10
TABELLE 5 PUFFER, MEDIEN UND REAGENZIEN.....	10
TABELLE 6 COMMERCIAL KITS	12
TABELLE 7 qPCR-PRIMER	13
TABELLE 8 ANTIKÖRPER WESTERNBLOT.....	13
TABELLE 9 GERÄTE.....	13
TABELLE 10 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	15
TABELLE 11 SOFTWARE.....	15
TABELLE 12 ZELLINIEN UND ENTNAHMEORT	17
TABELLE 13 ZELLMEDIEN UND ZUSÄTZE.....	17
TABELLE 14 ZUSAMMENSETZUNG DER KRISTALLVIOLETTLÖSUNG.....	20
TABELLE 15 ZYKLEN, DAUER UND TEMPERATUR DER QPCR	23
TABELLE 16 ZUSAMMENSETZUNG DER IM WESTERNBLOT VERWENDETEN PUFFER	24
TABELLE 17 ZUSAMMENSETZUNG DER IM WESTERNBLOT VERWENDETEN GELE.....	25
TABELLE 18 RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN ECORI UND XHOI	28
TABELLE 19 ZUSAMMENSETZUNG DER FÜR DIE GELEKTROPHORESE VERWENDETEN PUFFER.....	28
TABELLE 20 EXPRESSIONSLEVEL DER MAGE-A-TUMORANTIGENE IN SCC9	34
TABELLE 21 EXPRESSIONSLEVEL DER MAGE-A-TUMORANTIGENE IN SCC25	35
TABELLE 22 EXPRESSIONSLEVEL DER MAGE-A-TUMORANTIGENE IN DETROIT562.....	36
TABELLE 23 EXPRESSIONSLEVEL DER MAGE-A-TUMORANTIGENE IN FADU	38
TABELLE 24 LOGEC50, EC50 UND R ² DER MONOTHERAPIE MIT CISPLATIN.....	42
TABELLE 25 LOGEC50, EC50 UND R ² DER MONOTHERAPIE MIT 5-FU	44
TABELLE 26 KORRELATIONSANALYSE NACH SPEARMAN ZUR UNTERSUCHUNG EINES ZUSAMMENHANGS ZWISCHEN MAGE- A-SUBTYPEN UND EC50-WERTEN DER ZELLINIEN NACH CISPLATIN-MONOTHERAPIE.....	45
TABELLE 27 KORRELATIONSANALYSE NACH SPEARMAN ZUR UNTERSUCHUNG EINES ZUSAMMENHANGS ZWISCHEN MAGE- A-SUBTYPEN UND EC50-WERTEN DER ZELLINIEN NACH 5-FU-MONOTHERAPIE.....	46
TABELLE 28 KORRELATIONSANALYSE IN TWO-TAILED T-TEST ZEIGT KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN FADU+ (MIT MAGE-A11-ÜBEREXPRESSION) UND KONTROLLE FADU- BEZÜGLICH DER ZELLPROLIFERATION NACH 96- STÜNDIGER INKUBATION.....	49
TABELLE 29 ANALYSE DER EINZELNEN KOLUMNEN DURCH <i>MULTIPLE-T-TEST</i> . WIRKSAMKEIT VON CISPLATIN IN FADU+ IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE FADU- NACH 48-STÜNDIGEM INHIBITIONSVERSUCH.	52
TABELLE 30 KORRELATIONSANALYSE IM <i>TWO-TAILED T-TEST</i> ZEIGT EINE SIGNIFIKANTE DIFFERENZ DER WIRKSAMKEIT VON	

CISPLATIN ZWISCHEN FADU+ UND DER KONTROLLE FADU- NACH 48-STÜNDIGEM INHIBITIONSVERSUCH. FÜR DIE WIRKSAMKEIT VON 5-FLUORURACIL KANN KEINE SIGNIFIKANTE DIFFERENZ GEFUNDEN WERDEN.....	52
TABELLE 31 ANALYSE DER EINZELNEN KOLUMNEN DURCH <i>MULTIPLE-T-TEST</i> . WIRKSAMKEIT VON 5-FU IN FADU+ IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE FADU- NACH 48-STÜNDIGEM INHIBITIONSVERSUCH IM INVITRO-MODELL.....	53

11 Publikationen

MAGE-A11 expression contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer.

Hartmann S, [Zwick L](#), Scheurer MJJ, Fuchs AR, Brands RC, Seher A, et al. Clin Oral Investig. 2018;22(3).

Melanoma-associated antigen A11 reduces erlotinib and afatinib efficacy in head and neck cancer. Hartmann S, [Zwick L](#), Maurus K, Fuchs AR, Brands RC, Seher A, et al. J

Cranio-Maxillofacial Surg. 2018;46(3)

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit hat eine Vielzahl von Personen beigetragen, denen ich zu großem Dank verpflichtet bin.

- Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler, Klinikdirektor der Mund-, Kiefer, und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik die vorliegende Arbeit anfertigen zu können. Ohne die Bereitstellung der Räumlichkeiten, des Labors, der Materialien und die Unterstützung des Klinikpersonals wäre dies nicht möglich gewesen.
- Herrn Prof. Dr. Dr. Urs Müller-Richter, Leitender Oberarzt der Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie danke ich, dass er mich auf das interessante Forschungsgebiet im Bereich des oralen Plattenepithelkarzinoms aufmerksam gemacht hat und die Vermittlung in die Arbeitsgruppe übernahm.
- Meinem Betreuer Herrn Dr. Dr. Stefan Hartmann, Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie bin ich zu allergrößtem Dank für die hervorragende Betreuung verpflichtet. Die Zusammenarbeit war stets geprägt von Zuverlässigkeit und Unterstützung, trotz des stressigen Klinikalltags fand er immer Zeit mir meine Fragen zu beantworten und beratend zur Seite zu stehen.
- Herrn Dr. Axel Seher danke ich recht herzlich für die naturwissenschaftliche Begleitung meiner Arbeit. Ohne die vielen wichtigen Impulse und die Hilfe bei der naturwissenschaftlichen und technischen Umsetzung hätte diese Arbeit nicht gelingen können. Seine Ratschläge zur Versuchsoptimierung erwiesen sich als äußerst hilfreich und seine Bürotür war immer offen für mich.
- Besonders danken möchte ich Frau Margit Schleyer, von der ich alles Nötige über Zellpflege und Versuchsdurchführung gelernt habe. Die Zusammenarbeit war stets freundlich und ich habe gerne die Tage mit ihr im Labor verbracht.
- Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und natürlich Andreas für die jahrelange liebevolle Unterstützung und Motivation. Ohne sie wäre neben dem zurückliegenden Studium auch das Gelingen der Promotion nicht möglich gewesen. Ich bin sehr dankbar dafür, von vielen so wundervollen Menschen umgeben zu sein.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Leonie Zwick

Bildungsweg

11/2018 – laufend

Assistenzärztin in der Weiterbildung zur Viszeralchirurgin

Allgemein-, Viszeral-, Gefäß-, Thorax und
Kinderchirurgie, Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt,
Chefarzt Prof. Dr. Detlev Meyer

06/2018 – laufend

Promotionsstudium

Thema: „Die Wirksamkeit von Cisplatin und 5-
Fluoruracil im oralen Plattenepithelkarzinom in
Abhängigkeit von MAGE-Tumorantigen-Expression mit
besonderem Fokus auf MAGE-A11“, Klinik und
Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, Direktor:
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

2018	Publikationen <i>Melanoma-associated antigen A11 reduces erlotinib and afatinib efficacy in head and neck cancer.</i> Hartmann S, <u>Zwick L</u> , et al. J Cranio-Maxillofacial Surg. 2018;46(3). <i>MAGE-A11 expression contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer.</i> Hartmann S, <u>Zwick L</u> , et al. Clin Oral Investig. 2018;22(3).
07/2018	Approbation als Ärztin
04/2011 – 06/2018	Studium der Humanmedizin Abschluss 06/2018 Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
09/2015 – 01/2016	Erasmus - Auslandssemester Victor-Babeş-Universität, Timișoara, Rumänien
09/2001 – 07/2010	Hariolf-Gymnasium, Ellwangen
09/1997 – 07/2001	Karl-Stirner-Grundschule, Rosenberg

Studienbegleitende Praktika

Praktisches Jahr:

12/2017 – 04/2018	Wahlfach: HNO Universitätsklinikum Würzburg
09/2017 – 12/2017	Innere Medizin Caritas-Krankenhaus, Bad Mergentheim
05/2017 – 09/2017	Chirurgie Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	C1
Latein	Großes Latinum
Rumänisch	B1
Deutsche Gebärdensprache	Grundkurs + Aufbaukurs 1 10/2014 – 06/2015

Mitgliedschaften

Bayerische Landesärztekammer

Ärztlicher Kreisverband Schweinfurt – Hassberge

Marburger Bund Bayern

Schwäbisch Gmünd, den 10.03.2021