

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

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

**Inhibitoren des NF- κ B pathways zur *in vitro* Blockade der Inflammation und
proapoptotischen Sensitivierung des oralen Plattenepithelkarzinoms für den
prospektiven Einsatz in der Tumorthapie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Dr. med. dent. Mario Joachim Johannes Scheurer
aus Offenburg

Würzburg, April 2021

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Roman C. Brands

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2022

Der Promovend ist Arzt und Zahnarzt

Meiner geliebten Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS PLATTENEPITHELKARZINOM DER KOPF-HALS-REGION	1
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE	1
1.1.2	ÄTIOLOGIE	1
1.1.3	KARZINOGENESE	2
1.2	THERAPIE DES HNSCC	2
1.2.1	KONVENTIONELLES KONZEPT	2
1.2.2	MODERNE ANSÄTZE DER ZIELGERICHTETEN TUMORTHERAPIE	3
1.3	TUMORIMMUNOLOGIE	4
1.3.1	WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN TUMORZELLE UND TUMORMIKROUMGEBUNG	5
1.3.2	NF- κ B PATHWAY	6
1.3.2.1	Der klassische Signalweg	7
1.3.2.2	Der alternative Signalweg	9
1.3.2.3	Der TNF- α – NF- κ B – Interleukin-Loop als mögliche Ursache für Autoinflammation und Therapieresistenz solider Malignome	11
1.4	TNF-REZEPTOR ALS AUSGANG DIVERGENTER SIGNALTRANSDUKTION	13
1.5	DER PROGRAMMIERTE ZELLTOD	14
1.5.1	APOPTOSE	15
1.5.2	CROSSTALK ZWISCHEN APOPTOSE UND INFLAMMATION	16
1.6	NF- κ B-PATHWAY-INHIBITION ZUR MOLEKULAREN TUMORTHERAPIE	17
1.6.1	GLUCOCORTICOIDE	17
1.6.2	MLN4924	18
1.6.3	QNZ	19
1.6.4	TPCA-1	19
1.7	ZIEL DER ARBEIT	20
2	MATERIAL & METHODEN	21
2.1	MATERIALIEN	21
2.1.1	GERÄTE	21
2.1.2	SOFTWARE	22
2.1.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	23
2.1.4	NÄHRMEDIEN	23
2.1.5	CHEMIKALIEN, INHIBITOREN & REAGENZIEN	24
2.1.5.1	Kits	25
2.1.6	LÖSUNGEN & PUFFER	25
2.1.7	OLIGONUKLEOTID-PRIMER	26
2.1.8	ZELLPANEL	26
2.2	METHODEN	27
2.2.1	ZELLKULTUR	27
2.2.1.1	Automatisierte Zellzählung	27
2.2.2	ZYTOTOXIZITÄTSASSAY	27
2.2.2.1	Kolorimetrische Quantifizierung der Zellviabilität	28
2.2.3	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY	28
2.2.3.1	sELISA zur Quantifizierung der Zytokinsekretion	29
2.2.3.1.1	Validierung des ELISA-Kits	29
2.2.3.1.2	sELISA zur Quantifizierung der IL-8-Sekretion	31

2.2.4	TWO-STEP REVERSE-TRANSCRIPTION QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION.....	31
2.2.4.1	Präparation der Gesamt-RNA.....	31
2.2.4.1.1	Spektralphotometrische Nukleinsäureanalyse.....	31
2.2.4.2	Synthese komplementärer DNA.....	32
2.2.4.3	Farbstoffbasierte real-time two-step RT-qPCR.....	33
2.2.5	FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING.....	33
2.2.5.1	Annexin V PE/7-AAD-Doppelmarkierung.....	34
2.2.5.1.1	Positionierung des Quadrantenmarkers.....	36
2.2.6	DATENAUSWERTUNG.....	37
2.2.6.1	Bestimmung der absoluten Zytokintiter.....	37
2.2.6.2	Standardisierung der Zytokintiter.....	37
2.2.6.3	$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression.....	38
2.2.6.4	Deskriptive Statistik der Zytotoxizitätsassays.....	41
2.2.6.5	Induktive Statistik zur Hypothesentestung.....	42
2.2.6.6	Berechnung der Halbhemmkonzentrationen.....	42
2.2.6.7	Interaktionsindex γ nach Tallarida.....	44
3	ERGEBNISSE.....	45
3.1	BASALE VERSUS STIMULIERTE SEKRETION VON IL-8.....	45
3.2	KONZEPT DER AUTOKRINEN NF- κ B-AKTIVIERUNG DURCH TNF- α	47
3.2.1	TNF- α -FREISETZUNG DES HNSCC.....	49
3.2.1.1	Basalsekretion.....	49
3.3	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT VON NF- κ B-INHIBITOREN.....	51
3.3.1	PROLIFERATIONSHEMMUNG DURCH NF- κ B-PATHWAY-INHIBITION.....	51
3.4	SUPPRESSION DER INFLAMMATION DURCH ZIELGERICHTETE INHIBITION DES NF- κ B PATHWAYS VON HNSCC-ZELLEN.....	53
3.4.1	WIRKSTOFFSPEZIFISCHE SENKUNG DER IL-8-SEKRETION.....	53
3.4.2	ANTIINFLAMMATORISCHE EFFEKTE.....	55
3.4.3	NF- κ B-INHIBITOREN HEMMEN DIE ZELLPROLIFERATION.....	57
3.4.3.1	TPCA-1 sensitiviert das HNSCC für den TNF- α -induzierten Zelltod.....	59
3.5	ANALYSE DER ZELLTODINDUKTION IN DER KOMBINATIONSTHERAPIE MIT NF- κ B-PATHWAY-INHIBITOREN.....	61
3.5.1	HETEROGENE SENSITIVIERBARKEIT FÜR DIE FASL-INDUZIERTER APOPTOSE.....	61
3.7	GENEXPRESSIONSANALYSE NF- κ B-ABHÄNGIGER ZIELGENE.....	67
3.7.1	HETEROGENE EXPRESSION NF- κ B-MEDIERTER ZIELGENE NACH TARGETIERTER PATHWAY-INHIBITION.....	67
3.8	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER APOPTOSEINDUKTION.....	69
3.8.1	ETABLIERUNG EINER VALIDEN APOPTOSE-BESTIMMUNG.....	69
3.8.2	APOPTOSEINDUKTION DURCH NF- κ B-PATHWAY-INHIBITOREN.....	71
4	DISKUSSION.....	73
4.1	“BACK TO VIRCHOW”.....	73
4.1.1	ANALYSE DES AUTOKRINEN DURCH TNF- α GETRIGGERTEN FEEDBACKMECHANISMUS ZUR INDUKTION DER INFLAMMATION IM HNSCC.....	73
4.1.2	IL-8 ALS BIOMARKER FÜR AUF INFLAMMATION EINGESTELLTE HNSCC-ZELLEN.....	74

4.2	VERGLEICHENDE ANALYSE DER NF- κ B-PATHWAY-INHIBITOREN FÜR DIE PROSPEKTIVE THERAPIE DES HNSCC	75
4.2.1	ANALYSE DER HOHEN WIRKSAMKEIT VON TPCA-1 IM HNSCC	75
4.2.1.1	Die Bedeutung von IKK β als target zielgerichteter Tumorthherapie.....	77
4.2.2	ANALYSE DER INSUFFIZIENT WIRKENDEN INHIBITOREN	78
4.2.2.1	Cortisol.....	78
4.2.2.2	MLN4924	78
4.2.2.3	QNZ	79
4.2.3	APOPTOSE ALS (NEBEN-) EFFEKT DER TARGETIERTEN NF- κ B-INHIBITION	80
4.3	DIE BEDEUTUNG DER REGULATION ONKOGENER NF- κ B-ZIELGENE	81
4.4	PERSPEKTIVEN ANTIINFLAMMATORISCHER TUMORTHERAPIEN.....	82
4.4.1	DIE BEDEUTUNG DES TME FÜR DIE AKTIVIERUNG DES NF- κ B PATHWAYS.....	83
4.4.2	MÖGLICHKEITEN NF- κ B-TARGETIERENDER STRATEGIEN FÜR DIE ONKOTHERAPIE.....	83
4.4.3	GEFAHREN NF- κ B-TARGETIERENDER TUMORTHERAPIEN	84
5	ZUSAMMENFASSUNG	86
6	LITERATURVERZEICHNIS	87

APPENDIX

I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS
III	TABELLENVERZEICHNIS
IV	DANKSAGUNG
V	LEBENS LAUF
VI	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSTEILNAHME
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG
	ANHANG

1 Einleitung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region

Kopf-Hals-Karzinome umfassen eine heterogene Gruppe solider Malignome und werden oberbegrifflich zum *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC) zusammengefasst. Neben Malignomen des Oropharynx und Larynx werden insbesondere Karzinome des Cavum oris hierunter subsumiert¹. Es handelt sich um invasive Tumoren ektodermalen Ursprungs mit keratogener Differenzierung und Tendenz zur lokoregionären Filialisierung².

1.1.1 Epidemiologie

Mit etwa 600.000 Neuerkrankungen und 6 % aller Tumorerkrankungen ist das HNSCC das sechsthäufigste Malignom weltweit³. Seine Mortalitätsrate liegt bei 350.000¹. In Deutschland erkranken aktuell ca. 17.500 Patienten mit etwa 7.200 Todesfällen pro Jahr. Für 2020 wurde ein Anstieg der Inzidenz um etwa 2.300 vorhergesagt⁴. Prognostisch überleben aufgrund hoher Rezidivraten nur 40 bis 50 % der Patienten die ersten 5 Jahre, was individuell stark stadienabhängig ist⁵. Die Mortalitätsraten werden auf die hohe Aggressivität, lokoregionäre Lymphknoten- bzw. Fernmetastasierung, Rezidive und Resistenzen des HNSCC gegenüber konventionellen Radio- bzw. Systemtherapien zurückgeführt^{6,7}.

1.1.2 Ätiologie

Das HNSCC unterliegt einer multifaktoriellen Genese. Orale Karzinome können spontan durch Mutationen wachstumsregulierender Gene entstehen. Außerdem sind genetische Dispositionen durch Fehlregulationen des Zellwachstums und von Reparaturmechanismen bekannt¹. Auch Defekte der körpereigenen Abwehr bei kompromittiertem Immunstatus durch Alkoholabusus oder Immunsuppression können die Eliminierung entarteter Zellen behindern^{8,9}. Hauptrisikofaktor ist der lebensstilabhängige Konsum von mukosaschädigenden Noxen. Hierbei sind Tabak und hochprozentige Alkoholika wesentliche Trigger in der Synkarzinogenese des HNSCC¹⁰. Vor allem der simultane Konsum bedingt eine Potenzierung des Erkrankungsrisikos¹¹. *Slaughter et al.* prägten hierfür den Begriff der Feldkanzerisierung, was syn- bzw. metachrone Tumoren beschreibt. Diese entstehen aufgrund alterierter Stammzellen als Folge anhaltender Noxenexposition des Aerodigestivtrakts¹². Daneben spielt die virale Genese mit onkogenen Viren eine

bedeutende Rolle. Das epitheliotrope humane Papillomavirus (HPV), insbesondere der Hochrisiko-Serotyp 16, lässt bei jungen, männlichen und sexuell aktiven Personen die Inzidenzraten ansteigen¹³. Weitere Risikofaktoren sind eine defizitäre Mundhygiene, mechanische Traumata, chronische Entzündungen, vitaminarme und fleischbetonte Ernährung, reduzierte Salivation, Seneszenz, ionisierende Strahlungen sowie allergisch-toxische Irritationen der oralen Mukosa^{14,15}.

1.1.3 Karzinogenese

Die Entstehung maligner Tumoren unterliegt einem mehrstufigen, sequenziellen Prozess¹⁶. Nach dem Stammzellkonzept beginnt die Transformation zur Tumor (-stamm)-zelle [*engl.: tumor stem cell (TSC)*] mit der Initiationsphase, wodurch sie Autonomie erlangt. Nach frustranen Reparatur- und Zerstörungsversuchen expandiert die TSC klonal in der Promotionsphase. Während der Progressionsphase vollzieht sich der Dignitätswechsel. Kennzeichnend sind irreversible Alterationen mit Karyotypeninstabilität, Anaplasie, aggressives und destruierendes Wachstum sowie Filialisierung^{17,18,19}. Die Proliferation der TSC bildet die Tumormasse und verleiht ihr unerschöpfliche Selbsterneuerungskapazität sowie die Fähigkeit zur Absiedelung, Rezidivierung und Therapieresistenz^{8,20}. Auch die enorm heterogene Tumorbilogie des HNSCC ist durch das Stammzellkonzept erklärbar. Durch den hierarchischen Aufbau des TSC-Proliferationskompartiments entstehen aufgrund diverser Mutationen stark entdifferenzierte Subklone mit vielfältigen Eigenschaften hinsichtlich Invasivität, Karyotyp, Proliferationsgeschwindigkeit, Metastasierungsfähigkeit, hormoneller Rezeptivität sowie Suszeptibilität gegenüber antineoplastischen Therapien^{20,21}.

1.2 Therapie des HNSCC

1.2.1 Konventionelles Konzept

Leitliniengemäß soll die Therapie des HNSCC in interdisziplinärer Zusammenarbeit, eingebettet in einem multimodalen Gesamtkonzept, erfolgen. Deren klassische Eckpfeiler aus Chirurgie, Strahlen- und eventuell Chemotherapie wurden um Immun-, Hormon- und zielgerichtete Therapien ergänzt. Das Vorgehen wird individuell anhand des Stagings adaptiert. Im Initialstadium stellt die chirurgische Intervention das Mittel der Wahl in kurativer Intention dar²². Zielsetzung dieser zumeist radikalen Therapie ist die Resektion des Tumorgewebes mit plastischer

Defektdeckung. Dabei ist der R0-Status einer der wichtigsten Prognosefaktoren bezüglich Gesamtüberlebenszeit und lokoregionärer Rezidivprophylaxe²³. Da 20 bis 50 % der Kopf-Hals-Tumoren okkult in zervikale Lymphstationen metastasieren, kann eine Lymphadenektomie indiziert sein^{24,25}. Bei fortgeschrittenem Tumorstadium und positivem N-Status ist die Strahlentherapie indiziert, die den zweiten Pfeiler darstellt. Das Standardprotokoll ist die alternierende hyperfraktionierte oder akzelerierte Radiatio. Durch primäre Bestrahlungen werden Überlebensraten von 30 % im Zeitraum von zwei Jahren erreicht²⁶. Vorteile bezüglich der Gesamtüberlebenszeit und lokoregionären Kontrolle zeigen systemisch wirksame Kombinationstherapien²⁷.

Vor allem die Induktionstherapie nach dem TPF-Schema aus Taxan, Platin und 5-Fluorouracil (5-FU) kombiniert mit der Radiatio hat sich bei Inoperabilität als vorteilhaft erwiesen^{28,29}. Die Systemtherapie zielt auf okkulte Tumorstammzellen sowie Fern- bzw. Mikrometastasen ab. Klassische Vertreter sind Platinderivate, 5-FU, Taxane, Methotrexat (MTX) sowie Vincaalkaloide, die weiterhin die Basis der medikamentösen HNSCC-Therapie darstellen³⁰. Ihr kombinatorischer Einsatz unter Ausnutzung von Synergieeffekten erzielt erhöhte Ansprechraten, jedoch ohne positive Effekte auf die Gesamtüberlebenszeit auszuüben^{31,32}. Nachteilig ist die Induktion starker Nebenwirkungen und therapiebedingter Letalität durch die Applikation im Gießkannenprinzip, was durch ihre geringe Selektivität und universale Zytotoxizität bedingt ist^{33,34,35}.

1.2.2 Moderne Ansätze der zielgerichteten Tumorthherapie

Die intensive Erforschung molekularer Pathomechanismen beförderte neue Therapieoptionen, welche es erlauben, Tumorzellen zielgenau und hochselektiv zu attackieren. Hierdurch verspricht man sich effektivere Maßnahmen, die vorher-sagbare und langanhaltende Remissionen sowie einen funktionellen Organerhalt gewährleisten könnten. Die Herausforderung besteht in der Identifikation molekularer Treiber kritischer Signalwege, deren zielgerichtete Eliminierung zuverlässig zum Therapieerfolg führt³⁶.

Aktuelle Strategien umfassen u. a. monoklonale Antikörper. Cetuximab, ein Rezeptorantikörper, der gegen den von Kopf-Hals-Karzinomen überexprimierten epidermal growth factor receptor (EGFR) gerichtet ist, ist Teil der

Standardtherapie des rezidivierenden oder metastasierten HNSCC^{37,38}. Durch die kombinierte Radiotherapie konnten *Bonner et al.* signifikante Verbesserungen der 5-Jahresüberlebensrate zeigen^{39,40}. Small molecules wie Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) zeigten nur mäßige Effekte⁴¹. Die Induktion des programmierten Zelltods mittels SMAC mimetics durch Antagonisierung überexprimierter Inhibitoren der Apoptose (IAP) hat sich ebenfalls als plausibler Ansatz erwiesen⁴². Immunonkologische Strategien, die auf immune-escape-Mechanismen der Tumorzellen abzielen, etablierten sich als Erstlinientherapie des rezidivierenden und metastasierenden HNSCC^{43,44}. Beispielweise heben Immuncheckpoint-Inhibitoren (bspw. Nivolumab oder Pembrolizumab) die immunsuppressive Wirkung des tumor microenvironment (TME) gegen T-Zellen auf, was die immunologische Eliminierung der Tumorzellen rekonstituiert⁴⁵. Dementsprechend konnte der cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4)-Antikörper Ipilimumab kombiniert mit Nivolumab die vollständige Remission eines therapierefraktären und metastasierenden HNSCC erzielen⁴⁶.

1.3 Tumorimmunologie

Paul Ehrlich stellte Anfang des 20. Jahrhunderts die These auf, dass maligne Zellen durch das Immunsystem überwacht würden⁴⁷. Antigene Fremdproteine (bspw. Tumorzellen) werden während der zellulären Immunantwort durch antigenpräsentierende Zellen den T-Lymphozyten präsentiert. Hierdurch werden CD4- bzw. CD8-positive T-Lymphozyten zu T-Helferzellen bzw. zytotoxischen T-Zellen aktiviert. Klassischerweise kommt es durch Fas Ligand (FasL), Granzym, Perforin oder TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) über Aktivierung der Signaltransduktion zur Apoptose⁴⁸. *Burnet und Thomas* prägten hierfür das Konzept der cancer immunosurveillance. Spezifische Antigene prä-maligner Zellen werden immunologisch erkannt und eliminiert bevor es zur Entstehung eines invasiven Karzinoms kommt^{49,50}. Dennoch können Tumorzellen diese Immunantwort umgehen. Dieses Phänomen wird als cancer immunoediting beschrieben, wobei schwach immunogene Tumorzellen einen Selektionsvorteil erhalten⁵¹.

Ein weiteres immunonkologisches Konzept verknüpft Krebs mit Inflammation, welches auf *Rudolf Virchow* zurückgeht, der das lymphoretikuläre Infiltrat als

Ursprung von Krebserkrankungen definierte⁵². Inzwischen ist bekannt, dass die übermäßige Sekretion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Matrix-Metalloproteasen (MMP) und anderer Mediatoren über chronische Entzündungszustände zur Karzinogenese beiträgt⁵³. Auf diesem Weg beeinflusst u. a. das TME die Tumorprogression. Maßgeblich verantwortlich hierfür ist der Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway, dessen Aktivierung, v. a. durch Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), die Immunabwehr sowie die Inflammation und Karzinogenese induzieren kann^{54,55}. Als proinflammatorischer Transkriptionsfaktor reguliert NF- κ B die Expression diverser Gene (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , MCP-1, CCL-5, c-FLIP, IAP, Survivin, MMP u. v. a. m.), die das Zellüberleben, Proliferation, Therapieresistenz, Invasion und Inflammation beeinflussen^{56,57}. Bei soliden Malignomen korreliert die Höhe der Interleukin (IL)-Freisetzung mit der Schwere der Erkrankung. Besonders IL-1, -6 und -8 bedingen die Progression und Therapieresistenz von Tumorzellen, weshalb sie als Biomarker angewendet werden⁵⁸. IL-1 induziert über die interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) und NF- κ B-Aktivierung die Expression proinflammatorischer und antiapoptotischer Gene, was ebenfalls für IL-6 beschrieben wurde^{59,60}. IL-8, das spezifisch von Epithelzellen gebildet wird, fördert über den Chemokin-Rezeptor (CXCR)-vermittelten nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1)/receptor-interacting protein 2 (RIP2)-Signalweg die Proliferation von HNSCC-Zellen^{61,62}. Auch Chemotherapeutika können über Aktivierung des NF- κ B pathways die Resistenz von Tumorzellen induzieren⁶³. Diese Mechanismen fördern die NF- κ B-vermittelte Inflammation und Tumorprogression, wodurch wirksame Therapien blockiert werden können.

1.3.1 Wechselwirkung zwischen Tumorzelle und Tumormikroumgebung

Tumorzellen liegen eingebettet in einem komplexen Verbund nicht transformierter Zellen, die als Tumormikroumgebung bzw. TME definiert sind. Zusammengesetzt wird diese aus extrazellulärer Matrix (EZM), Stroma-, Immunzellen, vaskulären Endothel- und neuroendokrinen Zellen sowie Fibroblasten bzw. Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF). Durch Bildung eines dichten desmoplastischen Stromas verhindern TAFs, dass Chemotherapeutika in ausreichender Konzentration auf die Tumorzellen einwirken können. Sie mauern Tumorzellen fibrotisch

ein und bilden ein chemostabiles Mikromilieu⁶⁴. Daneben bedingen reziproke Interaktionen die von *Hanahan und Weinberg* beschriebenen hallmarks of cancer, welche die Karzinogenese durch parakrines signaling unterhalten⁵³. Freigesetzte Wachstumsfaktoren, Chemo- oder Zytokine induzieren die maligne Transformation von Epithelzellen mit Proliferation, Metastasierung, Resistenz und Inflammation^{64,65}. Neben dem Transforming growth factor-beta (TGF- β) und IL-1 β wird TNF- α von TAFs sezerniert. *Erez et al.* konnten *in vitro* die inflammatorische Stimulation plattenepithelialer Tumorzellen mittels parakriner TNF- α -Sekretion von TAFs zeigen. Diese wiesen ein proinflammatorisches Genom auf, welches durch TNF- α - und NF- κ B-Expression die Karzinogenese und Proliferation beeinflusste⁶⁶. Eine weitere TNF- α -Quelle sind Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) des TME, die ebenfalls zum Tumorprogress beitragen können⁶⁷.

1.3.2 NF- κ B pathway

NF- κ B ist eine Familie ubiquitärer, schnell induzierbarer Transkriptionsfaktoren, die regulatorisch auf die Genexpression des Immunsystems, der Inflammation, der Zellproliferation und des Zelltods wirken. Entdeckt wurde NF- κ B von *Baltimore und Sen* als konstitutiv aktive Dimere in B-Zellen, die die Transkription des κ -Leichtketten-Gens von Immunglobulinen regulieren⁶⁸. NF- κ B besteht aus Desoxynukleinsäure (DNA)-bindenden Homo- oder Heterodimeren, die aus Mitgliedern der Rel-Familie zusammengesetzt werden. Charakteristisch ist ihre Rel homology domain (RHD). Funktionell dient diese der Bindung von DNA oder inhibitorischen Proteinen sowie der Dimerisierung. Fünf Proteine der Rel-Familie sind bekannt, die in zwei Gruppen unterteilt werden. RelA (p65), RelB und c-Rel werden fertig prozessiert mit transkriptionell wirksamer Transaktivierungsdomäne synthetisiert. Dagegen werden p50 (NF- κ B1) und p52 (NF- κ B2) nach posttranslationaler Modifikation aus den Vorläufermolekülen p105 bzw. p100 gebildet. In ruhenden Zellen ist NF- κ B als inaktives Dimer im Zytoplasma lokalisiert. Stabilisiert wird dieser Zustand durch Komplexierung mit Proteinen der inhibitor of κ B (I κ B)-Familie (I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ). Mit ihrer Ankyrin-Tandemdomäne binden sie über RHD an Rel-Proteine. Aufgrund dieser Wechselwirkung wird NF- κ B inhibiert und kann nicht in den Zellkern translozieren. Induziert wird die Signaltransduktion

durch proinflammatorische Zytokine (bspw. TNF- α oder Interleukine), oxidativen Zellstress, Infektionen sowie Chemo- oder Radiotherapien. Es sind zwei Signalwege für die Aktivierung der verschiedenen NF- κ B-Proteine bekannt, die sich mechanistisch wie funktionell unterscheiden⁶⁹.

1.3.2.1 Der klassische Signalweg

Der klassische (bzw. kanonische) pathway wird, vermittelt durch diverse Transmembranrezeptoren (TNF-, IL-1-, Toll-like- oder B- bzw. T-Zell-Rezeptor), über den zytoplasmatischen I κ B Kinase (IKK)-Komplex induziert (Abb. 1). IKK setzt sich aus den drei Untereinheiten IKK α , IKK β und IKK γ [bzw. NF- κ B essential modifier (NEMO)], einer regulatorischen Domäne, zusammen. Die NF- κ B-Proteine (p50, p65 bzw. RelA und c-Rel) dimerisieren. Im inaktiven Zustand sind die NF- κ B-Heterodimere an I κ B gebunden. Die Signaltransduktion startet durch Formierung von Komplex I. Diese Aktivierungsplattform wird von der receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1), TRADD, TRAF2, cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP) und dem linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) gebildet. Letztere ubiquitinieren RIPK1. Der gebildete Polyubiquitinstrang dient als Leitschiene zur Anlagerung von IKK und Auslösung der Kinase-Kaskade. IKK γ wird ubiquitiniert sowie IKK α und IKK β nach Phosphorylierung durch die transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) und das TAK1-binding protein (TAB) aktiviert. IKK β phosphoryliert I κ B α , welches nach Ubiquitinierung durch den Skp, Cullin, F-box containing (SCF)-Komplex, einer Multiprotein-Ubiquitin-Ligase, proteasomal degradiert wird. Nach Desinhibition von I κ B α transloziert p50/p65 (bzw. NF- κ B) in den Zellkern und reguliert als Transkriptionsfaktor die Genexpression⁷⁰.

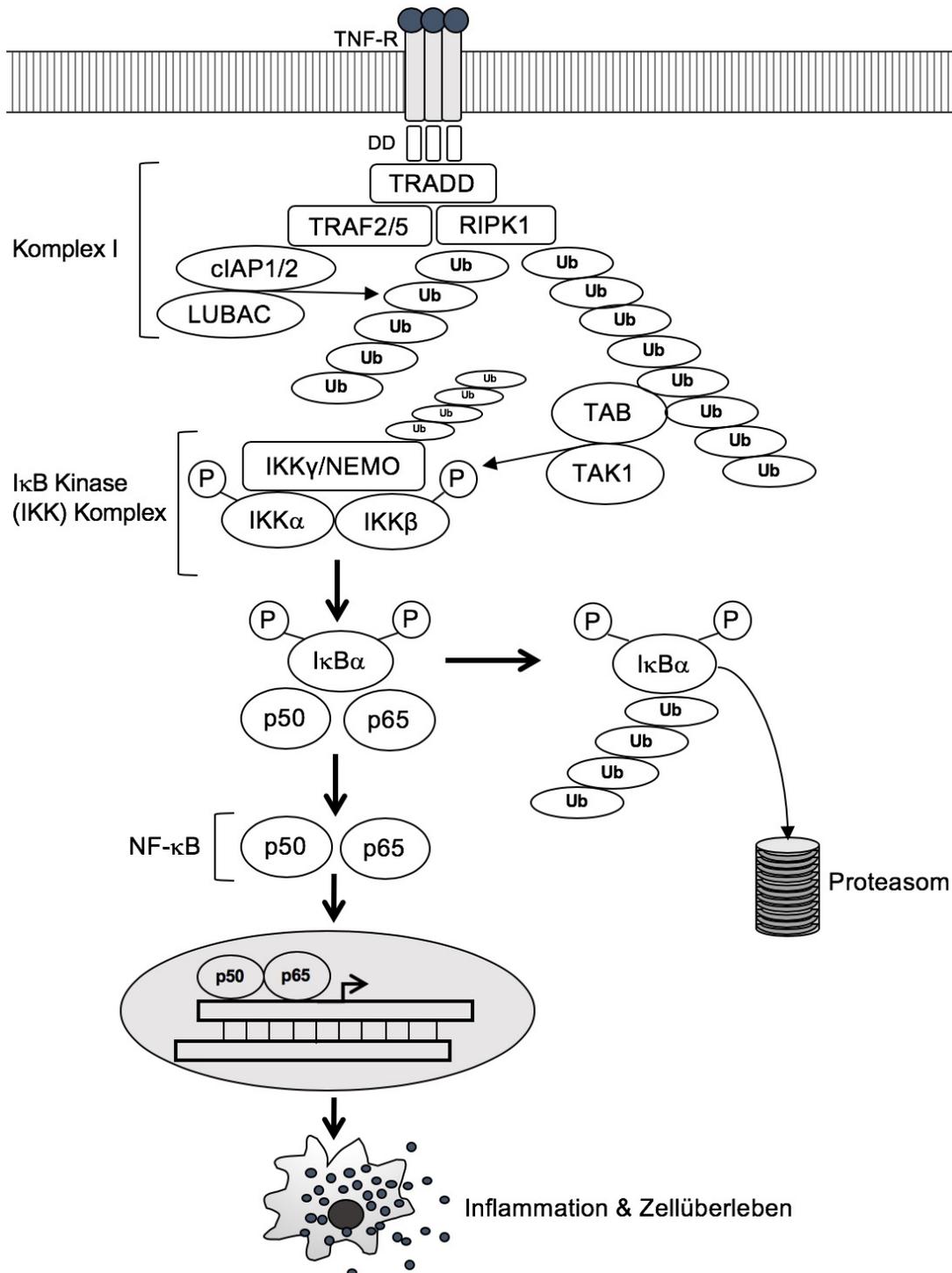


Abb. 1: Schema des klassischen pathways. Die Bindung von TNF- α induziert die TNF-Rezeptor-merisierung und Formierung von Komplex I (TRADD, TRAF2/5, RIPK1, cIAP1/2 und LUBAC). Nach Polyubiquitinierung von RIPK1 agens sich TAB, TAK1 und der IKK-Komplex an. Durch Phosphorylierung von IKK α und IKK β durch TAK1 wird die regulatorische Untereinheit IKK γ (bzw. NEMO) abgespalten. IKK β aktiviert den heterotrimeren Komplex aus I κ B α , p50 und p65. Phosphoryliertes I κ B α wird ubiquitiniert und proteasomale degradiert. Das freigesetzte Heterodimer p50/p65 (bzw. NF- κ B) transloziert in den Zellkern und reguliert die Expression antiapoptotischer und proinflammatorischer Gene (cIAP1/2, c-FLIP, Interleukin, TNF- α etc.). Diese Abbildung wurde neu konzipiert auf Grundlage der Veröffentlichung von *Dondelinger et al.* Polyubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis. *Cel. Mol. Life Sc.* 2016;73(11-12):2165-76.

1.3.2.2 Der alternative Signalweg

Der alternative (bzw. nicht-kanonische) pathway wird über eine Vielzahl von Rezeptoren der TNF-R-Superfamilie vermittelt (Abb. 2). Hierzu zählen u. a. der lymphotoxin- β receptor (LT β R), B-cell activating factor receptor (BAFF-R), receptor activator of NF- κ B (RANK), cluster of differentiation 40 (CD40), TNF-R2 und fibroblast growth factor-inducible factor 14 (Fn14). Im Unterschied zum schnell und passager induzierbaren klassischen Signalweg erfolgt hierbei eine langsame, aber langanhaltende Aktivierung dieses pathways. Die NF- κ B-inducing kinase (NIK) ist das zentrale Protein dieser Signalkaskade. Unstimuliert wird diese Kinase durch cIAP, TRAF2 und TRAF3 für den proteasomalen Abbau markiert. Wird TNF-R aktiviert, ubiquitiniert cIAP TRAF3 zwecks proteasomaler Degradation, wodurch NIK akkumuliert und IKK α phosphoryliert. Dieses markiert das Vorläufermolekül p100 für die partielle Proteolyse. Die hieraus prozessierte Untereinheit p52 dimerisiert mit RelB, welche als heterodimerer Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern translozieren^{71,72}.

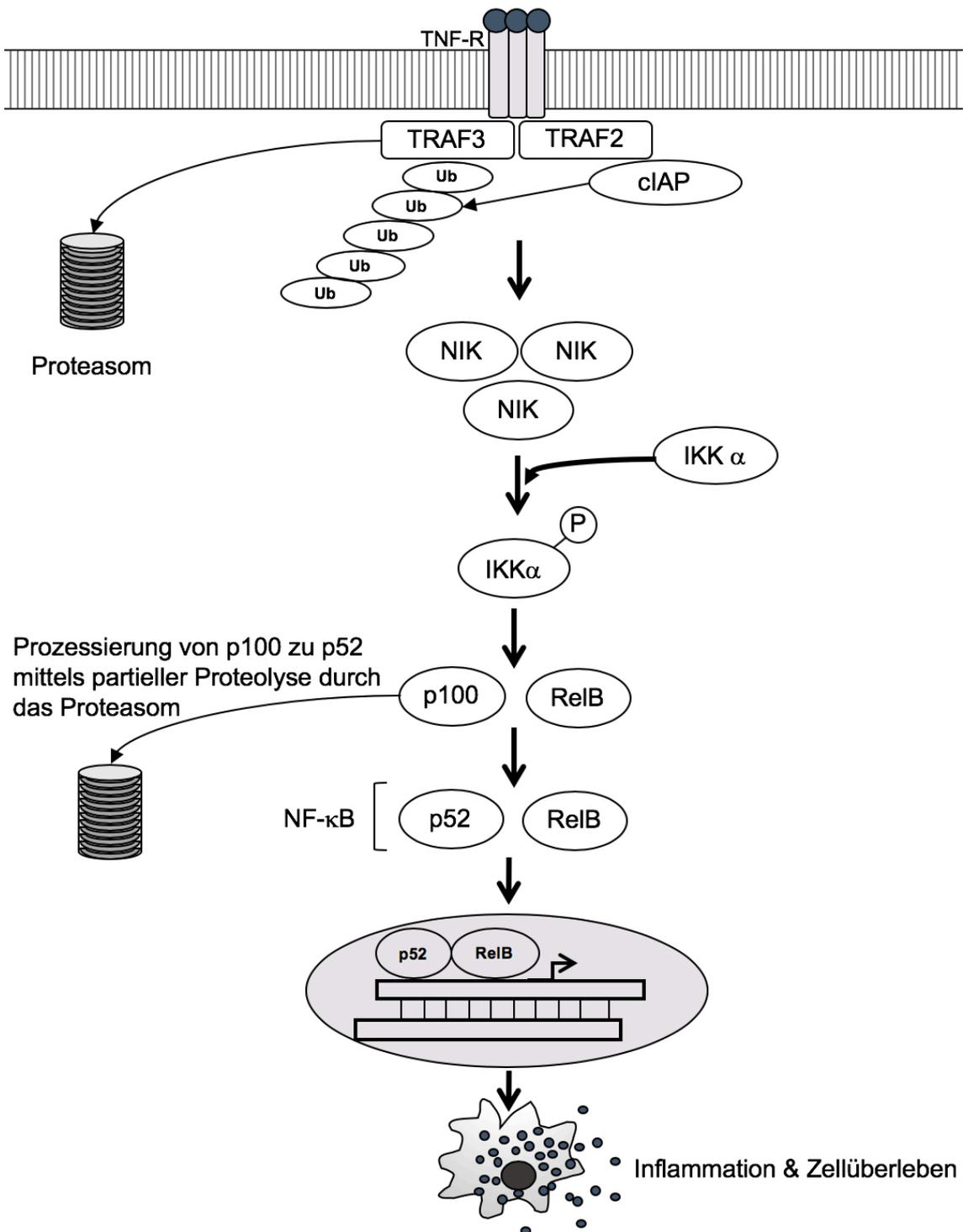


Abb. 2: Schema des alternativen pathways. Durch TNF- α -Bindung und Rezeptortrimerisierung erfolgt die Induktion des nicht-kanonischen Signalwegs durch die cIAP-vermittelte Ubiquitinierung von TRAF3. Nach proteasomaler Degradation von TRAF3 zerfällt der E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex aus cIAP, TRAF2 und TRAF3, wodurch NIK stabilisiert wird. Die Akkumulation von NIK verursacht über IKK α -Phosphorylierung die Prozessierung von p100 zu p52. Im Komplex mit RelB transkribiert dieses als Heterodimer (bzw. NF- κ B) im Zellkern und exprimiert bspw. proinflammatorische Gene. Diese Abbildung wurde neu konzipiert auf Grundlage der Veröffentlichung von Sun SC. The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation. Nat Rev Immuno. 2017;17(9):545-58.

1.3.2.3 TNF- α – NF- κ B – Interleukin-Loop als mögliche Ursache für Autoinflammation und Therapieresistenz solider Malignome

Seit *Virchows* Hypothese zur Entstehung von Krebs durch Inflammation wird über das therapeutische Potential der NF- κ B-Inhibition zur Therapie von Malignomen diskutiert. Erfolgreich beschrieben wurde dieser Ansatz bereits für das kolorektale Karzinom, wo die Hemmung von IKK durch Acetylsalicylsäure (ASS) seine Entstehung und Fortschreiten blockiert⁷³. *Greten und Pikarsky* konnten den NF- κ B pathway als Bindeglied von Inflammation und Krebs nachweisen, mit IKK β als dem entscheidenden Protein^{74,75}. Tumorzellen und das TME sezernieren auto- bzw. parakrin proinflammatorische Zytokine (Abb. 3). Über den klassischen NF- κ B pathway werden von Tumorzellen inflammatorische Mediatoren (TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8) oder Inhibitoren der Apoptose (Bcl-XL und cIAPs) ausgeschüttet, die Resistenz und Zellüberleben verursachen^{76,77}. Die autokrine TNF- α -Sekretion mit konstitutiver Aktivierung des NF- κ B pathways stimuliert die weitere Sekretion von TNF- α und Interleukinen, wie *Jackson-Bernitsas et al.* für das HNSCC beschrieben. TNF- α wirkt u. a. als Wachstumsfaktor, der in einer auto-krienen Signalschleife Tumorzellen immunisiert⁷⁸. Deshalb bezeichnen *Bonomi et al.* HNSCC-assoziierte Entzündungsreaktionen als siebtes krebsspezifisches Merkmal⁷⁹.

Daneben ist das Tumorlysesyndrom ein weiteres Modell der tumorassoziierten Inflammation⁸⁰. Hierbei werden u. a. Zytokine freigesetzt, die über Aktivierung des NF- κ B pathways zur Sekretion proinflammatorischer Mediatoren führen⁸¹. Die extrinsische Aktivierung des NF- κ B-Wegs durch Chemotherapeutika kann ebenfalls einer wirksamen Therapie entgegenwirken. Dieses Phänomen wurde für Platin beschrieben, wobei die Aktivität von NF- κ B umgekehrt mit der Sensitivität der Tumorzellen für Platin korreliert und bei längerer Therapiedauer zur Resistenzbildung führt^{82,83,84}.

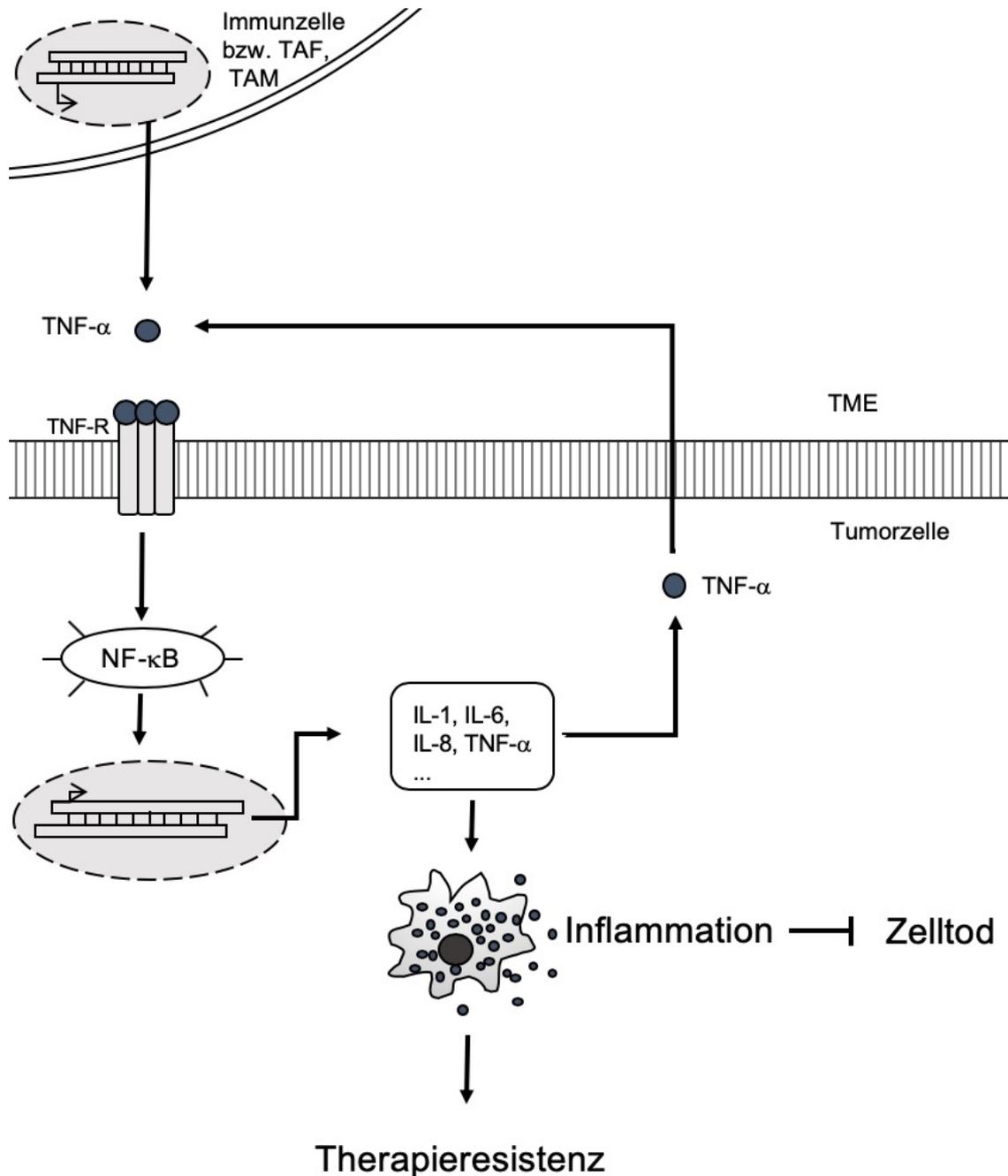


Abb. 3: Der TNF- α – NF- κ B – Interleukin-Loop. TNF- α , entweder aus der Umgebung des Tumors (TME) oder autokr n sezern ert, nduz ert d ese entznd che S gna sch e fe der Tumorz e. Dadurch kann NF- κ B konst tut v akt v ert vor egen, was d e kont nu er che Express on pro nf ammat or scher Gene bew rkt. D e h erdurch sezern erten Inter euk ne bzw. TNF- α nduz eren Auto nf ammat on nnerha b der Tumorz en, was zu deren Therap eres stenz f hrt. D ese schemat sche Abb dung wurde neu konz p ert auf Grund age der Veröffent chung von *Jackson-Bernitsas et al.* Ev dence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway med ates konst tut ve NF-kappaB act vat on and pro ferat on n human head and neck squamous ce carc noma. *Oncogene*. 2007;26(10):1385-97.

1.4 TNF-Rezeptor als Ausgang divergenter Signaltransduktion

Ausgehend von Rezeptorkomplexen der TNF-R-Superfamilie [bspw. FS7-associated cell surface antigen (Fas bzw. CD95), TNF-R1 bzw. -R2 und TRAIL-Rezeptor] divergieren unterschiedliche Signalwege (Abb. 4). Je nach Konfiguration dieses Multiproteinkomplexes werden unterschiedliche Signalkaskaden (Apoptose, Nekroptose, Inflammation oder Zellüberleben) induziert. Ausschlaggebend für die Balance zwischen diesen Signalwegen ist die Dominanz signal-spezifischer Proteine⁸⁵. Nach Rezeptortrimerisierung und Exponierung der death domain (DD) binden Adaptorproteine (TRADD, TRAF2 bzw. 5, cIAP1 bzw. 2, LUBAC und RIPK1). Diese Aktivierungsplattform (bzw. Komplex I) löst neben dem proinflammatorischen NF- κ B- proliferative Signalwege [bspw. MAPK oder c-Jun N-terminal kinase (JNK)] aus⁸⁶. NF- κ B fördert, neben der Transkription proinflammatorischer Gene, die Expression antiapoptotischer Proteine (c-FLIP, cIAP1/2 und TRAF2/5). cIAPs tragen durch Ubiquitinierung von RIPK1 zur konstitutiven Aktivierung des NF- κ B pathways bei. Außerdem wird die Induktion der Apoptose an Komplex II bzw. dem death-inducing signaling complex (DISC) unterdrückt⁸⁷. Dieser formiert sich, wenn die cIAP- bzw. LUBAC-vermittelte RIPK1-Polyubiquitinierung ausbleibt. FADD, das über TRADD an TNF-R angelagert wird, aktiviert Caspase 8. Dieser Komplex IIa induziert die extrinsische Apoptose. Unter Inhibition von cIAP1/2, TAK1 und NEMO bildet sich bei TNF-R-Stimulation Komplex IIb (RIPK1, RIPK3, FADD, TRADD und Caspase 8), der ebenfalls apoptotisch ist⁸⁸. Die NF- κ B-induzierte Expression des antiapoptotischen cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein (c-FLIP) inhibiert die Apoptose durch Komplexierung von Caspase 8. Es formiert sich Komplex IIc, bzw. Nekrosom [RIPK1, RIPK2 und mixed-lineage kinase domain-like protein (MLKL)], welches die Nekroptose als alternative Form des programmierten Zelltods auslöst^{89,90,91}.

I. Einleitung

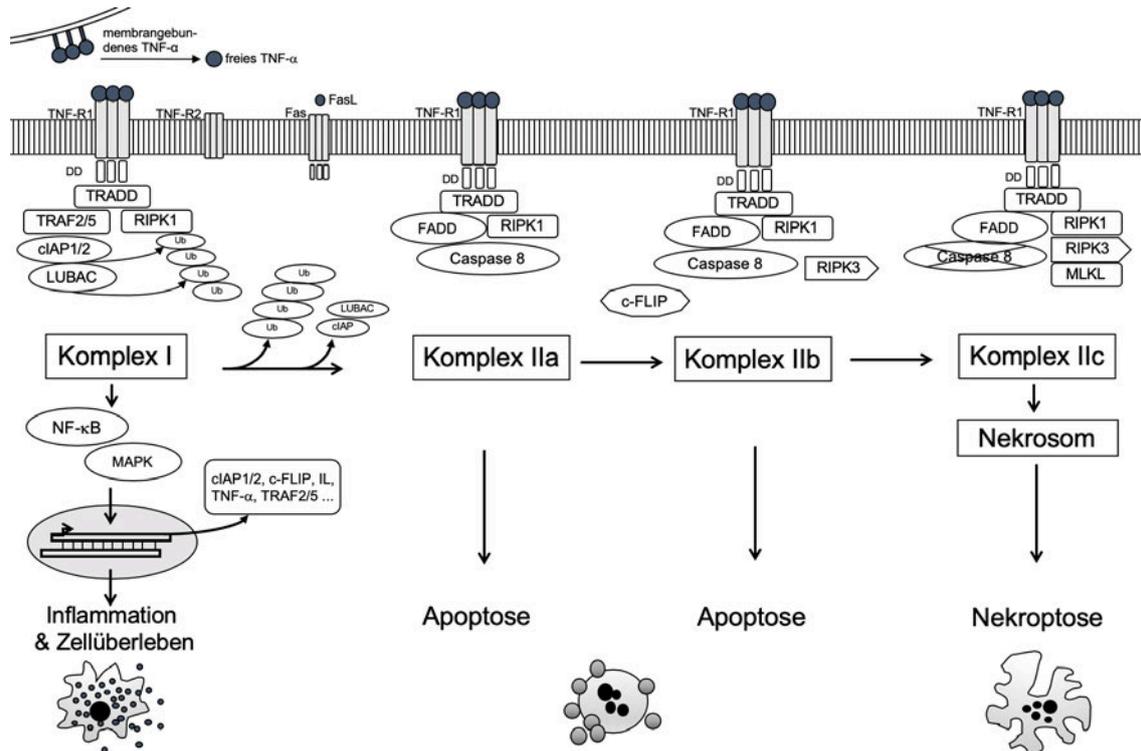


Abb. 4: Übersicht der Signaltransduktionen ausgehend von TNF-R. Die Bindung von TNF- α an TNF-R1 bzw. -R2 kann diverse Signalwege auslösen. Membrangebundenes TNF- α aktiviert beide Rezeptorsubtypen (TNF-R1 und TNF-R2), wobei TNF-R2 nur zur Einleitung des NF- κ B-Pathways fähig ist, da ihm die DD fehlt, weshalb sich keine Effektormoleküle (TRADD, FADD und RIPK) anlagern können. TNF-R1, der auch durch freies TNF- α stimuliert wird, bindet über seine DD den Komplex I (TRADD, TRAF2/5, RIPK1, cIAP1/2 und LUBAC). Über die phosphorylierte RIPK1 wird der proinflammatorische NF- κ B-Pathway und die Transkription bspw. proinflammatorischer Zytokine induziert. In Abwesenheit oder unter Inhibition der Ubiquitin-Ligasen von cIAP oder LUBAC und dem Ausbleiben der RIPK1-Ubiquitinierung formiert sich Komplex IIa. Über Aktivierung von Caspase 8 wird die Apoptose induziert. Komplex IIb (RIPK1, RIPK3, FADD, TRADD und Caspase 8), ebenfalls apoptotisch, wird durch die aktivierte Kinase aktiviert der RIPK1 induziert. Inhibitorisches c-FLIP kompetiert mit Caspase 8. Wird Caspase 8 bei geringem c-FLIP-Level aufgrund reduzierter NF- κ B-Aktivierung in seiner Aktivität gedrosselt, kann es durch Restenzymaktivität weiterhin RIPK1 und RIPK3 proteolytisch spalten. Hierüber wird die Nekroptose unterdrückt und die Apoptose über Komplex IIb aktiviert. Ist Caspase 8 vollständig inaktiv, formiert sich Komplex IIc, bzw. das Nekrosom. Dieser Proteinkomplex (RIPK1, RIPK3 und MLKL) induziert die Nekroptose als alternative Form des programmierten Zelltods. Die schematische Darstellung des Crosstalks am TNF-R wurde neu konzipiert auf Grundlage der Veröffentlichung von Han *et al.* Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immuno*. 2011;12(12):1143-9.

1.5 Der programmierte Zelltod

Als Suizidprogramm multizellulärer Organismen ist der Zelltod ein physiologischer Prozess während des Zellumsatzes mit grundlegender Bedeutung für die Zellhomöostase. Er dient dem Immunsystem zur Abwehr und Beseitigung infizierter oder aberranter Zellen. Störungen führen zur Pathogenese autoimmuner, entzündlicher oder neoplastischer Erkrankungen⁹². Somit ist der Zelltod ein wichtiger Mechanismus zur Vorbeugung von Malignomen. Neben der Apoptose gibt es ein Repertoire alternativer Formen des Zelltods, wie Nekroptose, Anoikis, Autophagie, Ferroptose, Pyroptose, Parthanatos u. v. a. m.⁹³

1.5.1 Apoptose

Diese Form des programmierten Zelltods ist morphologisch durch Zytoplasmaschwund, Pyknosis, Karyorrhexis und Abschnürung von Apoptosekörperchen definiert. Letztere werden phagozytotisch abgeräumt, was Entzündungen und der Aktivierung des Immunsystems entgegenwirkt. Molekular betrachtet handelt es sich um die Aktivierung proteolytischer Enzyme, den Cysteinyl-Aspartyl-Proteasen (bzw. Caspasen), die ihre Substrate spezifisch hinter Aspartat-Resten spalten⁹⁴. Diese werden entweder ex- oder intrinsisch aktiviert (Abb. 5). Die extrinsische Apoptose wird über Signale des extrazellulären Milieus, die von Rezeptoren der TNF-R-Familie (Kap. 1.4) detektiert werden, induziert. Caspase 8 wird an Komplex II autoproteolytisch gespalten und setzt die Caspasenkaskade in Gang. Dahingegen initiieren DNA-Schäden, durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Strahlung induzierter Zellstress, Mitosedefekte, Mangel an Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika u. v. a. m. die intrinsische Apoptose. Proapoptische Proteine der B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-Familie permeabilisieren die Mitochondrienmembran. Über diese Membranporen werden u. a. second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI (SMAC/Diablo) und Cytochrom c freigesetzt. Letzteres bindet an den apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) und Caspase 9, wodurch das Apoptosom gebildet wird. An diesem Proteinkomplex startet die kaskadenartige Caspasenaktivierung. Durch Inhibition von IAPs, die ihrerseits Caspasen hemmen, kann SMAC/Diablo die Wirkung von Cytochrom c auf Caspasen und die Apoptose verstärken^{93,95}.

I. Einleitung

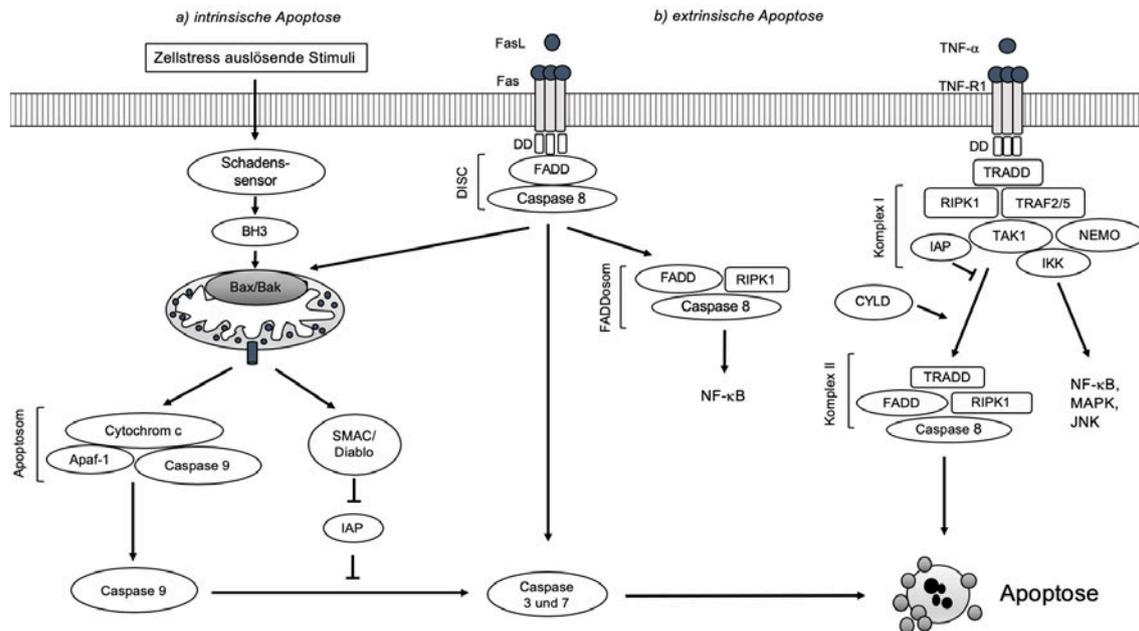


Abb. 5: Signalwege der Apoptose. a) Intrinsische Apoptose wird durch zellstressauslösende Stimuli wie Chemotherapeutika, Strahlung oder DNA-Schäden induziert. Sensorproteine wie p53 veranlassen die Aktivierung von Bcl-2-homolog (BH)3-ähnlichen Proteinen auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene, die proapoptische Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bax, Bak und Bad) stimulieren. Das Übergewicht proapoptischer Faktoren bewirkt durch Membranpermeabilisierung die Freisetzung von Cytochrom c und SMAC/Diablo mit Aktivierung der Caspasenkaskade. b) Die extrinsische Apoptose wird durch Rezeptorvermittlung ausgelöst. Nach Ligandenbindung trimerisiert Fas und formiert DISC, welcher die Caspasenaktivierung induziert. Dieser Signalweg kann über Caspase 8 und den Prozessierung von BH3-Proteinen den intrinsischen Signalweg stimulieren und die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 verstärken. Daneben besitzt Caspase 8 auch nichtenzymatische Funktionen. Als Gerüst kann es zur Formierung des FADDosoms (Caspase 8, FADD und RIPK1) dienen, das NF- κ B-abhängig Inflammation und Resistenz bedingt. Die Abbildung wurde neu konzipiert auf Grundlage der Veröffentlichung von *Ashkenazi et al.* Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:337-56 und *Henry et al.* Caspase-8 Acts as a Non-enzymatic Scaffold for Assembly of a Pro-inflammatory "FADDosome" Complex upon TRAIL Stimulation. *Mol Cell.* 2017;65(4):715-29 e5.

1.5.2 Crosstalk zwischen Apoptose und Inflammation

Die Umgehung des Zelltods ist ein Charakteristikum maligner Zellen. Pathogenitätsfaktoren, welche zum Überleben von Tumorzellen führen, sind von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung und Etablierung zielgerichteter Therapien. Jedoch unterliegen diese einer enormen Heterogenität. U. a. sind IAPs für das HNSCC beschrieben. Diese antiapoptotischen Proteine induzieren durch Ubiquitinierung von RIPK1 und Induktion des NF- κ B pathways Proliferation, Überleben und Resistenz von Tumorzellen⁹⁶. Mutationen der Procaspase 8 inhibieren die extrinsische Apoptose und verstärken das NF- κ B-Signaling, da Caspasen nach Verlust ihrer Proteasefunktion als Gerüstproteine für FADD und RIPK1 zum FADDosom komplexieren⁹⁷. Dieser Signalkomplex stimuliert über den klassischen NF- κ B-Signalweg die Inflammation anstelle der extrinsischen Apoptose

(Abb. 5)⁹⁸. Ein weiterer Resistenzfaktor des HNSCC ist c-FLIP. Seine Bindung an FADD und Caspase 8 unterdrückt die Formierung von DISC. Außerdem stimuliert es den NF- κ B pathway⁹⁹. Umgekehrt berichten *Jackson-Bernitsas et al.*, dass NF- κ B aufgrund konstitutiver IKK-Aktivierung sowie autokriner und wachstumsstimulierender TNF- α -Sekretion permanent stimuliert ist, was seinerseits proliferativ und antiapoptotisch wirkt⁷⁸.

1.6 NF- κ B-pathway-Inhibition zur molekularen Tumorthherapie

Aufgrund des geschilderten Beitrags des proinflammatorischen NF- κ B-Signalwegs zur Karzinogenese erscheint die Inhibition dieses Transkriptionsfaktors als plausibles target molekularer Tumorthherapie. Sein Einfluss auf Inflammation, Proliferation, Tumorzellüberleben und Resistenz gegen System- und Strahlentherapien machen die spezifische Inhibition des NF- κ B pathways zu einer vielversprechenden Strategie. *In vitro* und *in vivo* Studien zeigen, dass dieser Ansatz die TNF- α -getriggerte Apoptose therapieresistenter Tumorzellen induzieren kann¹⁰⁰.

1.6.1 Glucocorticoide

Cortisol (bzw. Hydrocortison), ein körpereigenes Stresshormon aus der Gruppe der Glucocorticoide (GC), besitzt ein weites Spektrum physiologischer Funktionen. Neben katabolen Stoffwechselwirkungen besitzt es antiphlogistische, anti-proliferative und immunsuppressive Eigenschaften, weshalb es therapeutisch bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen eingesetzt wird. Seine glucocorticoiden Effekte werden über intrazelluläre Rezeptoren vermittelt, die als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren die Expression spezifischer Gene regulieren. Seine antiinflammatorische Wirkung entfaltet es durch Herunterregulierung proinflammatorischer Gene, durch direkte Inhibition des NF- κ B pathways und durch Steigerung der GC-Rezeptorexpression. Dexamethason kann nach GC-Rezeptorbindung über direkte Protein-Protein-Interaktionen p65 inhibieren. Außerdem stimulieren GC die Transkription des antiinflammatorischen I κ B α -Gens, wodurch die Aktivierung und nukleäre Translokation von NF- κ B unterbunden wird. Für Systemtherapien sensitivierende Effekte von GC sind für hämatologische und solide Malignome beschrieben¹⁰¹. Jedoch scheint es gewebsspezifische Unterschiede

hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu geben. Eine Vielzahl von Tumoren ist resistent bzw. GC wirken zytoprotektiv. Die zugrundeliegenden Mechanismen beruhen auf veränderten Expressionsmustern von Rezeptor-Isoformen, verringerten Rezeptor-Expressionsleveln und zytoprotektiven Dysbalancen zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren. Dies schützt Tumorzellen bei Kombination von GC mit Radio- oder Systemtherapien vor der Induktion von Apoptose. Deshalb gibt es große Vorbehalte gegenüber ihrer Anwendung als Tumorthapeutikum, weshalb eine generelle GC-Therapie bislang als kontraindiziert abgelehnt wird^{101,102}. In Studien konnte der NF- κ B pathway durch Dexamethason bei Kombinationsbehandlung mit SMAC mimetics erfolgreich inhibiert werden. Es wurden signifikante Erfolge bei der *in vitro* Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) gezeigt und durch cIAP-Inhibition die Apoptose induziert¹⁰³.

1.6.2 MLN4924

Als antiproliferativer und antiinflammatorischer Wirkstoff inhibiert MLN4924 (bzw. Pevonedistat oder TAK-924) spezifisch das NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8)-aktivierende Enzym (NAE). NAE aktiviert durch Konjugation mit NEDD8 (bzw. Neddylierung) die Cullin-RING-Ligase (CRL), eine E3-Ubiquitin-Ligase, die Proteine für den proteasomalen Abbau markiert¹⁰⁴. Dysregulationen der CRL, besonders von CRL1 bzw. SCF-E3-Ligase, sind mit der Karzinogenese verknüpft. CRL ubiquitiniert I κ B α , ein Inhibitor des klassischen NF- κ B pathways, welcher proteasomal abgebaut wird. Die NAE-Hemmung durch MLN4294 führt zur Akkumulation von CRL-Substraten, bspw. I κ B α oder zellzyklusregulierender Proteine. Durch die MLN4924 inhibierte I κ B α -Ubiquitinierung wird der klassische NF- κ B-Signalweg gehemmt, was für diverse Neoplasien [bspw. akute myeloische Leukämie (AML), Lymphome und Multiples Myelom] gezeigt wurde^{105,106}. Zusätzlich induziert MLN4924 die intrinsische Apoptose durch Stimulation proapoptotischer Bcl-2-Proteine und Herunterregulation von IAPs^{107,108}. Vielversprechende Daten für die Wirksamkeit dieses Wirkstoffs beim HNSCC sind publiziert. *In vitro* konnten *Vanderdys et al.* mit MLN4924 die Zellproliferation hemmen und das HNSCC erfolgreich radiosensitivieren¹⁰⁹. *Zhao et al.* konnten das HNSCC durch Senkung des c-FLIP-Levels für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren¹¹⁰.

1.6.3 QNZ

Das Quinazolin-Derivat N4-[2-(4-Phenoxyphenyl)Ethyl] Quinazolin-4,6-Diamin (bzw. QNZ oder EVP4593) ist ein spezifischer Inhibitor des NF- κ B pathways und der TNF- α -Freisetzung^{111,112}. QNZ wirkt inhibierend auf die Angiogenese, Metastasierung und Inflammation (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) durch spezifische Hemmung von p65 auf Proteinebene. Hierdurch wurde die Zellviabilität des hepatozellulären Karzinoms *in vitro* signifikant reduziert^{113,114}. Außerdem wurde an Glioblastomzellen die Hemmung der antiapoptotischen Proteine c-FLIP und myeloid cell leukemia 1 (MCL-1) gezeigt¹¹⁵.

1.6.4 TPCA-1

Das small molecule 2-[(Aminocarbonyl)amino]-5-(4-Fluorophenyl)-3-Thiophen-carboxamid, bzw. TPCA-1, ist, als ATP-kompetitiver Inhibitor des I κ B kinase (IKK)-Komplexes, eine spezifisch wirkende Verbindung zur Hemmung des klassischen NF- κ B-Signalwegs mit hoher Selektivität für IKK β . Außerdem inhibiert TPCA-1 den signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), ein HNSCC-Onkogen, das unter konstitutiver Aktivierung die Apoptose inhibiert und zytokinabhängig die Inflammation und Zellproliferation stimuliert¹¹⁶. *Nan et al.* berichten, dass aufgrund der dualen NF- κ B- und STAT3-Inhibition das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) durch TPCA-1 für Gefitinib sensitiviert wird. Durch Suppression der autokrinen IL-6-Sekretion wird Apoptose induziert¹¹⁷. *Poddolin et al.* berichten, dass die IKK β -Inhibition die Produktion von IL-6, -8 und TNF- α wirksam in Monozyten hemmt¹¹⁸. Des Weiteren induzierten *Rauert-Wunderlich et al.* durch TPCA-1 den Zelltod des Multiplen Myeloms¹⁰⁶.

1.7 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll den Zusammenhang zwischen Inflammation und Therapieresistenz maligner Neoplasien am Beispiel eines *in vitro* Modells des HNSCC untersuchen. Grundlage hierfür ist die NF- κ B-abhängige Induktion proinflammatorischer Gene, deren (Über-) Expression Tumorzellen auf Inflammation und Proliferation programmiert. Es soll die Hypothese überprüft werden, ob die Resistenz des HNSCC gegen immunologische Zelltodinduktoren (FasL oder TNF- α) durch zielgerichtete Inhibition des NF- κ B pathways aufgehoben werden kann. Hierbei wird die von *Karin und Greten* aufgestellte These, wonach die NF- κ B-Aktivierung über den klassischen, IKK- β -abhängigen NF- κ B pathway ein entscheidender Mediator der entzündungsinduzierten Karzinogenese ist, auf das HNSCC übertragen. Dabei soll überprüft werden, ob dieser Signalweg eine plausible molekulare Zielstruktur für therapeutische Zwecke darstellen könnte⁸¹. Hierfür wird die Wirkung von vier unterschiedlich targetierenden NF- κ B-pathway-Inhibitoren auf fünf Zelllinien des HNSCC und eine keratinozytische Referenzzelllinie *in vitro* untersucht. Es soll analysiert werden, ob das Zytokin IL-8, ein Marker der Inflammation, sezerniert und durch TNF- α stimuliert wird. Ferner wird validiert, ob die Inflammation des HNSCC auf einer autokrinen Signalschleife via TNF- α , NF- κ B und IL-8 beruht. Durch Expressionsanalysen soll der Einfluss o. g. Inhibitoren auf proapoptotische, antiapoptotische und proinflammatorische Gene studiert werden. Ferner sollen FACS-Apoptose-Assays klären, ob Apoptose durch Inhibition dieses Signalwegs induziert werden kann.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

Die angegebenen Produktbezeichnungen sind, wenn auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht explizit darauf hingewiesen wird, urheberrechtlich geschützt. Eine fehlende oder fehlerhafte Kennzeichnung soll nicht auf eine freie Verfügbarkeit schließen lassen.

2.1.1 Geräte

Name	Bezeichnung	Hersteller	Herkunft
Absaugmotor	HLC by DITABIS	DITABIS AG	Pforzheim
Brutschrank	Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur™ Flow Cytometer	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
Gefrierschrank	7084 311-00	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach
Großsterilisator	Selectomat PL	MMM Münchener Medizin Mechanik GmbH	Planegg
Kühlschrank	7084 311-00	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg
Mikrovolumen-Spek- tralphotometer	NanoDrop™ Spectro- photometer ND-2000c	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
PCR-Thermocycler	CFX Connect™ Real- Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	München
pH-Meter	Inolab pH level 1	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG	Weilheim
Pipetten	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-jet® pro	Brand GmbH + Co. KG	Wertheim
Photometer	Tecan Infinite® F50 Absorbance Microplate Reader	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Präzisionswaage	KB 2400-2N	Kern & Sohn GmbH	Dürrwangen
Sicherheitswerkbank	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt

II. Material & Methoden

Umwälzthermostat	MB-5	Julabo GmbH	Seelbach
Thermoschüttler	TS-100	Biosan Medical-Biological Research & Technologies	Riga, Lettland
Vakuumpumpe	N 816.3 KT.18	KNF Neuberger GmbH	Freiburg
Vortexmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.	Karlsruhe
Wasserbad	VWB 26	VWR International GmbH	Darmstadt
Wippschüttler	Single-Tier Rocking Platform	VWR International GmbH	Darmstadt
Zellkulturmikroskop	CK40	Olympus Europa SE & Co. KG	Hamburg
Zellzählgerät	Casy® TT Cell Counter + Analyzer	Roche Innovatis AG	Reutlingen
Zentrifugen	• Centrifuge 5427 R	Eppendorf AG	Hamburg
	• Centrifuge 5424		
	• Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen

Tab. 1: Geräteverzeichnis. Angaben über die verwendeten Geräte mit Produktbezeichnung, Hersteller und Herkunft.

2.1.2 Software

Name	Version	Hersteller	Herkunft
BD CellQuest Pro ^M	5.1	BD Biosciences	Heidelberg
CASYstat	4.0	Schärfe System GmbH	Reutlingen
CFX Manager™ Software	3.1	Bio-Rad Laboratories, Inc.	München
EndNote™	X7.8	Clarivate Analytics	München
FlowJo®	10.0	FlowJo LLC	Ashland, USA
GraphPad Prism	6.04	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
Magellan™	7.0	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
MEDAS	-	Grund EDV-Systeme	Margetshöchheim
Microsoft® Office Word 2016	16.16.10	Microsoft Corporation	München
Microsoft® Office Excel 2016	16.16.10	Microsoft Corporation	München
NanoDrop 2000 Software	1.0	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt

Tab. 2: Softwareverzeichnis. Aufstellung der eingesetzten Computerprogramme zur Datenerhebung, -analyse und -darstellung mit Angabe von Softwareversion, Hersteller und Herkunft.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezeichnung	Hersteller	Herkunft
ELISA-Mikroplatten	MICROLON ^M	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Einmalspritzen	BD Discardit ^M II	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
FACS-Röhrchen	5 ml Tubes	Sarstedt AG & Co	Nürnberg
Falcons	50 mm Polypropylene	Corning GmbH	Kaiserslautern
Kanülen	BD Microlance ^M	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
Messgefäße	CASYcups	Omni Life Science GmbH	Bremen
Mikroreaktionsgefäß	Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG	Hamburg
Pasteurpipette	Glass Pasteur Pipettes	Kimble Chase Germany	Meiningen
Petrischalen	Nunc TM	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Pipetten	Cellstar	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.	Eppendorf AG	Hamburg
Versiegelungsfolie	Microseal®	Bio-Rad Laboratories GmbH	Rüdesheim
Zellkulturflaschen	Nunc ^M EasYFlask ^M	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Zellschaber	Cell Scraper	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
6-Well-Platten	Nunc TM Zellkultur-Multischalen	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
96-Well-Platten	• Nunc TM MicroWell TM 96 Well Mikroplatten	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
	• Multiplate® PCR Plates TM 96-well	Bio-Rad Laboratories GmbH	Rüdesheim

Tab. 3: Materialliste. Verzeichnis der eingesetzten Verbrauchsmaterialien mit Angabe von Art, Bezeichnung, Hersteller und Herkunft.

2.1.4 Nährmedien

Name	Supplemente	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
DMEM	10 % FCS 1 % P/S	41965-039	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
DMEM, low glucose	10 % FCS 1 % P/S 5 ml Glutamin	31885-023	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
DMEM/F-12, HEPES	10 % FCS 1 % P/S 5 µl Hydrocortison	31330-038	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt

Tab. 4: Zellkulturmedien. Verzeichnis, inklusive der Modifikationen, des Zellkulturmediums (DMEM), der Supplemente und Produktnummern (Prod.-Nr.) mit Angaben zu Hersteller und Herkunft.

2.1.5 Chemikalien, Inhibitoren & Reagenzien

Name	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
CASYclean	5651786	Omni Life Science GmbH	Bremen
CASYton	177603	Omni Life Science GmbH	Bremen
Cortisol (C-106)	50-23-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	RNBD9128	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Fc-FLAG-FasL	[500 µg/ml]	Laborgruppe Prof. Dr. Wajant	Würzburg
Fetal calf serum (FCS)	10270	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Hydrocortison (≥ 98 %)	H4001-10G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Kristallviolett	42555	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
L-Glutamin [20 mM]	K 0283	Biochrom GmbH	Berlin
Methanol (≥ 99,8 %)	322415-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
MLN4924	HY-10484	Hycultec GmbH	Beutelsbach
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
QNZ (bzw. EVP4593)	S4902	Selleck Chemicals Europe	München
R&D Substrate Reagent	DY999	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Salzsäure (1 M)	318949-6X1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
TNF(wt)-FLAG	[300 µg/ml	Laborgruppe Prof. Dr. Wajant	Würzburg
TPCA-1	S2824	Selleck Chemicals Europe	München
Trypsin/EDTA solution (0,05 %/0,02 % in PBS)	L2143	Biochrom GmbH	Berlin

Tab. 5: Chemikalien, Inhibitoren & Reagenzien. Verzeichnis der verwendeten Reagenzien mit Angabe von Produktnummer, Hersteller und Herkunft.

Die Zelltodliganden Fc-FLAG-FasL (bzw. FasL) und TNF(wt)-FLAG (bzw. TNF- α) wurden durch die Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg (Professor Dr. Wajant) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden FLAG-Tag-markierte Rekombinanten durch Immunpräzipitation mittels anti-FLAG M2 Agarose beads isoliert. Die Proteinaufreinigung wurde mit Hilfe von Affinitätschromatographie der Überstände transfizierter HEK293-Zellen durchgeführt¹¹⁹.

Die kommerziell erworbenen Inhibitoren des NF- κ B pathways Cortisol, MLN4924, QNZ und TPCA-1 wurden gemäß Herstellerangaben in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, zu 10 mM Stocklösungen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.1.5.1 Kits

Name	Prod.-Nr.	Hersteller	Herkunft
Annexin V PE Apoptosis Detection Kit PE	88-8102-74	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
BD OptEIA ^M Human IL-8 ELISA Set	555244	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
BD OptEIA ^M Human TNF ELISA Set	555212	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	2045313	Quiagen Deutschland GmbH	Hilden
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	204145	Quiagen Deutschland GmbH	Hilden
RNeasy® Mini Kit	74106	Quiagen Deutschland GmbH	Hilden

Tab. 6: Kits. Verzeichnis der eingesetzten, kommerziell verfügbaren Labor-Kits mit Angabe von Produktnummer, Hersteller und Herkunft.

2.1.6 Lösungen & Puffer

Name	Zusammensetzung
Assay diluent	40,5 ml dH ₂ O 4,5 ml (10x) PBS 5 ml FCS
Capture Ansatz	Capture antibody purified IL-8 bzw. TNF- α 1:250 Coating buffer
Coating buffer	8,4 g/l NaHCO ₃ 3,56 g/l Na ₂ CO ₃
Kristallviolettlösung	0,5 g Kristallviolett 100 ml Methanol 400 ml dH ₂ O
Phosphate-buffered saline (10x) (PBS)	133,25 g Na ₂ HPO ₄ 15,6 g NaH ₂ PO ₄ 409,5 g NaCl 5 l dH ₂ O
Stop solution (2N H ₂ SO ₄)	5,33 ml H ₂ SO ₄ 94,67 ml dH ₂ O
Tris-EDTA (TE) Puffer (1x)	1,211 g/l (10 mM) Tris 0,372 g/l (1 mM) EDTA-Na ₂
Working detector	Assay diluent 1:250 Detection antibody biotinylated IL-8 bzw. TNF- α 1:250 Enzyme reagent streptavidin horseradish peroxidase

Tab. 7: Lösungen & Puffer. Zusammensetzung selbstständig hergestellter Puffer und Lösungen.

2.1.7 Oligonukleotid-Primer

Name	Beschreibung	Gen	Spezies	Prod.-Nr.	Hersteller
Hs_BAX_1_SG	proapoptotisch	BAX	human	QT00031192	Quiagen
Hs_BCL2_1_SG	antiapoptotisch	BCL2	human	QT00025011	Quiagen
Hs_BIRC2_1_SG	antiapoptotisch	BIRC2	human	QT00083587	Quiagen
Hs_BIRC3_1_SG	antiapoptotisch	BIRC3	human	QT00021798	Quiagen
Hs_CFLAR_1_SG	antiapoptotisch	CFLAR	human	QT00064554	Quiagen
Hs_XIAP_1_1_SG	antiapoptotisch	XIAP	human	QT00042854	Quiagen
Hs_IL6_1_SG	inflammatorisch	IL-6	human	QT00083720	Quiagen
HS_IL8_1_SG	inflammatorisch	IL-8	human	QT00000322	Quiagen
Hs_ACTB_2_SG	Haushaltsgen	β-Actin	human	QT01680476	Quiagen

Tab. 8: Primer. Kata og der O gonuk eot de für d e reverse-transcr pt on quant tat ve rea -t me po ymerase cha n react on (RT-qPCR). Angabe der verwendeten O gonuk eot de zum Nachwe s der re at ven Express - ons eve o. g. Gene nach *in vitro* St mu at on der Ze en m t den v er zu untersuchenden Inh b toren des NF-κB pathways n der SYBR® Green-bas erten Genexpress onsana yse. D e Pr mer wurden n 1,1 m TE-Puffer ge öst und gemäß Herste erangaben ge agert.

2.1.8 Zellpanel

Zelllinie	Beschreibung & Ursprung	TNM ¹²⁰	Medium
PCI 1-1*	Glottisches Larynxkarzinom	pT2N0M0G2	DMEM (low)
PCI 9-1*	Zungenbasiskarzinom	pT4N3M0G2	DMEM (low)
PCI 13-1*	Retromolares Mundhöhlenkarzinom	pT4pN1M0G3	DMEM (low)
PCI 52*	Karzinom der Plica aryepiglottica	pT2N0M0G2	DMEM (low)
SCC-25**	Zungenkarzinom	T1N1M0	DMEM/F-1 2
HaCaT**	Immortalisierte humane Keratinozyten	-	DMEM

Tab. 9: Zellpanel. Kata og der untersuchten HNSCC-Ze en (nk us ve der Referenzz e n e HaCaT) m t Angabe des jewe gen Resekt onsorts, der TNM-K ass f kat on und der e ngesetzten Basa med en [m t * mar k erte Ze en wurden vom Krebs nst tut der Un vers tät P ttsburgh (USA) etab ert¹²¹, mit ** gekennze chnete Ze en wurden von Amer can Type Cu ture Co ect on kommerze erworben].

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien (Tab. 9) wurden als adhärenente und permanente Kulturen unter einer Schutzatmosphäre bei 5 % CO₂, 95 % gesättigter Luftfeuchtigkeit und 37 °C kultiviert. Dem Proliferationsverhalten adaptiert erfolgte die Subkultivierung mit Medienwechsel im Intervall von 72 Stunden unter keimfreien Kautelen. Der konfluente Monolayer wurde mit vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS bzw. PBS low) gewaschen. Gelöst wurden die adhärenenten Zellen enzymatisch im Detachment- und shake-off-Verfahren mittels einer Trypsin-EDTA-Lösung. Zur Passagierung wurden die Zellsuspensionen gesplittet und mit frischem Nährmedium ergänzt (Tab. 4)¹²².

2.2.1.1 Automatisierte Zellzählung

Die Quantifizierung vitaler Suspensionszellen erfolgte mit dem Zellzähler Casy® TT im Coulter-Prinzip. Dieses automatisierte und volumenbasierte Aggregationsmessverfahren beruht auf der Impedanzmessung und Pulsflächenanalyse. Sie dient der Bestimmung der Zellkonzentration sowie von -viabilität, -volumen, -aggregation und -debris. Hierfür wurden 10 µl der aliquotierten Zellsuspension in 10 ml einer isotonen, elektrisch leitfähigen Lösung überführt (1:1.000). Während dem Messverfahren liegt ein elektrischer Widerstand an der Durchflusskapillare an. Treten Zellen mit intakter Zytoplasmamembran durch die Messpore erhöht sich analog der elektrische Widerstand, da vitale Zellen mit unversehrter Oberflächenintegrität isolatorisch wirken. Diese Impedanzverschiebungen werden in elektrische Pulse umgewandelt und durch die Analysesoftware CASYstat als Konzentration Zellzahl pro ml umgerechnet. Hierbei ist die Impulszahl mit der Zellkonzentration und die Impulsamplitude mit dem Zellvolumen korreliert¹²³.

2.2.2 Zytotoxizitätsassay

Die Zellen [1×10^4 pro Well in 100 µl] wurden als Triplikate auf 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht inkubiert. Für die *in vitro* Monotherapien wurden Cortisol, MLN4924, QNZ, TPCA-1 sowie FasL in log₂-Stufen seriell verdünnt, wobei je nach biologischer Aktivität der Wirkstoffe unterschiedliche Startkonzentrationen gewählt wurden. Zur prozentualen Normierung (auf 100 %) der zytotoxischen Effekte wurden die Zellen in Spalte zehn als Kontrollen streng nur mit

Nährmedium behandelt. Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Zellen im Kristallviolettassay quantifiziert (Kap. 2.2.2.1). Aus diesen Daten konnten initial-inhibitorische Wirkstoffdosen [IC_{10} (*engl.: inhibitory concentration of 10 %*)] bestimmt werden, die die relative Zellzahl (%) um ein Zehntel reduzierten. War aufgrund einer eingeschränkten biologischen Aktivität einzelner Wirkstoffe kein IC_{10} -Wert festzustellen, wurde die Verdünnungsstufe, welche als erste zu einer signifikanten Zellzahlreduktion führte, als IC_{10} -Wert definiert und mit 1σ bezeichnet. Diese individuell bestimmten Konzentrationen wurden in den Kombinationstherapien mit FasL als \log_2 -Verdünnungsreihe konstant appliziert.

2.2.2.1 Kolorimetrische Quantifizierung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der zytotoxischen Effekte der zu untersuchenden Inhibitoren wurde die Kristallviolettmethode nach *Gillies et al.* verwendet¹²⁴. Hierbei infiltriert der basische Farbstoff Kristallviolett adhärente bzw. vitale Zellen des Monolayers und interkaliert in deren DNA. Somit korreliert die optische Dichte der photometrisch messbaren Extinktion mit der Zellzahl¹²⁵. Zur Versuchsanalyse wurden die Zellen nach Aspiration des Überstands mit 50 μ l Kristallviolettlösung (Tab. 7) für 12 Minuten gefärbt. In mehreren Waschzyklen wurde ungebundener Farbstoff mit deionisiertem Wasser von der Platte gespült und diese für 24 Stunden luftgetrocknet. Der gebundene Farbstoff wurde mit Methanol (100 μ l pro Well) gelöst und photometrisch im Mikroplatten-Reader Tecan Infinite® F50 bei einer Wellenlänge von 595 nm (OD_{595nm}) quantifiziert¹²⁶.

2.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay

Der quantitative Nachweis der Zytokinsekretion wurde mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) erbracht. Diese Methode, bei der ein Antikörper zum Antigennachweis mit einem Indikatorenzym konjugiert wird, geht auf *Engval et al.* und *van Weemen et al.* zurück^{127,128}. In vorliegendem Fall wurde das Prinzip der indirekten sandwich-ELISA (sELISA) genutzt. Hierbei wird ein Antigen durch Anwendung unterschiedlicher Antikörper, welche dieses beidseits binden, detektiert. Capture-Antikörper adsorbieren das nachzuweisende Antigen an die Plattenoberfläche. Unmarkierte Detektionsantikörper sowie mit Meerrettichperoxidase-konjugierte Zweitantikörper binden an das fixierte Antigen und setzen eine enzymatische Farbreaktion in Gang. Diese verhält sich linear zur ausgebrachten

Antigenmenge und kann photometrisch quantifiziert werden. Vorteil dieser Methode ist der Nachweis geringer Antigenkonzentrationen¹²⁹. Für die durchgeführten Versuche wurden kommerziell erhältliche Kits eingesetzt (Tab. 6) und wie im Folgenden erläutert modifiziert angewendet.

2.2.3.1 sELISA zur Quantifizierung der Zytokinsekretion

Zur Bestimmung der Zytokintiter wurden 2×10^4 Zellen pro Well in 100 μ l Medium als Duplikate ausgesät und die Überstände nach 24 bzw. 48 Stunden geerntet. Um die Zytokinkonzentration mit der Zellproliferation korrelieren zu können, wurde die Zellzahl im Kristallviolettassay quantifiziert (Kap. 2.2.2.1). Hochbindungsaffine Mikrotiterplatten wurden mit dem capture-Antikörper-Ansatz (50 μ l pro Well) bei 4 °C über Nacht beschichtet. Am Folgetag wurden die Platten dreimal mit PBS-Tween gewaschen und freie Bindungsstellen mit 200 μ l assay diluent für 1 Stunde bei Raumtemperatur gesättigt. Nach dreimaligem Waschen wurden je 70 μ l Standards [0 – 0,5 – 1 – 2 ng/ml] sowie die Proben aufgetragen und für 2 Stunden inkubiert. Es folgten fünf Waschzyklen und der Auftrag von 50 μ l mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase konjugierter Antikörper (bzw. working detector). Nach einstündiger Inkubation und sieben Waschschrritten wurde die Substratlösung (100 μ l pro Well) enzymatisch umgesetzt. Je nach Reaktionsgeschwindigkeit wurde der Farbumschlag mit 2 N H₂SO₄ (bzw. stop solution) gestoppt und bei 405 nm (OD_{405nm}) im ELISA-Mikroplatten-Reader gemessen.

2.2.3.1.1 Validierung des ELISA-Kits

Zur Prüfung der Güte des eingesetzten Testverfahrens wurden TNF- α -Standards als Positivkontrollen gemessen. Die seriell verdünnten Konzentrationen der rekombinanten Standardlösungen konnten photometrisch verifiziert werden, weshalb von einer validen Versuchsdurchführung ausgegangen werden konnte. Um die Messwerte vom metho-

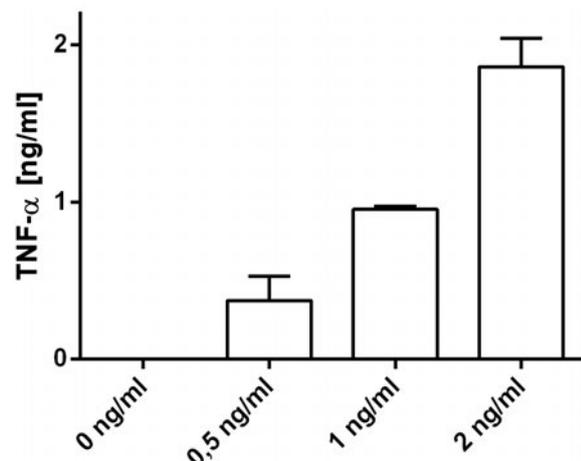


Abb. 6: Positivkontrolle der TNF- α -sELISA. Zur Validierung und Bestimmung absooluter Zytokinkonzentrationen der TNF- α -sELISA wurden rekombinante TNF- α -Standards als 2-Verdünnungsreihe aufgetragen und photometrisch gemessen. Hieraus wurden mithilfe einer linearen Regressionsanalyse die absooluten Zytokinkonzentrationen [ng/ml] berechnet.

dischen Hintergrundsignal zu bereinigen, wurde der Background durch Kontrollproben ohne TNF- α bestimmt. Hierfür wurden frische Zellkulturmedien analysiert. Die Bestimmung absoluter Zytokinkonzentrationen erfolgte durch lineare Regressionsanalyse. Dabei wurde die optische Dichte bzw. Extinktion der einzelnen Verdünnungsstufen gegen die jeweiligen Konzentrationen der Standards aufgetragen und die Steigung dieser linearen Funktion berechnet:

$$y = 0,0568x$$

Die Konversion der photometrisch quantifizierten Extinktionswerte in absolute Zytokinkonzentrationen [ng/ml] wurde folgendermaßen durchgeführt:

$$x = y/0,0568$$

Dabei gilt:

$$x = \text{TNF-}\alpha \text{ [ng/ml]}$$

$$y = \text{OD}_{405\text{nm}}$$

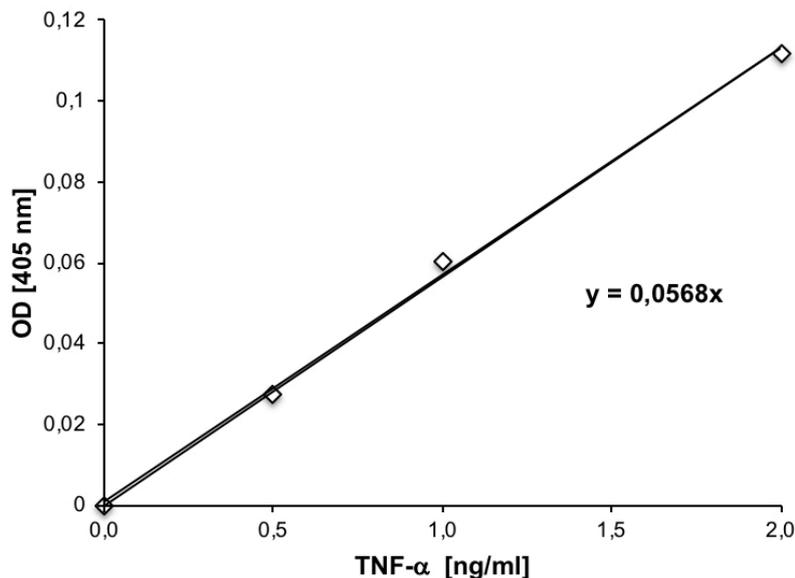


Abb. 7: Lineare Regressionsanalyse zur Bestimmung der Zytokinkonzentration [ng/ml]. Die optische Dichte ($\text{OD}_{405\text{nm}}$) der rekombinant hergestellten TNF- α -Standard-Lösungen wurde gegen die entsprechende TNF- α -Konzentration aufgetragen und mittels Trendline als Steigungsfunktion dargestellt. Die Steigung der Standardkurve wurde durch lineare Approximation mit der Software Microsoft Excel berechnet.

2.2.3.1.2 sELISA zur Quantifizierung der IL-8-Sekretion

Zum Nachweis der durch die Inhibitoren des NF- κ B pathways gehemmten IL-8-Freisetzung wurden die Proben entsprechend präpariert (Kap. 2.2.3.1). Vor Inkubation der Zellen wurden die Überstände aspiriert, um das Hintergrundsignal der basalen IL-8-Sekretion zu minimieren. Kombiniert behandelte Proben (NF- κ B-Inhibitor + TNF- α) wurden initial mit den Inhibitoren [IC₁₀] in doppelter Konzentration (50 μ l pro Well) vorstimuliert. Um sicherzustellen, dass alle Proben einheitlich behandelt werden, wurden die monotherapeutisch nur mit dem jeweiligen Inhibitor oder TNF- α behandelten Proben mit frischem Medium (50 μ l pro Well) vorinkubiert. Nach 6 Stunden wurden die NF- κ B-Inhibitoren [IC₁₀] und TNF- α [5 ng/ml] in jeweils doppelter Dosis (50 μ l/Well) appliziert. Die Überstände wurden nach 48 Stunden geerntet und bis zur Versuchsdurchführung bei -20 °C gelagert. Zur Korrelation der sezernierten IL-8-Level [ng/ml] mit der relativen Zellzahl (%) wurden diese als Kristallviolett-Assay quantifiziert (Kap. 2.2.2.1).

2.2.4 Two-step reverse-transcription quantitative real-time polymerase chain reaction

Für diesen Assay (bzw. RT-qPCR) wurden 3 x 10⁶ Zellen je Probe auf 6-Well-Platten ausgesät. Nach Inkubation über Nacht und anschließender Aspiration des Mediums am Folgetag wurde der konfluente Zellrasen mit vorgewärmtem PBS (bzw. PBS low) gewaschen und mit den NF- κ B-pathway-Inhibitoren [IC₁₀₀ (Tab. 13)] für 24 Stunden inkubiert.

2.2.4.1 Präparation der Gesamt-RNA

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Quiagen RNeasy® Mini Kit in der Silicagel-Membran-Technik¹³⁰. Hierbei adsorbieren mit positiv geladenen Siliziumdioxid beschichtete Membranen polyanionische Ribonukleinsäuren^{131,132}. Die Aufreinigung der RNA erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde bis zur Versuchsdurchführung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.1.1 Spektralphotometrische Nukleinsäureanalyse

Die Quantifizierung der extrahierten Gesamt-RNA-Konzentration erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoDrop® ND-2000c in den Wellenlängenbereichen von 260 und 280 nm. Die RNA-Konzentration [ng/ μ l] wurde wie folgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$c = \frac{A \times \varepsilon}{d}$$

Dabei gilt:

c = RNA-Konzentration [ng/ μ l]

A = Absorption bei gegebener Wellenlänge λ

ε = Wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient [$\frac{\text{ng} \times \text{cm}}{\mu\text{l}}$]

bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ beträgt $\varepsilon = 40 [\frac{\text{ng} \times \text{cm}}{\mu\text{l}}]$

d = Schichtdicke bzw. Messstrecke (cm)

Die Ratio $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ soll gemäß *Desjardins et al.* bei etwa 2 liegen, um von einer reinen RNA-Lösung ausgehen zu können¹³³. Da der Absorptionswert von $A_{260\text{nm}}$ einer Konzentration von 40 μg einzelsträngiger RNA pro ml entspricht, kann die RNA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$] folgendermaßen berechnet werden:

$$c [\mu\text{g}/\text{ml}] = A_{260} \times 40 [\mu\text{g}/\text{ml}]$$

2.2.4.2 Synthese komplementärer DNA

Die Gesamt-RNA wurde mit dem Quiagen QuantiTect® Reverse Transcription Kit in komplementäre DNA [engl.: *complementary DNA (cDNA)*] umgeschrieben. Die cDNA-Erststrang-Synthese erfolgte gemäß Herstellerangaben. Hierfür wurde das Probenvolumen mit 1.000 ng RNA wie folgt berechnet:

$$V (\mu\text{l}) = \frac{1.000 \text{ ng}}{c [\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}]}$$

Dabei gilt:

V = Benötigtes Volumen der RNA-Lösung der jeweiligen Probe (μl)

c = RNA-Konzentration der entsprechenden RNA-Lösung [ng/ μl]

Das mit RNase-freiem H₂O auf 12 µl ergänzte Gesamtvolumen wurde mit 2 µl wipeout-Puffer für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert, um residuale genomische DNA zu eliminieren. Der Reverse Transkriptase (RT)-Mastermix wurde folgendermaßen angesetzt:

- 4 µl RT buffer
- 1 µl RT primer mix
- 1 µl RT

Die templates wurden mit 6 µl Mastermix versetzt und für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Transkriptase wurden die Proben für 3 Minuten bei 95 °C inkubiert und abschließend mit TE-Puffer (pH 8) ergänzt.

2.2.4.3 Farbstoffbasierte real-time two-step RT-qPCR

Die Genexpressionsanalyse wurde in einem zweizeitigen Verfahren mit primärer cDNA-Erststrang-Synthese und anschließender Amplifikation im Thermocycler (CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System) als SYBR® Green-basierte quantitative real-time-PCR durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green interkaliert hochspezifisch in die kleine Furche der zu amplifizierenden DNA und emittiert bei einer Wellenlänge von $\lambda = 494$ nm ein Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei $\lambda = 521$ nm¹³⁰. Für diesen Assay wurden 12,5 µl QuantiTect® SYBR® Green Mastermix mit 10,5 µl template (20 ng cDNA) je Probe als Reaktionsmix pipettiert. Dieser wurde als Duplikat mit 2 µl Primer je Probe versetzt. Das für β -Actin kodierende housekeeping-Gen ACTB wurde als Referenztranskript zur Quantifizierung der relativen Genexpression des Zieltranskripts genutzt¹³⁴. Um die im Mastermix enthaltene HotStarTaq® DNA Polymerase zu aktivieren, wurden die Proben initial bei 95 °C für 15 Minuten inkubiert. Hieran anschließend wurden 40 Zyklen der folgenden Reaktionsschritte durchlaufen:

- DNA-Denaturierung: 94 °C für 15 Sekunden
- Primer-annealing: 54 °C für 30 Sekunden
- Elongation: 72 °C für 30 Sekunden

2.2.5 Fluorescence-activated cell sorting

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) ist eine Variante der Durchflusszytometrie, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen entsprechend ihrer

Lichtemission analysiert^{135,136}. Durch Vibrationen werden Proben zu Einzelzellsuspensionen hydrodynamisch fokussiert¹³⁷. Fluorochrome emittieren nach Anregung durch energetisierte Elektronen Photonen eines spezifischen Emissionsspektrums¹³⁸. Gemäß dem Prinzip der Lichtstreuung an Grenzflächen wird die Ausbreitungsrichtung des Lichts beim Auftreffen auf die Zelloberfläche abgelenkt. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität ziehen, was eine Zelldifferenzierung ermöglicht¹³⁹. Die Datenakquisition erfolgte mit dem Durchflusszytometer BD FACSCALIBUR™, die Analyse mit der Software BD CellQuest™ Pro und die Datenauswertung sowie graphische Darstellung mit der Software FlowJo® V10.

2.2.5.1 Annexin V PE/7-AAD-Doppelmarkierung

Die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbetechnik mit den Farbstoffen Annexin V PE und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) erlaubt die durchflusszytometrische Evaluation des programmierten Zelltods. Dabei können unterschiedliche Formen und Stadien bestimmt werden. Die Apoptose ist charakterisiert durch die Translokation von Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche. Durch diesen Flip-Flop-Mechanismus wird die Zelle für den phagozytotischen Zellverdau gekennzeichnet¹⁴⁰. Das mit Phycoerythrin (PE) gelabelte Annexin V ist ein phospholipidbindendes Protein, welches durch Ca^{2+} vermittelt hochspezifisch an externalisiertes Phosphatidylserin assoziiert. Somit dient es dem Nachweis frühapoptotischer Zellen. Bei spätapoptotischen Zellen kommt es zusätzlich zur Desintegration der Zellmembran¹⁴¹. Hierdurch kann das Chromopeptid 7-AAD, ein Vitalitätsfarbstoff mit hoher DNA-Bindungsaffinität für Guanin-Cytosin-reiche Sequenzen, die Zellen nukleär anfärben¹⁴². Durch den kombinierten Einsatz beider Farbstoffe lassen sich außerdem tote Zellen subdifferenzieren. Für die Versuchsdurchführung wurde das eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit PE genutzt. 1×10^6 Zellen wurden pro Probe auf 6-Well-Platten transferiert und über Nacht inkubiert. Vor der Stimulation wurden die Überstände aspiriert und das Zelllayer mit PBS (bzw. PBS low) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den NF- κ B-Inhibitoren [IC₁₀₀ (Tab. 13)] für 48 Stunden inkubiert. Nach dem Ernten der Überstände und der trypsinisierten Zellen wurden diese pelletiert und mit PBS und 1x binding buffer gewaschen. Vor Anfärbung mit Annexin V PE (5 μ l je Probe) wurde

das Pellet in 1x binding buffer gelöst. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit 1x binding buffer gewaschen und resuspendiert. Mit 5 µl 7-AAD je Probe erfolgte die Doppelfärbung. Die Proben wurden in Analyseröhrchen transferiert und bis zur Messung bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert. Zum Setup des Zytometers wurde das Zellpanel ohne Annexin V PE- oder 7-AAD-Färbung vermessen. Da alle Zelllinien eine homogene Beschaffenheit aufwiesen, wurden einheitliche Messparameter angewendet:

Parameter	Detektor	Spannung	Verstärkung	Modus
P1	FSC	E1	3,32	Lin
P2	SSC	295	1	Lin
P3	FL1	412	1	Log
P4	FL2	290	1	Log
P5	FL3	390	1	Log
P6	FL2-A	-	1	Lin
P7	FL4	800	-	Log

Tab. 10: Instrument-Setting. Einstellungen der Detektoren des Durchflusszytometers BD FACSCalibur™ bezüglich der gewählten Spannungen, Fluoreszenzkanäle und Verstärkungen, um mit der Annexin V PE/7-AAD-Doppelfärbemethode die Induktion der Apoptose durch NF-κB-pathway-Inhibitoren zu analysieren.

Die Messungen wurden als Zweiparameterdarstellungen (bzw. dot plots) abgebildet (Abb. 8). Das Signal des in Richtung des Messlasers gestreuten Lichts bzw. Vorwärtsstreulichts [forward scatter height (FSC-H)] wurde auf der x-Achse aufgetragen. Hiermit werden die flach nach vorne abgelenkten Strahlen bzw. die relative Zellgröße detektiert¹⁴³. Auf der y-Achse wurde das Seitwärtsstreulicht [side scatter height (SSC-H)] dargestellt. Dies ist die Strahlung, die nahezu rechtwinklig an der Zelloberfläche gebrochen wird. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die Granularität und die innere Beschaffenheit der Zellen ziehen¹⁴⁴. Aufgrund der Doppelfärbetechnik wurden im acquisition density plot der fluorescent channel 2-height (FL2-H) in der x-Achse und FL3-H in der y-Achse gewählt (Abb. 8). Der FL2-H-Kanal detektiert mit PE-konjugiertes Annexin V bei einer Erregungswellenlänge von $\lambda = 488$ nm. Im FL3-H-Kanal wird 7-AAD bei $\lambda = 635$ nm gemessen. Dabei bedeutet „H“ (*engl.: height*), dass die Signalthöhe, also die maximale Fluoreszenzemission, registriert wird.

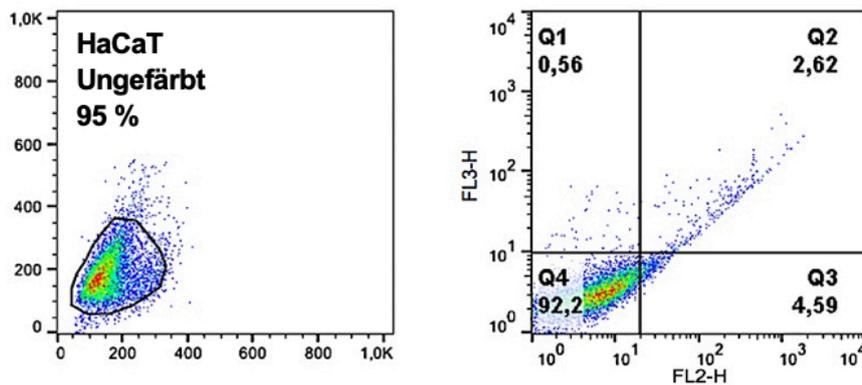


Abb. 8: Geräte-Setup. Nativ, ungefärbte HaCaT wurden durchflusszytometrisch auf ihr Aussehen und Verhalten im Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ analysiert, um die Messparameter für den FACS-Apoptose-Assay zu definieren.

2.2.5.1.1 Positionierung des Quadrantenmarkers

HaCaT-Zellen wurden entsprechend des Protokolls präpariert und als Standard analysiert (Kap. 2.2.5.1). Der Quadrantenmarker wurde derart positioniert, dass > 90 % der gesamten Zellpopulation in Q4 lokalisiert war (Abb. 9). Dieser Quadrant ist definiert als Bereich, in dem weder Annexin V PE- noch 7-AAD-positive Zellen zu liegen kommen und somit als vital gelten. Q1 stellt die Annexin V-negative und 7-AAD-positive Population dar. Dies sind Zellen, die sich im unspezifischen Zelltod befinden. In Q3 werden frühapoptotische, also Annexin V-positive und 7-AAD-negative Zellen, wohingegen in Q2 Annexin V- und 7-AAD-positive Zellen in einem spätapoptotischen Stadium abgebildet werden. Diese Einstellung wurde für alle weiteren Messungen und Auswertungen übernommen.

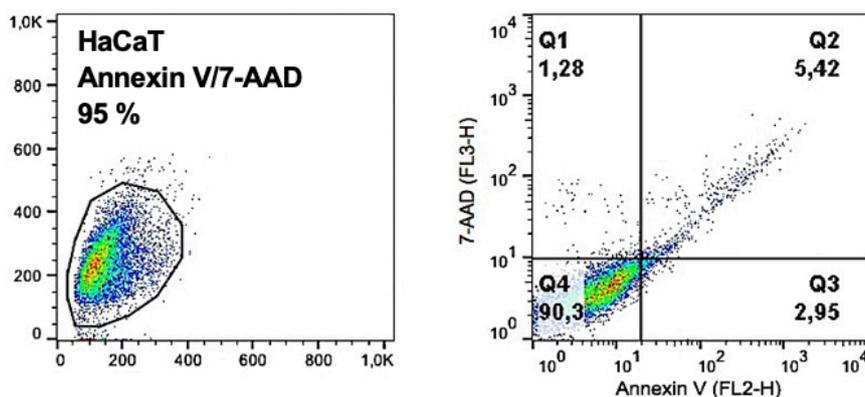


Abb. 9: Positionierung des Quadrantenmarkers. Durchflusszytometrische Untersuchung der HaCaT zur Parameterbestimmung im Annexin V PE/7-AAD-Apoptose-Assay. Darstellung des acquisition dot plots (links) mit Gating der Population of Interest ($\geq 95\%$ der Bezugspopulation). Der Quadrantenmarker im acquisition density plot (rechts) zeigt die Quadranten Q1 (Annexin V-/7-AAD+), Q2 (Annexin V+/7-AAD+), Q3 (Annexin V+/7-AAD-) und Q4 (Annexin V-/7-AAD-) unter Angabe des Anteils der Zellpopulation (%). Diese Einstellungen wurden für alle weiteren Messungen dieser Versuchsreihe übernommen.

2.2.6 Datenauswertung

Die statistische Auswertung erfolgte wie in den anschließenden Unterkapiteln detailliert beschrieben. Dazu kamen folgende Softwares zu Einsatz:

Name	Version	Hersteller	Herkunft
Microsoft® Office Excel 2016	16.16.10	Microsoft Corporation	München
GraphPad Prism	6.04	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
MEDAS	-	Grund EDV-Systeme	Margetshöchheim

Tab. 11: Verzeichnis der statischen Softwares. Auf stung der e ngesetzten Computerprogramme zur statischen Datenana yse und -darste ung m t Angabe von Softwarevers on, Herstel er und Herkunft.

Durchgeföhrt wurden die statistischen Auswertungen von Herrn Dr. med. dent. Mario J. J. Scheurer mit freundlicher Unterstötzung und fachkundiger Beratung durch Frau Dr. rer. nat. Imme Haubitz.

2.2.6.1 Bestimmung der absoluten Zytokintiter

Die Konzentrationsbestimmung der im sELISA analysierten Zytokintiter wurde durch eine lineare Regressionsanalyse realisiert. Zwecks absoluter Quantifizierung wurden externe Standards als Verdünnungsreihe [0 – 0,5 – 1 – 2 ng/ml] vermessen und die duplikat aufgetragenen Proben zu arithmetischen Mittelwerten (MW) zusammengefasst. Die Extinktionswerte [y-Achse, OD_{405nm}, (Abb. 7)] wurden in einer linearisierten Standardkurve gegen die jeweiligen Verdünnungsstufen (x-Achse) aufgetragen. Aus der hieraus resultierenden Trendlinie konnte über eine lineare Funktion die Steigung dieser Geraden berechnet werden:

$$x = \frac{y}{m}$$

Dabei gilt:

x = Konzentration [ng/ml]

y = OD_{405nm}

m = Steigung

2.2.6.2 Standardisierung der Zytokintiter

Um die sezernierten Zytokinmengen mit der Zellproliferation zu korrelieren, wurden die Zytokinkonzentrationen mit der relativen Zellzahl (%) in Beziehung

gesetzt. Hierfür wurde die absolute Konzentration des sezernierten Zytokins [ng/ml] auf die entsprechende Kontrolle [ng/ml] normiert:

$$ELISA_R = \frac{ELISA_S}{ELISA_C}$$

Dabei gilt:

$ELISA_R$ = Relatives Zytokinexpressionslevel

$ELISA_S$ = Sezerniertes Zytokin [ng/ml]

$ELISA_C$ = Kontrolle [ng/ml]

Die Normierung der relativen Zytokinfreisetzung auf die relative Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$E_R = \frac{ELISA_R}{CV_R}$$

Dabei gilt:

E_R = Quotient aus rel. Zytokintiter und rel. Zellzahl

$ELISA_R$ = Relatives Zytokinexpressionslevel

CV_R = Rel. Zellzahl im Kristallviolettassay

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Rangsummentest (Kap. 2.2.6.5). Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, was statistisch signifikante Effekte indizierte.

2.2.6.3 $\Delta\Delta$ Ct-Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression

Die mittels PCR gewonnenen Rohdaten wurden mit der Software CFX Manager™ erhoben. Um die Wirkung der NF- κ B-pathway-Inhibitoren auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden Expressionsunterschiede (bzw. Ratios) von Proben, die mit den Inhibitoren vorbehandelt wurden, mit den unbehandelten Kontrollproben verglichen. Hierfür wurde das Prinzip der Normalisierung der Expression auf ein stabil exprimiertes, unreguliertes und ubiquitär vorkommendes

housekeeping-Gen (β -Actin) angewendet¹⁴⁵. Als Maß für die Quantifizierung wird der Schwellenwertzyklus bzw. Ct-Wert (*engl.: cycle threshold*) herangezogen. Dieser Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem es am Übergang der lag- zur log-Phase zu einem exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals als Indikator der Amplifikation des Genprodukts kommt. Je mehr cDNA in der Probe vorliegt, desto weniger Zyklen sind nötig, um diese Grenze zu überschreiten¹⁴⁶. Zunächst wurde aus den Ct-Werten der in Duplikaten gemessenen Proben das arithmetische Mittel gebildet und die Standardabweichung der Grundgesamtheit σ berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}$$

Dabei gilt:

σ = Standardabweichung der Grundgesamtheit

n = Anzahl der Messwerte bzw. Umfang der Grundgesamtheit

x_i = Merkmalsausprägung am i -ten Element

μ = Erwartungswert

Die Berechnung der Ratio bzw. des auf β -Actin normierten relativen Expressionslevels wurde mit der modifizierten $\Delta\Delta$ Ct-Methode nach *Pfaffl* durchgeführt^{147,148,149}:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}^{\beta\text{-Actin}} - \text{Ct}^{\text{Probe}} \quad (1)^*$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \text{Ct}^{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}^{\text{Kontrolle}} \quad (2)$$

$$\text{Ratio} = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (3)^*$$

(Modifizierte Formeln wurden mittels Sternchen gekennzeichnet.)

Ein fold change (FC) > 1 bedeutet, dass es zu einer Steigerung des Expressionslevels im Vergleich zur Kontrolle kam. Dementsprechend ist FC < 1 als Senkung der Genexpression zu werten. Aufgrund der exponentiellen Berechnungsweise kann man bei FC-Werten im Bereich von - 2 bis + 2 keine sichere Aussage

über die Genregulation treffen, weshalb diese als unreguliert definiert wurden. Deshalb wurden Zu- bzw. Abnahmen des FC-Werts > 2 als signifikant definiert und folgendermaßen graduell klassifiziert:

Leicht: Faktor 2 bis 5

Mittel: Faktor > 5 bis 10

Stark: Faktor > 10

2.2.6.4 Deskriptive Statistik der Zytotoxizitätsassays

Zur Realisierung einer hohen statistischen Reliabilität innerhalb des erhobenen Datensatzes wurden die Assays in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert. Die zu arithmetischen Mittelwerten (MW) zusammengefassten Extinktionen wurden durch Subtraktion des unspezifischen Backgrounds ($BG_{OD595nm}$) vom methodischen Hintergrundsignal der Kristallviolett färbung bereinigt. Die Standardabweichung (SD) der Grundgesamtheit σ wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}$$

Dabei gilt:

σ = Standardabweichung der Grundgesamtheit

n = Anzahl der Messwerte bzw. Umfang der Grundgesamtheit

x_i = Merkmalsausprägung am i -ten Element

μ = Erwartungswert

Die vom Hintergrund bereinigten Messwerte wurden mit den als Standard definierten Mittelwerten ($MW_{OD595nm}$) der unstimulierten Kontrolle in prozentuale Relation gesetzt. Dabei wurde der MW des Standards auf 100 % normiert. Die Berechnung der relativen Zellzahl (%) geschah wie folgt:

$$\left(\frac{(MW_{OD595nm} \text{ (stimulierte Zellen)} - BG_{OD595nm})}{(MW_{OD595nm} \text{ (Standard)} - BG_{OD595nm})} \right) \times 100 = \text{rel. Zellzahl (\%)}$$

Aus den Triplikaten der $MW_{OD595nm}$ (stimulierte Zellen) wurde die SD in % ermittelt:

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

2.2.6.5 Induktive Statistik zur Hypothesentestung

Die statistische Testung und Berechnung der Halbhemmkonzentrationen (Kap. 2.2.6.6) erfolgte mit den Softwares GraphPad und MEDAS. Zur Datenanalyse und Überprüfung der aufgestellten Hypothesen wurde der Mann-Whitney-Test genutzt. Dabei wurden die Monotherapien (FasL) mit den Kombinationstherapien (FasL + Inhibitoren) verglichen. Entsprachen die Ergebnisse der Gauß-Verteilung, wurde der unabhängige t-Test verwendet. Hierbei werden Mittelwerte zweier unabhängiger Gruppen, welche metrische und normalverteilte Eigenschaften aufweisen, miteinander verglichen.

Der nichtparametrische Wilcoxon-Rangsummentest wurde eingesetzt, um zentrale Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben zu testen, wenn die Voraussetzungen für einen t-Test (s. o.) nicht erfüllt wurden¹⁵⁰.

Zum quantitativen Vergleich der Therapien wurden Signifikanzwerte bestimmt, um das zufällige Zustandekommen der Ergebnisse ausschließen und die Alternativhypothese annehmen zu können. Dabei demonstrierte ein p-Wert < 0,05 einen statistisch signifikanten Unterschied, wodurch diese Testergebnisse als Therapieerfolg, induziert durch den Wirkstoff, interpretiert werden konnten. Signifikante p-Werte < 0,05 wurden mit *, hochsignifikante p-Werte < 0,01 mit ** und höchstsignifikante p-Werte < 0,001 mit *** gekennzeichnet.

2.2.6.6 Berechnung der Halbhemmkonzentrationen

Zwecks Vergleichbarkeit der untersuchten Wirkstoffe wurde die Halbhemmkonzentration IC_{50} (*engl.: half maximal inhibitory concentration*) berechnet. Dies bezeichnet die Konzentration, bei der die 50%ige biologische Aktivität des Wirkstoffs erreicht bzw. die relative Zellzahl um die Hälfte reduziert wurde. Diese rechnerische Methode wurde folgendermaßen durchgeführt:

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Konzentration [ng/ml]	0	1,6	3,1	6,3	12,5	25	50	100	200
Konzentration [log2]		0,2	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2	2,3
Relative Zellzahl (%)	100	64,9	41,6	27,9	19,5	3	0,4	0,6	0,3

Die Feststellung des IC₅₀-Werts (%) als Mittelwert von Maximum zu Minimum:

$$IC_{50}(\%) = \frac{(100 + 0,3)}{2} = 50,2 \% \quad (1)$$

Berechnung der IC₅₀ [μM]:

$$x_1 = \log 1,5 \times 2 = \log 3 \quad (2)$$

$$y_1 = 64,9 \quad y_2 = 41,6 \quad y_0 = 50,2 \mu M \quad (3)$$

Berechnung von x₀ (vertikales Lot):

$$\frac{x_2 - x_1}{y_1 - y_2} = \frac{x_2 - x_0}{y_0 - y_2} \quad (4)$$

$$\frac{(x_2 - x_1) \times (y_0 - y_2)}{(y_1 - y_2)} = x_2 - x_0 \quad (5)$$

$$x_0 = x_2 - (x_2 - x_1) \frac{(y_0 - y_2)}{(y_1 - y_2)} \quad (6)$$

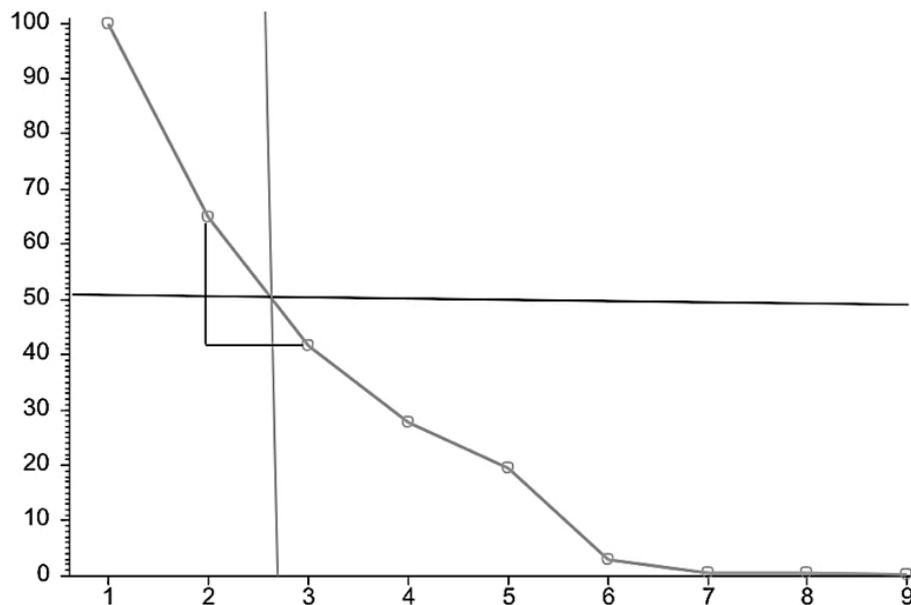


Abb. 10: Regressionsanalyse zur Bestimmung der Halbhemmkonzentrationen. Darstellung der rechnerischen IC₅₀-Bestimmung mittels Lotbrechung nach Feststellung der Dosis, bei der noch 50 % der behandelten Zellen vital sind (Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. Hauptz zur Verfügung gestellt).

2.2.6.7 Interaktionsindex y nach Tallarida

Zum quantitativen Nachweis synergistischer Effekte, welche durch die Kombinationstherapien induziert wurden, kam der Interaktionsindex y nach Tallarida zum Einsatz¹⁵¹. Um zwischen additiven, subadditiven und synergistischen Effekten zu unterscheiden, wurde zunächst der IC_{50} -Wert der Mono- und der Kombinationstherapien berechnet. Der Interaktionsindex y ist definiert als Gleichung der Konzentrationen von Wirkstoff A (NF- κ B-pathway-Inhibitor) und Wirkstoff B (FasL):

$$y = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

Dabei gilt:

$a = IC_{10}$ von A (Inhibitor) in Kombinationstherapie mit B (FasL)

$b = IC_{50}$ von B (FasL) in Kombination mit A (Inhibitor)

$A = IC_{50}$ von Wirkstoff A (Inhibitor) in Monotherapie

$B = IC_{50}$ von Wirkstoff B (FasL) in Monotherapie

Analyse:

$y = 1$ → additiver Effekt

$y < 1$ → superadditiver bzw. synergistischer Effekt

$y > 1$ → subadditiver bzw. antagonistischer Effekt

3 Ergebnisse

Aufgrund der zentralen Rolle von NF- κ B als Transkriptionsfaktor bei der Induktion von Inflammation in Tumorzellen, die zur Progression und zur Ausbildung von Therapieresistenzen beiträgt, soll die Wirkung heterogen targetierender NF- κ B-pathway-Inhibitoren – Cortisol, MLN4924, QNZ und TPCA-1 – auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-8 und TNF- α), die Proliferation und die Sensitivierung von HNSCC-Zellen für die Todesliganden-induzierte Apoptose *in vitro* analysiert werden.

3.1 Basale versus stimulierte Sekretion von IL-8

Speziell für das HNSCC ist der NF- κ B-Signalweg aufgrund seiner konstitutiven Aktivierung von Bedeutung, da dieser die robuste Produktion u. a. von Entzündungsfaktoren induziert^{78,152,153,154}. Deshalb wurde zu Beginn dieser Arbeit die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren untersucht. Analysiert wurde die basale und die durch TNF- α stimulierte IL-8-Ausschüttung (Abb. 11), da dieses Zytokin als etablierter Biomarker der Karzinogenese und der Inflammation im HNSCC gilt^{155,156,157}. IL-8 konnte insgesamt betrachtet bei allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Jedoch demonstrierte das Zellpanel eine heterogene Verteilung der basalen Sekretionsraten. Bei drei Zelllinien (*PCI 1-1*, *PCI 9-1* und *PCI 13-1*) konnte ein zeitabhängiger Konzentrationsanstieg nachgewiesen werden. Dagegen lagen die Titer von *PCI 52* und *SCC-25* nahe der Nachweisgrenze und wurden kaum über den Stimulationsintervall gesteigert. Auffälligerweise sezernierte die Referenzzelllinie HaCaT insgesamt deutlich erhöhte IL-8-Titer, die im Bereich der stimulierten Sekretion der Karzinomzelllinien lagen¹⁵⁸.

Da TNF- α ein hochpotenter Trigger der Inflammation von Tumorzellen ist, diente es zur Analyse der induzierten IL-8-Freisetzung. Alle HNSCC-Zelllinien reagierten hochresponsiv auf TNF- α mit deutlichen Zunahmen der IL-8-Spiegel (Abb. 11). Die Stimulation bewirkte in allen untersuchten HNSCC-Zelllinien einen signifikanten ($p < 0,05$) bis höchstsignifikanten ($p < 0,001$) Anstieg.

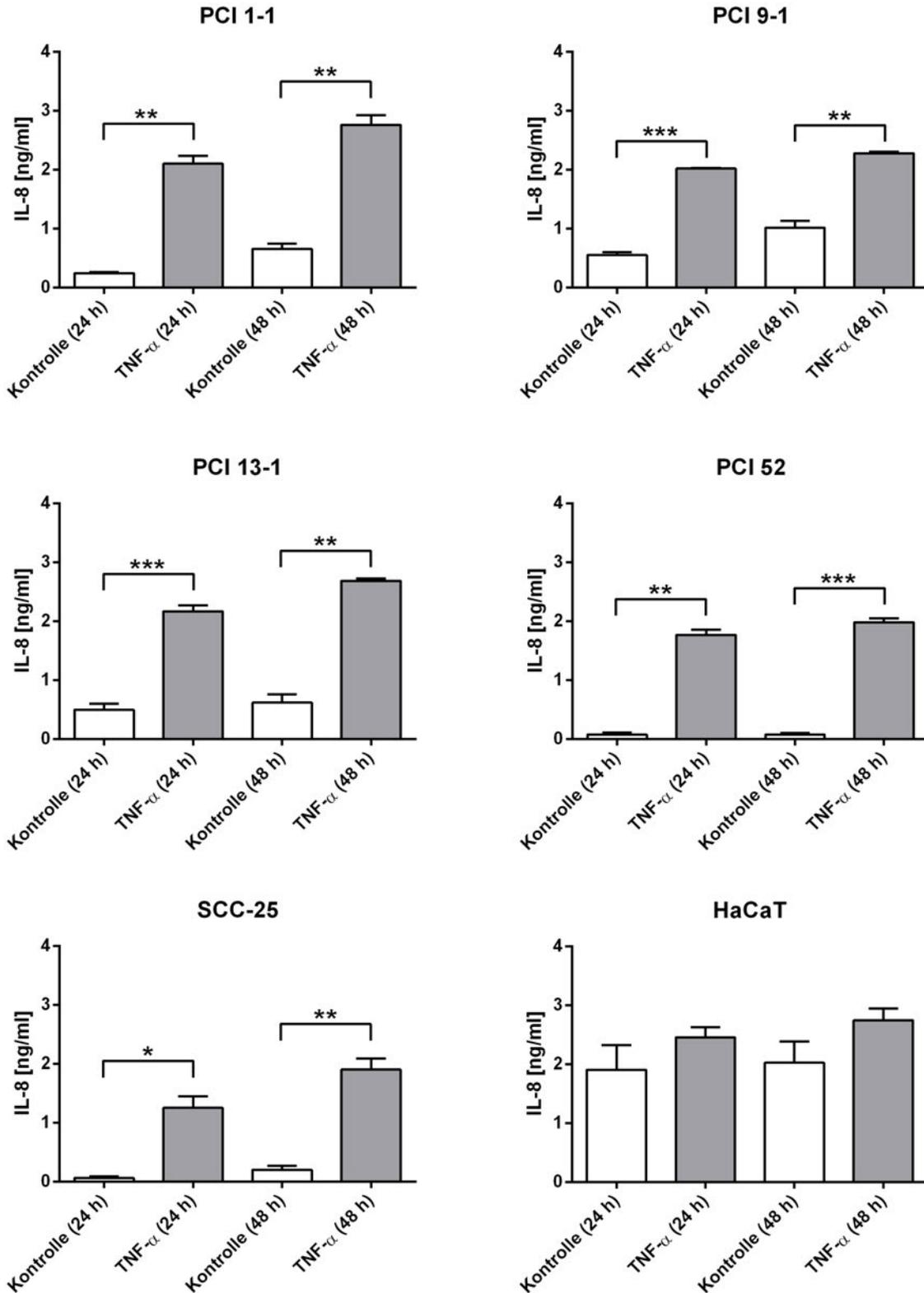


Abb. 11: IL-8-Sekretion. Die IL-8-Spiegel wurden mittels sELISA der Probenüberstände analysiert. Hierfür wurden die Zellen (2×10^4) mit und ohne TNF- α für 24 und 48 Stunden stimuliert. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, um Mittelwerte und Standardabweichungen berechnen zu können ($n = 3$). Die statistische Auswertung wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ kennzeichnen signifikante IL-8-nduzierende Effekte von TNF- α . Diese wurden mit * gekennzeichnet, hochsignifikante Effekte mit ** ($p < 0,01$) und höchstsignifikante Effekte mit *** ($p < 0,001$).

3.2 Konzept der autokrinen NF- κ B-Aktivierung durch TNF- α

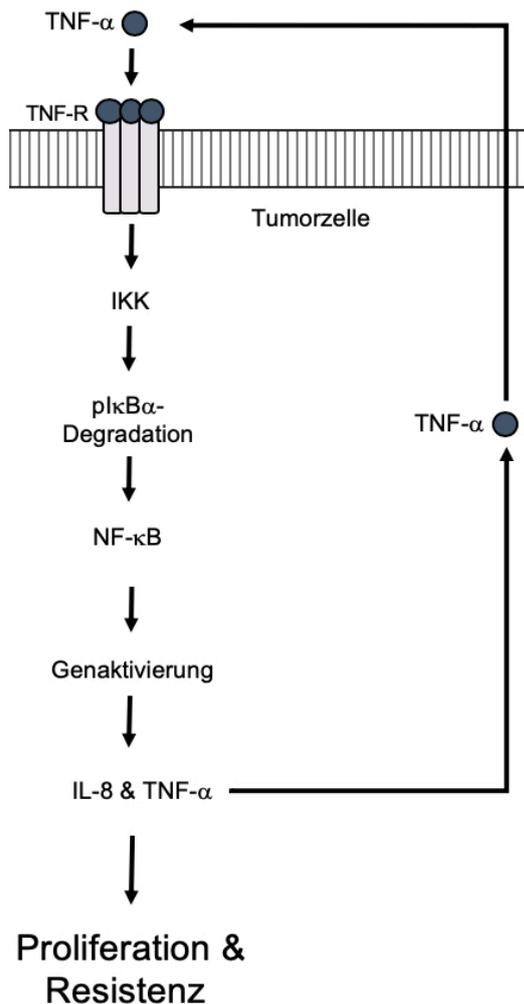


Abb. 12: Modell der konstitutiven NF- κ B-Aktivierung im HNSCC. Die autokrine Sekretion von TNF- α könnte den klassischen NF- κ B-Signalweg induzieren und über die proinflammatorische IL-8-Sekretion die Proliferation und Resistenz des HNSCC hervorrufen. Dieses Schema wurde modifiziert nach Jackson-Bernitsas *et al.* Evidenz, dass die TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediate konstitutive NF- κ B-Aktivierung und Proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2007;26 (10):1385-97.

Die TNF- α -induzierte Expression und Sekretion von Interleukinen könnte eine Ursache der Zellproliferation und Resistenz von Tumorzellen sein. Jackson-Bernitsas *et al.* stellten das Konzept eines Feedback-Mechanismus mit konstitutiver Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalwegs (Abb. 12) vor⁷⁸. Autokrines TNF- α könnte Tumorzellen proinflammatorisch programmieren und dergestalt als Wachstums- und Resistenzfaktor wirken¹⁵⁹. Um diesen Effekt zu untersuchen und auszuschließen, dass die TNF- α -abhängige Induktion der Zellproliferation (bzw. Zelltod) für die veränderte IL-8-Sekretion verantwortlich ist, erfolgte die Quantifizierung der relativen Zellzahl (Abb. 13). Dabei wurden die nach Aspiration der Probenüberstände adhären Zellen im Zytotoxizitätsassay analysiert (Kap. 2.2.2). In allen Proben stieg die relative Zellzahl über die Zeit an, was bei vier Zelllinien mit einer gesteigerten basalen IL-8-Sekretion korrelierte. Bei PCI 52 nahm die Zellzahl, trotz gleichbleibend

geringem IL-8-Level (Abb. 11), deutlich zu. HaCaT zeigte, trotz Zellwachstum, konstant hohe IL-8-Titer. TNF- α führte bei signifikanter Induktion der IL-8-Ausschüttung bei keiner Zelllinie zur Steigerung der Proliferation. Die NF- κ B-vermittelte Hochregulation von IL-8 könnte somit durch Induktion der Inflammation zur Resistenz führen, was die zielgerichtete Inhibition dieses Signalwegs als plausibles Target erscheinen lässt, um HNSCC-Zellen proapoptotisch zu sensitivieren.

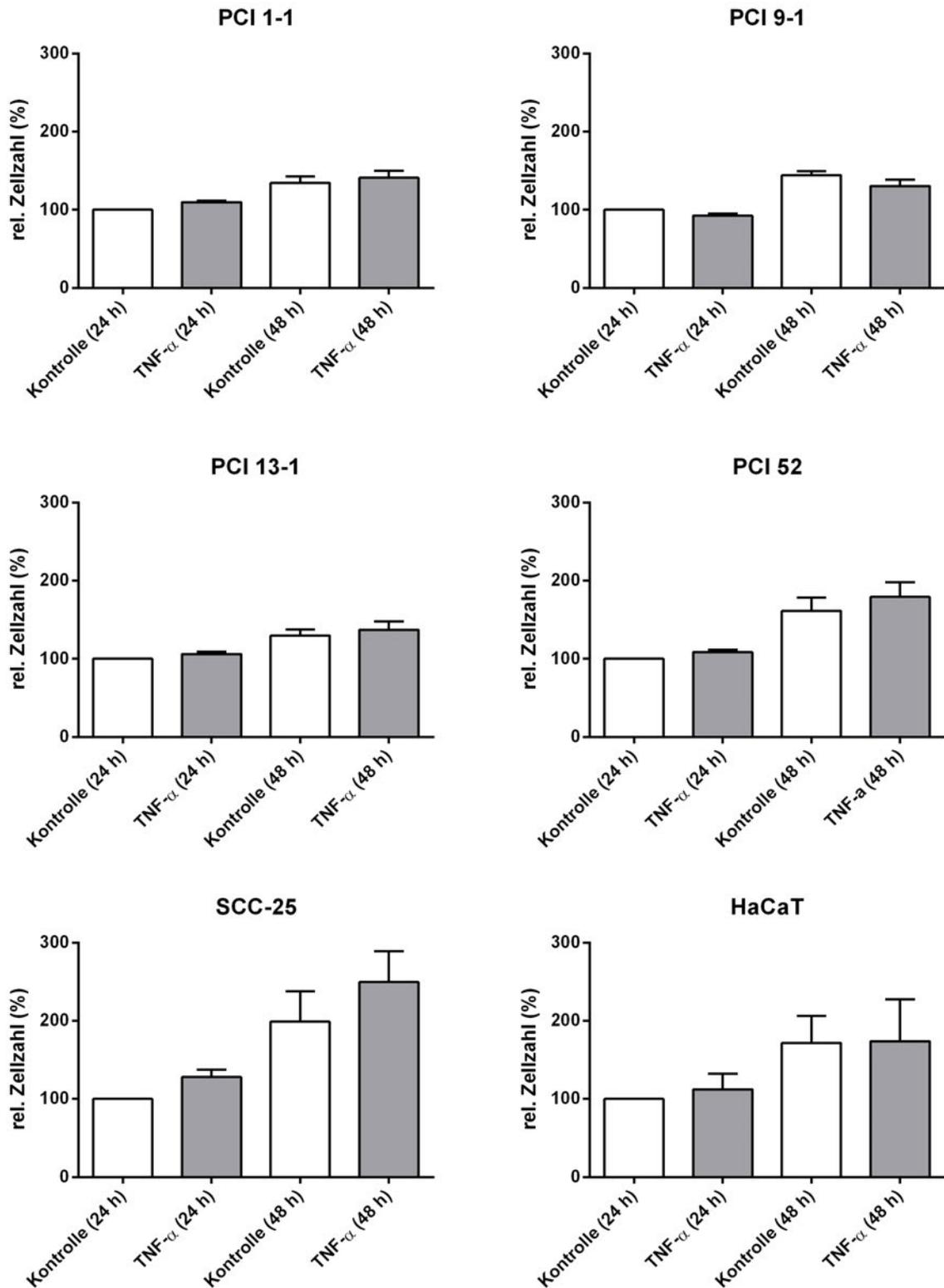


Abb. 13: Proliferatives Verhalten der HNSCC-Zellen unter TNF- α -Stimulation. Nach Aspirat von der Probenüberstände des IL-8-Assays wurde die relative Zellzahl (%) analysiert. Die Zellen (2×10^4) wurden mit TNF- α [100 ng/ml] für 24 bzw. 48 Stunden stimuliert (graue Balken). Die weißen Balken stellen die unstimulierten Kontrollen dar. Die relative Zellzahl (%) wurde auf die Kontrollgruppe (100 %) zum Zeitpunkt 24 Stunden normiert. Dieser Versuch wurde insgesamt in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, um Mittelwerte und Standardabweichungen berechnen zu können ($n = 3$). Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. TNF- α konnte die Zellviabilität nicht signifikant beeinflussen.

3.2.1 TNF- α -Freisetzung des HNSCC

Zur Analyse der TNF- α -Sekretion im HNSCC wurden die Zellen für 24, 48 bzw. 72 Stunden inkubiert und die Überstände mittels sELISA auf freies TNF- α untersucht.

3.2.1.1 Basalsekretion

TNF- α konnte in fünf der sechs untersuchten Zelllinien detektiert werden (Abb. 14). Bei zwei Zellen kam es zum zeitabhängigen Anstieg der TNF- α -Titer. Nach 72-stündiger Inkubation konnte bei PCI 1-1 231 pg/ml (\pm 130 pg/ml) und bei PCI 9-1 316 pg/ml (\pm 19 pg/ml) sezerniertes TNF- α nachgewiesen werden. HaCaT setzte über o. g. Zeitintervalle konstant TNF- α mit durchschnittlich 100 pg/ml frei. Bei PCI 13-1 und PCI 52 konnten nach 48 bzw. 72 Stunden Inkubation durchschnittlich 37,3 pg/ml (\pm 42,6 pg/ml) TNF- α dokumentiert werden. Nach Bereinigung der Messwerte vom unspezifischen Hintergrundsignal ergaben sich für SCC-25 negative Werte, weshalb diese mit Null gleichgesetzt wurden. Die geringe Ausschüttung von TNF- α war auch bei Wiederholung des Versuchs mit einem zweiten Kit, was die Reliabilität des gewählten Verfahrens bestätigte, weiterhin konsistent. Somit konnte von einer validen Methodik ausgegangen werden, was durch die TNF- α -Bestimmung der mitgelieferten Standards bestätigt wurde.

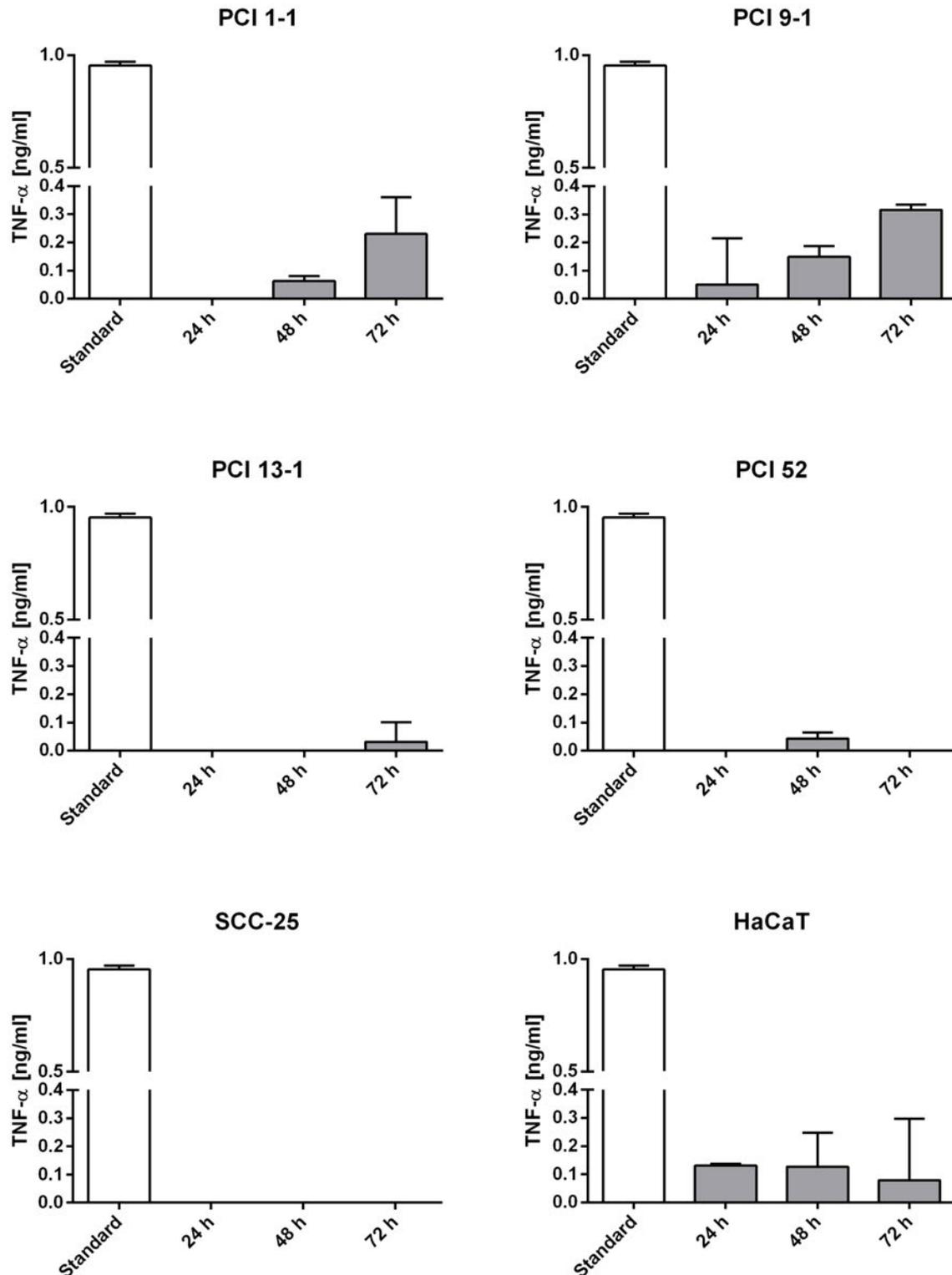


Abb. 14: TNF- α -Freisetzung. Zum Nachweis der basalen TNF- α -Sekretion wurden die Zellen für 24, 48 bzw. 72 Stunden inkubiert und die Probenüberstände mittels sELISA analysiert. Die Sekretion von TNF- α konnte in PCI 1-1, PCI 9-1, PCI 13-1, PCI 52 und HaCaT nachgewiesen werden. Die TNF- α -Titer lagen bei SCC-25 an der Nachweisschwelle des eingesetzten Kits, weshalb Proben mit negativen Messwerten nach Bereinigung der Extinktionswerte vom unspezifischen Hintergrund grundsätzlich nicht gesetzt wurden. Die weißen Balken demonstrieren die Kontrollen zur Validierung des Versuchs, die als Referenzstandards mit rekombinantem TNF- α [1 ng/ml] behandelt wurden. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse des Versuchs, der zweifach (mit zwei unterschiedlichen Kits) durchgeführt wurde (n = 2).

3.3 Biologische Aktivität von NF-κB-Inhibitoren

Um die Wirkung der Inhibitoren auf die Viabilität des HNSCC zu untersuchen, wurden die Zellen in Verdünnungsreihen inkubiert und die biologische Aktivität der Wirkstoffe im Zytotoxizitätsassay quantifiziert (Abb. 15).

Die konstitutive Aktivierung von NF-κB induziert durch Überexpression antiapoptotischer und proinflammatorischer Gene die Zellproliferation⁷⁸. Durch die spezifische Inhibition dieses Signaltransduktionswegs könnte diese gehemmt werden, wobei jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Wirkung der Inhibitoren auf den NF-κB-Signalweg und der Proliferation bestehen muss¹⁶⁰.

3.3.1 Proliferationshemmung durch NF-κB-pathway-Inhibition

Nach monotherapeutischer Behandlung wurden die initiale Proliferationshemmung [IC₁₀], bzw. 10 % der maximal induzierbaren biologischen Aktivität, sowie die halbmaximale Hemmkonzentration [IC₅₀] bestimmt.

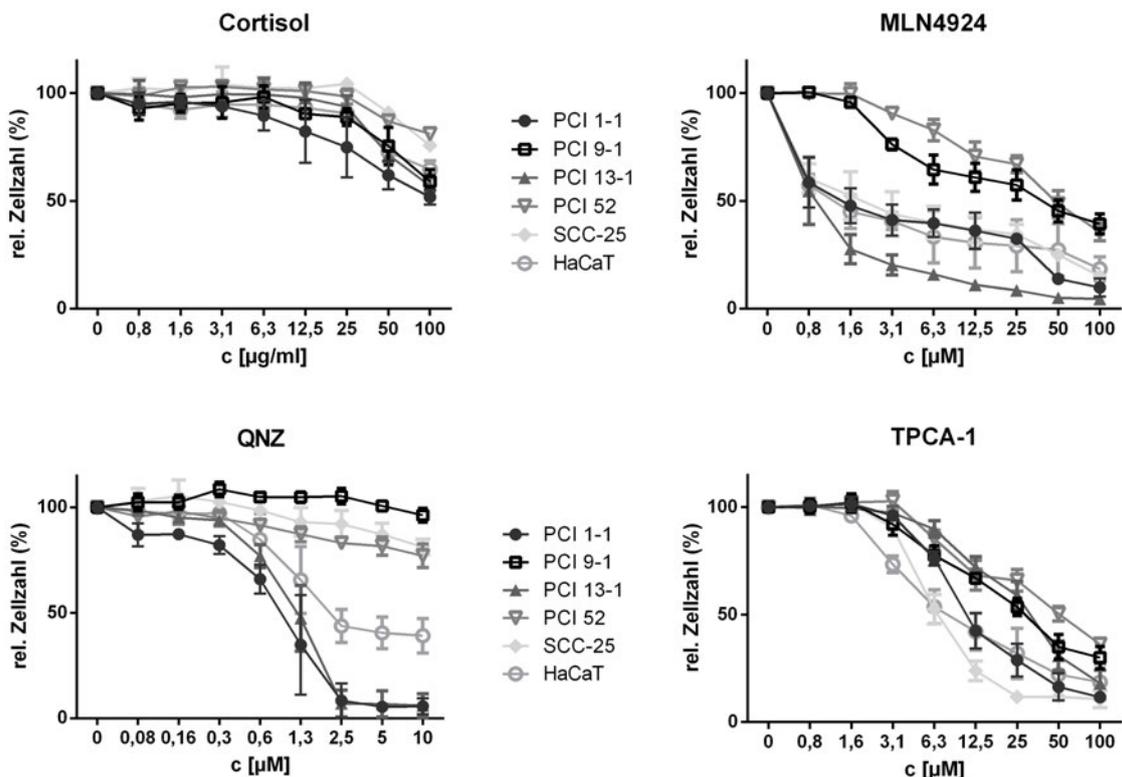


Abb. 15: Biologische Aktivität der NF-κB-pathway-Inhibitoren. Die Zellen (1×10^4 /Wellen) wurden mit Cortisol [μg/ml], MLN4924, QNZ bzw. TPCA-1 [μM] für 72 Stunden inkubiert. Die Proliferationshemmung wurde mittels verbleibender Zytotoxizitätstestassessativer Zellzahl (%) validiert, welche auf die unbehandelte Kontrolle (100 %) normiert wurde. Die Abbildungen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen der in Triplicaten durchgeführten Assays. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchsdurchführungen reproduziert (n = 3). Für die Analyse der zytotoxischen Wirksamkeit wurden IC₅₀-Werte für jeden Inhibitor und jede Zelllinie bestimmt (Tab. 13).

Insgesamt war eine heterogene Responsivität feststellbar (Abb. 15). MLN4924 reduzierte die relative Zellzahl auf 4,4 bis 39,4 % (Tab. 12). Mit IC₅₀-Werten von 0,8 bis (>) 17,4 µM war es der in dieser Studie am stärksten antiproliferativ wirkende NF-κB-Inhibitor (Tab. 13). Auffällig war, dass ab der zweiten Verdünnungsstufe Sättigungsplateaus ausgebildet wurden und weitere Dosisescalationen nur mäßige Effektsteigerungen bewirkten. Drei Zelllinien waren responsiv für QNZ. Konzentrationen um 1 µM waren suffizient, um die Halbhemmkonzentration zu erreichen. Seine hohe antiproliferative Potenz zeigte sich bei PCI 1-1 und PCI 13-1, wo durch Konzentrationen ≥ 2,5 µM maximale Effekte induziert wurden. Bei gleicher Behandlung war dagegen bei HaCaT noch die sechsfache Zellzahl vital, was möglicherweise auf eine spezifische Wirkung bei ausgewählten Zelllinien hindeuten könnte. Diese Annahme wird durch die fehlende Responsivität von PCI 9-1, PCI 52 und SCC-25 unterstrichen, bei denen QNZ im analysierten Dosierungsbereich keine Wirkung zeigte. TPCA-1 bildete sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurven und induzierte bei 25 bis 100 µM maximale antiproliferative Effekte mit Zellzahlreduktionen auf 10,6 bis 36,2 %. Die einhergehenden Halbhemmkonzentrationen lagen zwischen 5,3 und 24,2 µM. PCI 52 war mäßig responsiv und zeigte eine zu MLN4924 kongruente, linear verlaufende Zytotoxizitätskurve. Da diese Wirkstoffe keine vollständigen Regressionskurven induzierten, wurden hier approximative IC₅₀-Werte bestimmt. Cortisol besaß in allen Zelllinien die geringsten antiproliferativen Effekte. Bei Applikation der höchsten eingesetzten Konzentrationsstufe wurden relative Zellzahlreduktionen auf 51,8 bis 81,1 % induziert, weshalb keine exakten IC₅₀-Werte bestimmbar waren.

Inhibitor	PCI 1-1		PCI 9-1		PCI 13-1		PCI 52		SCC-25		HaCaT	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Cortisol	51,8	3,5	59	5,7	57	5,3	81,1	1,2	75,8	0,7	64,7	4,1
MLN4924	9,9	4,2	39,4	4,7	4,4	1,9	35,6	4,1	15,1	2,6	18,5	5,5
QNZ	5,7	3,9	96,3	3,2	6	5,7	77	5,6	81,2	3,6	39,1	8,2
TPCA-1	11,5	2,3	29,9	5,2	18	6,3	36,2	2,1	10,6	3,9	18,6	8,4

Tab. 12: Analyse der biologischen Aktivität der NF-κB-pathway-Inhibitoren. Relative Zellzahlen (%) induziert durch die höchsten Wirkstoffkonzentrationen. Die Tabelle zeigt Mittelwerte (fett gedruckt) nach Inkubation mit Cortisol [100 µg/ml], MLN4924 [100 µM], QNZ [10 µM] und TPCA-1 [100 µM] für 72 Stunden. Diese Werte entsprechen den in Abbildung 15 dargestellten Daten der höchsten applizierten Konzentrationsstufe. Diese Angaben beruhen auf den Mittelwerten und Standardabweichungen von drei, unabhängige voneinander durchgeführten Versuchsdurchführungen (n = 3).

Zelllinie	Cortisol [μM]			MLN4924 [μM]			QNZ [μM]			TPCA-1 [μM]		
	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀
PCI 1 1	20*	> 280**	280	0,2	1	66,7	0,05	1	3,8	4,6	9,7	66,7
PCI 9 1	140*	> 280**	280	3,1*	> 4,8*	100	1†	> 10**	10	3,3	13,8	50
PCI 13 1	140*	> 280**	280	0,2	0,8	41,7	0,4	1,2	2,5	5,2	24,2	100
PCI 52	140*	> 280**	280	7,3*	> 17,4*	100	1†	> 10**	10	6,3*	> 17*	100
SCC 25	140*	> 280**	280	0,2	1,4	100	10*	> 10**	10	3,5	6,1	41,7
HaCaT	140*	> 280**	280	0,2	0,8	100	0,4	1,1	2,5	2	5,3	66,7

Tab. 13: Zelllinienspezifische inhibitorische Konzentrationen der NF- κ B-Inhibitoren. Die Zelllinien ($1 \times 10^4/\text{Well}$) wurden für 72 Stunden mit Cortisol, MLN4924, QNZ und TPCA-1 stimuliert. Die Konzentrationsangaben von Cortisol wurden von $\mu\text{g}/\text{ml}$ in μM umgerechnet. Alle Werte wurden individuell für jeden Wirkstoff und jede Zelllinie erhoben. Zur Bestimmung der Mittelwerte wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt ($n = 3$). Zelllinien, für die aufgrund mangelnder Responsivität keine IC₁₀- oder IC₅₀-Werte ermittelt werden konnten, wurden mit * gekennzeichnet. IC₅₀-Werte von Inhibitoren, die keine oder nur geringe Wirkung zeigten, wurden mit ** markiert. In diesen Fällen wurde die maximale applizierte Konzentration (IC₁₀₀) angegeben. Bei PCI 9-1 und PCI 52 konnten für QNZ keine IC₁₀-Werte bestimmt werden, weshalb sie mit † gekennzeichnet und 1 μM als IC₁₀ definiert wurde.

3.4 Suppression der Inflammation durch zielgerichtete Inhibition des NF- κ B pathways von HNSCC-Zellen

Zur Analyse des antiinflammatorischen Potenzials der NF- κ B-Inhibitoren wurden die Zellen für 48 Stunden [IC₁₀], in oder ohne Kombination mit TNF- α [5 ng/ml], inkubiert und IL-8 quantifiziert (Kap. 2.2.3.1). Dieses gilt als etablierter Biomarker der Inflammation und NF- κ B-Aktivität, weshalb es in diesem Kontext als Surrogatmarker zur Analyse der zielgerichteten NF- κ B-pathway-Inhibition genutzt wurde^{154,161}. Die eingesetzte TNF- α -Konzentration wurde aufgrund von Voruntersuchungen gewählt, die zeigten, dass diese ausreichend ist, um die IL-8-Produktion zu stimulieren, ohne dabei den NF- κ B-Signalweg überzustimulieren und somit die Wirksamkeit der zu untersuchenden Inhibitoren zu beeinträchtigen.

3.4.1 Wirkstoffspezifische Senkung der IL-8-Sekretion

TPCA-1 war der stärkste antiinflammatorisch wirkende Inhibitor (Abb. 16). In fünf Zelllinien konnte TPCA-1 den basalen IL-8-Titer senken. Die Kombination mit TNF- α verstärkte diesen Effekt und reduzierte die Inflammation im gesamten Zellpanel signifikant. Dagegen hatte Cortisol keine signifikante Wirkung auf die basale oder TNF- α -induzierte IL-8-Sekretion. Demgegenüber induzierten MLN4924 und QNZ die Inflammation. MLN4924 ließ IL-8 im gesamten Panel massiv ansteigen, in drei Zelllinien vor allem bei Kombination mit TNF- α .

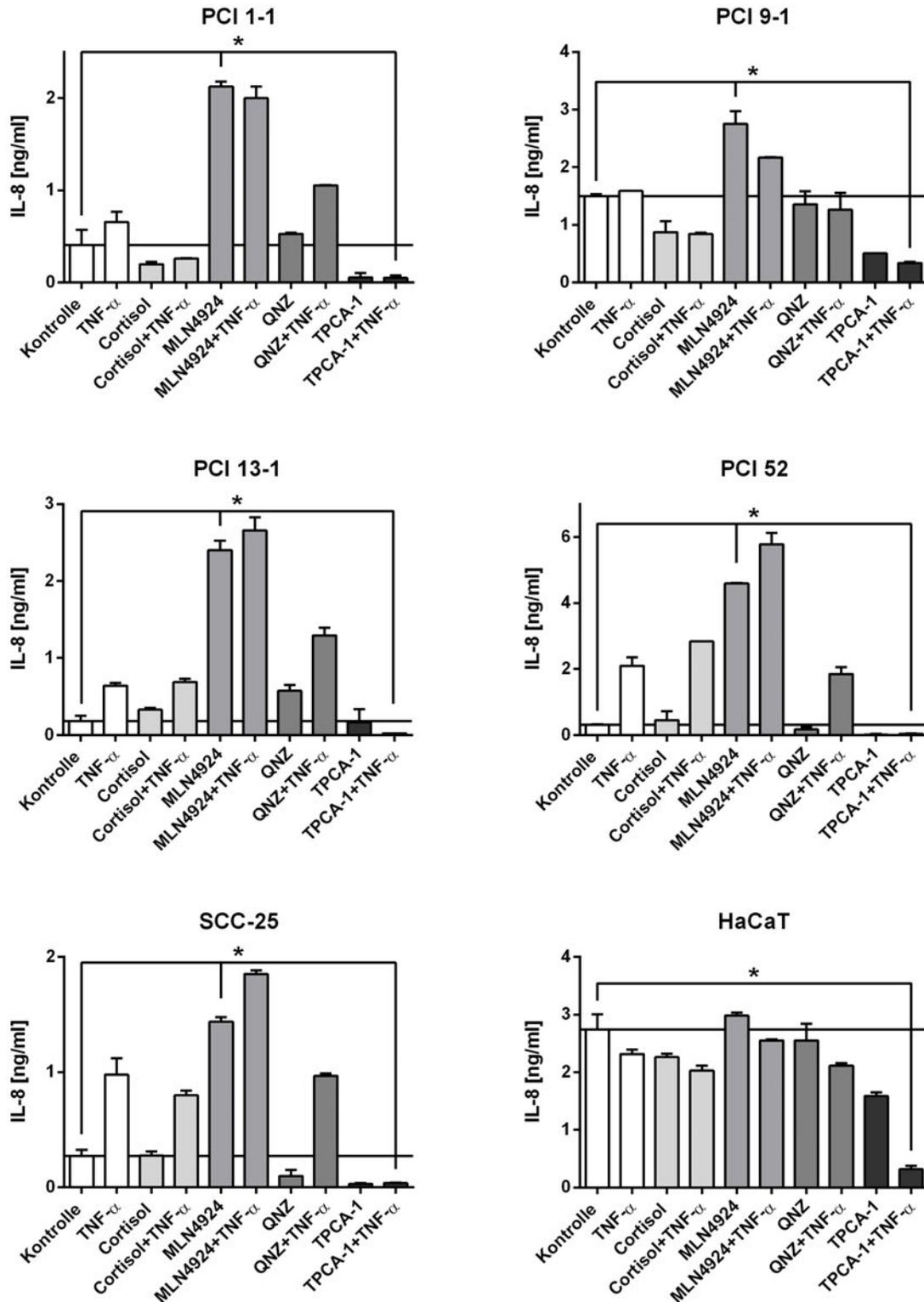


Abb. 16: IL-8-Titer nach NF- κ B-pathway-Inhibition im HNSCC. Die Zeilen (2×10^4 /Wellen) wurden mit Cortisol, MLN4924, QNZ bzw. TPCA-1 [IC_{10}] - mit oder ohne Kombination mit TNF- α [5 ng/ml] - inkubiert. Diese wurden für 6 Stunden mit der jeweiligen spezifischen IC_{10} -Konzentration des Inhibitors (Tab. 13) vorinkubiert und anschließend für weitere 48 Stunden - mit oder ohne TNF- α - behandelt. Das freigesetzte IL-8 [ng/ml] wurde mittels sELISA (Kap. 2.2.3) quantifiziert. Zur statistischen Analyse wurde der nichtparametrische, gepaarte Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Signifikante Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden mit * gekennzeichnet. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse dieser dreifach reproduzierten Experimente (n = 3).

Dabei induzierte MLN4924 signifikante Anstiege der IL-8-Titer, die verglichen zur Basalsekretion bis 15-fach verstärkt waren. QNZ demonstrierte ein analoges Verhalten der HNSCC-Zellen und induzierte eine mehrheitlich signifikante Progression, vor allem der durch TNF- α induzierten IL-8-Freisetzung.

HaCaT diente als Referenzstandard. Da diese nichtmalignen Keratinozyten phänotypisch den *in vitro* Zellen des HNSCC im Sinne des oralen Plattenepithels entsprechen und ihre Immortalisierung u. a. durch die Deregulation des NF- κ B pathways bedingt ist, eignen sie sich zur Validierung der zielgerichteten NF- κ B-Inhibition im HNSCC¹⁵⁸. Die Wirkungen der NF- κ B-Inhibitoren auf diese Zelllinie waren nahezu vernachlässigbar. TPCA-1 erwies sich als wirkungsvollster NF- κ B-Inhibitor dieser Zelllinie, der eine Reduktion der basalen IL-8-Level induzierte, die bei kombinatorischer Inkubation mit TNF- α als signifikant imponierte.

3.4.2 Antiinflammatorische Effekte

Zur Analyse, ob die zuvor beschriebenen Ergebnisse auf eine veränderte Zellproliferation zurückzuführen waren, wurden zusätzlich Zytotoxizitätsassays dieser Proben durchgeführt (Kap. 2.2.2). Zur Standardisierung wurde die relative Zytokinkonzentration mit der relativen Zellzahl in Bezug gesetzt (Kap. 2.2.6.2). Nach Korrelation dieser Parameter zeigten sich, verglichen mit der absoluten IL-8-Sekretion (Abb. 16), fast deckungsgleich konfigurierte Balkendiagramme (Abb. 17). Dies weist auf eine proliferationsunabhängige Wirkung der untersuchten Inhibitoren hin. Die Effekte von Cortisol und TPCA-1 blieben auf einem vergleichbaren Niveau. TPCA-1 war bei Kombination mit TNF- α weiterhin der einzige Inhibitor mit signifikanter Senkung der IL-8-Titer. Nach Korrelation dieser Parameter war die Verstärkung der Effekte durch die NF- κ B-Inhibitoren auffällig, die eine Zunahme der IL-8-Titer zeigten. Die proinflammatorische Wirkung von MLN4924 und QNZ imponierte mit einer Vervielfachung von IL-8 relativ zur Zellzahl, was auf die gleichzeitig proliferationshemmende Wirkung dieser Inhibitoren zurückgeführt werden kann.

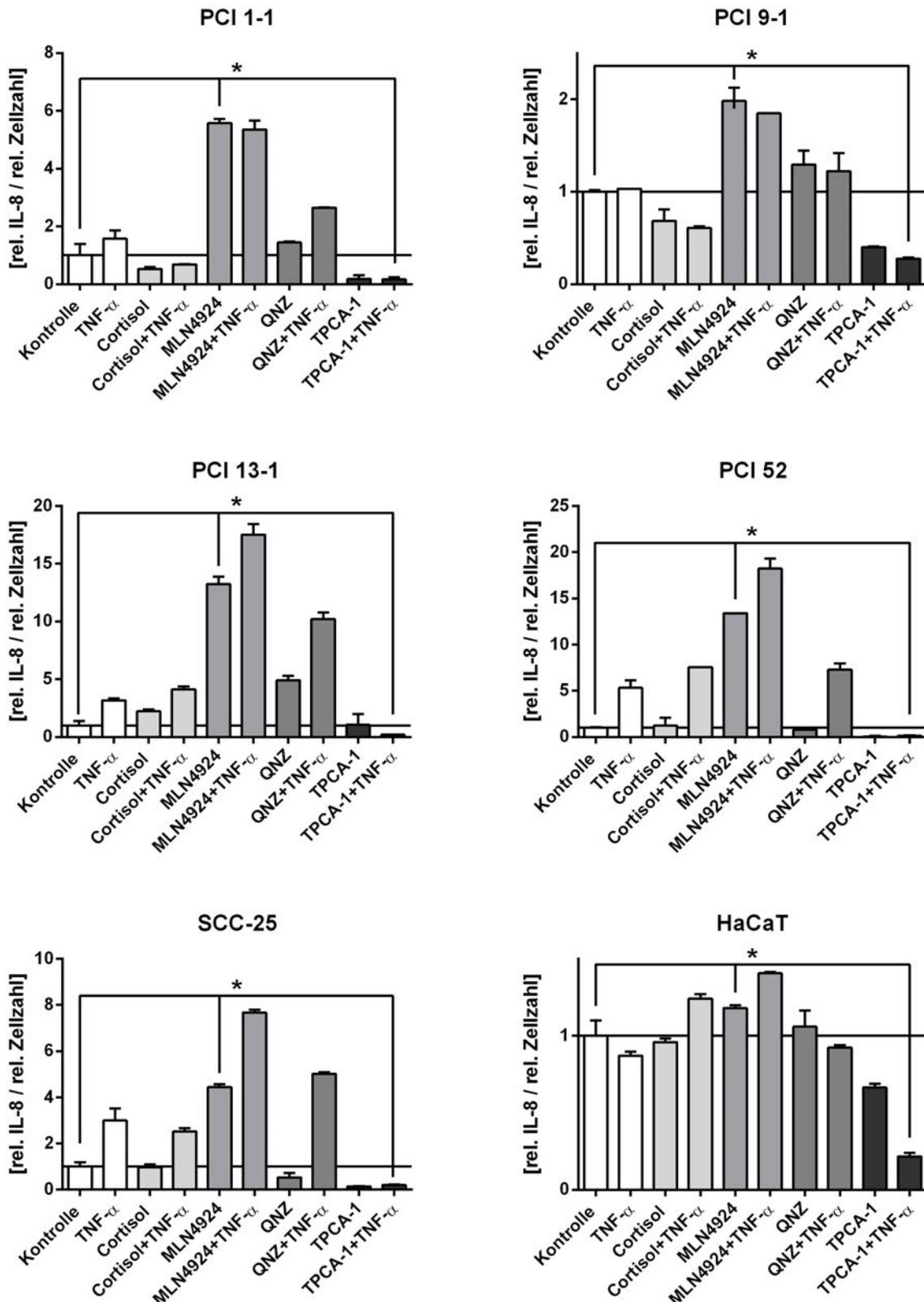


Abb. 17: Korrelation von IL-8 und Zellzahl. Die aus den Probenüberständen verdichteten IL-8-Leve wurden mit der relativen Zellzahl der entsprechenden Probe korreliert (Kap. 2.2.6.2). Zwecks statistischer Auswertung wurde der nichtparametrische, gepaarte Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Signifikante Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden mit * gekennzeichnet. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (n = 3).

3.4.3 NF- κ B-Inhibitoren hemmen die Zellproliferation

Die Bestimmung der relativen Zellzahl (%) zur Proliferationsanalyse nach Inkubation mit den NF- κ B-Inhibitoren erfolgte im Kristallviolettassay (Kap. 2.2.2.1). Den applizierten IC₁₀-Werten (Tab. 13) entsprechend, konnten grundsätzlich nur mäßige zytotoxische Effekte induziert werden (Abb. 18). Auffällig war, dass die Kombinationsbehandlung von MLN4924 [IC₁₀] mit TNF- α [5 ng/ml] bei vier Zelllinien, unter gleichzeitig massiver Induktion der IL-8-Sekretion (Abb. 16), die Zellzahl reduzierte. Die Kombination von QNZ [IC₁₀] und TNF- α [5 ng/ml] induzierte in fünf Zelllinien signifikante Zellzahlreduktionen. Interessanterweise konnte TPCA-1 [IC₁₀] kombiniert mit TNF- α [5 ng/ml], neben der signifikanten Inhibition der IL-8-Freisetzung (Abb. 16), signifikante Reduktionen der Viabilität induzieren.

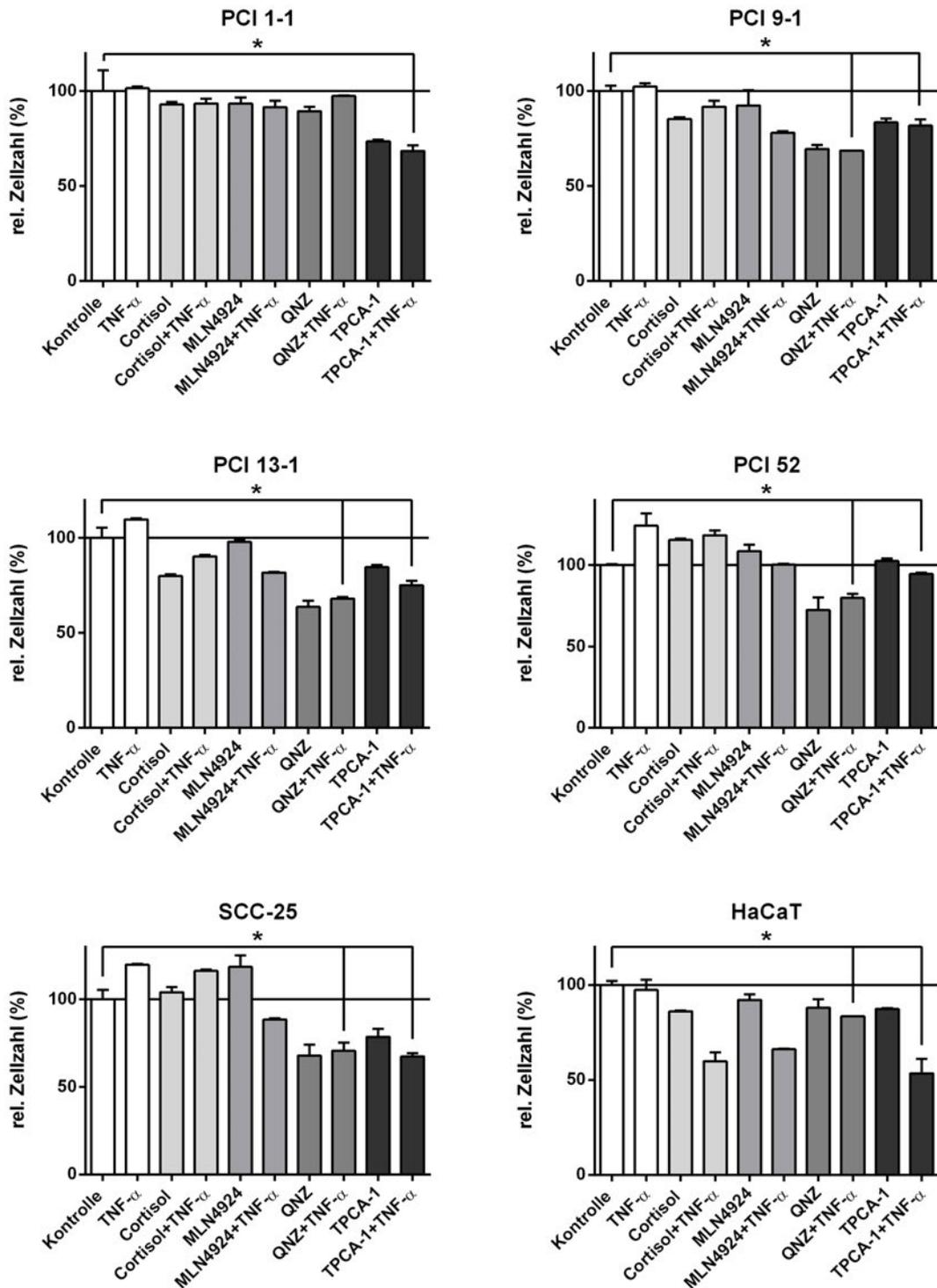


Abb. 18: Antiproliferative Effekte der Inhibitoren des NF- κ B pathways. De Ze en (2×10^4 /We) wurden mit Cortisol, MLN4924, QNZ bzw. TPCA-1 [10^{-6}] für 48 Stunden inkubiert. Um die Wirkstoffe bei induzierter Inflammation (bzw. IL-8-Sekretion) verhindern zu können, wurden die Proben für 6 Stunden mit den Inhibitoren vorstimuliert und anschließend mit TNF- α [5 ng/ml] kombiniert stimuliert. Die Analyse der Zellviabilität erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Die relative Zellzahl (%) wurde auf die unbehandelte Kontrolle (100 %) normiert. Zur statistischen Auswertung wurde der nichtparametrische, gepaarte Wilcoxon-Rangsummentest angewendet. Signifikante Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden mit * gekennzeichnet. Darstellung repräsentativer Ergebnisse (n = 3).

3.4.3.1 TPCA-1 sensitiviert das HNSCC für den TNF- α -induzierten Zelltod

Die kombinierte Inkubation mit TNF- α [5 ng/ml] und TPCA-1 [IC₁₀ (Tab. 13)] führte wie oben demonstriert zur signifikanten Reduktion der IL-8-Titer (Abb. 16 & 17). Prinzipiell kann TNF- α den klassischen NF- κ B pathway aktivieren und damit die Expression diverser apoptotischer und inflammatorischer Gene induzieren (Kap. 1.3). Die NF- κ B-Inhibition kann neben einer veränderten Homöostase von pro- und antiapoptotischen Genen den Entzündungsfaktor TNF- α induzieren, der als Todesligand die extrinsische Apoptose auslösen kann^{162,163,164}. Das klassische Experiment besteht aus der Inkubation von HaCaT mit dem Antibiotikum Cycloheximid (CHX)¹⁶⁵. CHX hemmt die *de novo* Proteinsynthese an Ribosomen, was beispielsweise zur Inhibition des antiapoptotischen Proteins c-FLIP führt, wodurch Tumorzellen für die TNF- α -induzierte Apoptose sensitiviert werden können¹⁶⁶. Eine vergleichbare Wirkung könnte mit NF- κ B-Inhibitoren erzielt werden. MLN4924 sensitiviert Monozyten und dendritische Zellen für die TNF- α -abhängige und -unabhängige Nekroptose¹⁶⁷. Zur Validierung, ob die Kombination von TNF- α und TPCA-1 die relative Zellzahl im vorliegenden Zellpanel reduzieren kann, wurden die Zellen mit den spezifischen IC₁₀-Konzentrationen von TPCA-1 (Tab. 13) und TNF- α [100 ng/ml] für 72 Stunden inkubiert (Abb. 19). Dabei zeigten die Zellen ein weitestgehend resistentes Verhalten gegenüber TNF- α in der Monotherapie. TPCA-1 konnte die relative Zellzahl (%) in allen Zelllinien reduzieren, die Zellen für TNF- α signifikant sensitiveren und blockierte damit neben der IL-8-Sekretion über den klassischen NF- κ B-Signalweg, auch die Induktion des TNF- α -abhängigen Zelltods.

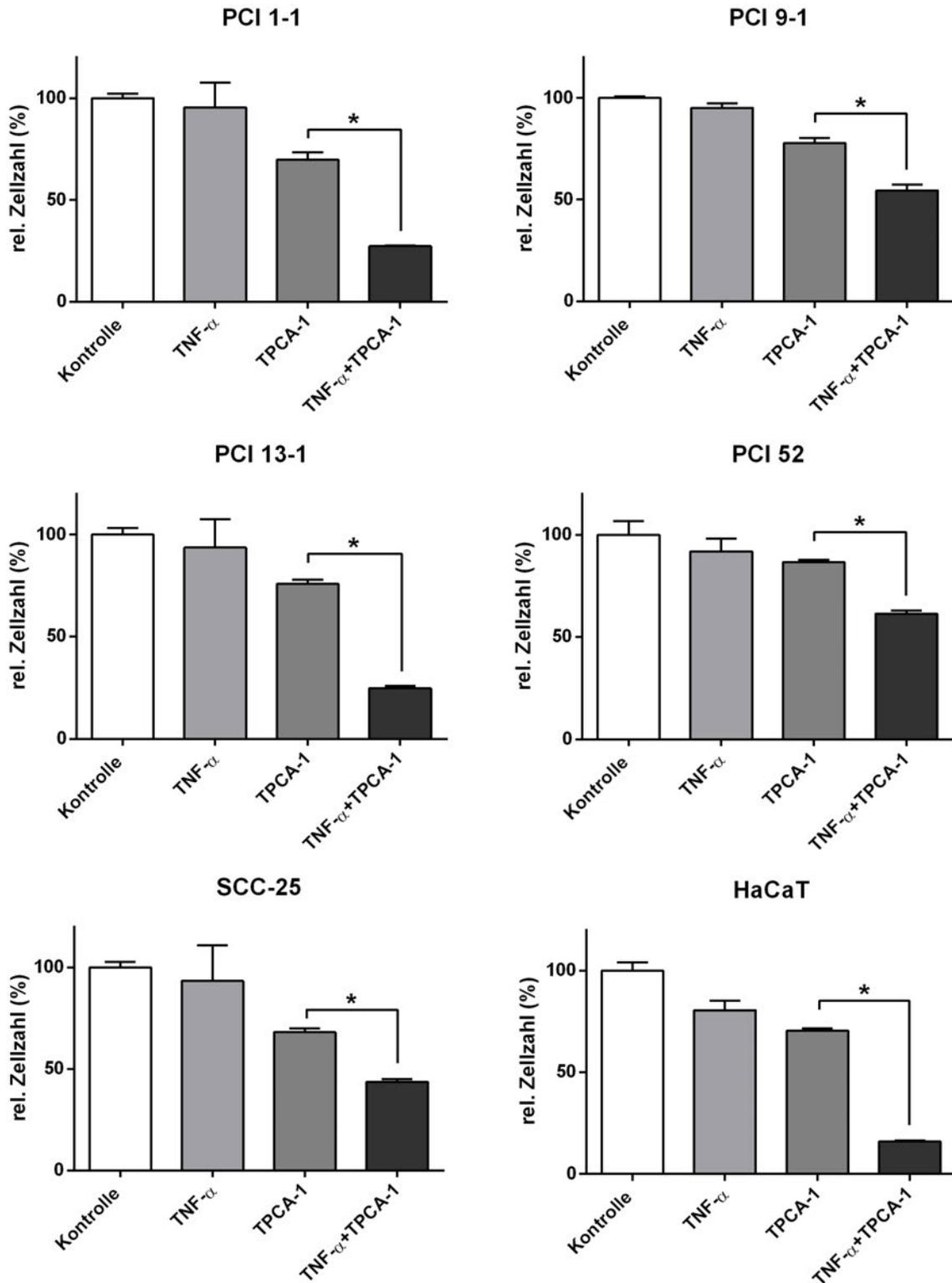


Abb. 19: TPCA-1-vermittelte Sensitivierung des HNSCC für den TNF- α -induzierten Zelltod. Zur Validierung, ob TPCA-1 in der Kombinationsonbehandlung mit TNF- α das HNSCC für den Zelltod sensitiviert, wurden die Zellen (1×10^4 /Wellen) mit TNF- α [100 ng/ml] und der zellspezifischen IC₁₀-Dosis von TPCA-1 für 72 Stunden inkubiert. Die Viabilität wurde im Kruskal-Wallis-Test quantifiziert. Die Ergebnisse wurden mit dem nichtparametrischen, gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, um statistisch signifikante Effekte zu zeigen. Diese wurden mit * markiert. In der Abbildung handelt es sich um die Darstellung repräsentativer Ergebnisse ($n = 3$).

3.5 Analyse der Zelltodinduktion in der Kombinationstherapie mit NF- κ B-pathway-Inhibitoren

Aufgrund der NF- κ B-bedingten Proliferation und Resistenz wurde validiert, ob die HNSCC-Zellen durch Inhibitoren des NF- κ B pathways für die FasL-induzierte, extrinsische Apoptose sensitiviert werden können. Bekannt ist, dass HNSCC-Zellen trotz Fas-Rezeptor-Ausstattung resistent gegen extrinsische Todessignale sind, was u. a. auf überexprimierte Inhibitoren der Apoptose zurückzuführen ist^{168,169}. Eigene Studien konnten bereits proapoptotische Sensitivierungseffekte für FasL der zu untersuchenden Zelllinien aufzeigen^{170,171,172,173}.

3.5.1 Heterogene Sensitivierbarkeit für die FasL-induzierte Apoptose

Die Zellen wurden mit den NF- κ B-Inhibitoren [IC_{10} (Tab. 13)] und FasL koinkubiert (Kap. 2.2.2). Die FasL-Monotherapie zeigte insgesamt eine heterogene Responsivität (Abb. 20 bis Abb. 23). Drei Zelllinien waren FasL-suszeptibel und demonstrierten distinkte zytotoxische Effekte (*PCI 1-1*, *PCI 13-1* und *HaCaT*). Demgegenüber verhielten sich *PCI 9-1*, *PCI 52* und *SCC-25* resistent. Analog zu den Monotherapien (Kap. 3.3.1) zeigten die Kombinationstherapien spenderabhängige Zytotoxizitätsmuster (Abb. 20 bis Abb. 23). Mehrheitlich konnten keine Sensitivierungseffekte induziert werden (Tab. 14). Als Ausnahme wurde die Referenzzelllinie *HaCaT* erfolgreich sensitiviert. Durch Applikation von vergleichsweise geringen Wirkstoffkonzentrationen [0,2 bis 2 μ M] konnten signifikante ($p < 0,05$) bis höchstsignifikante ($p < 0,001$) Effekte induziert werden. MLN4924 war aufgrund synergistischer Effekte ($\gamma < 1$) mit etwa vierfacher Maximierung der Wirkung von FasL der potenteste NF- κ B-Inhibitor. QNZ und TPCA-1 erzielten ähnliche Ergebnisse (Tab. 14). Synergistische Effekte konnten zudem durch QNZ bei *PCI 13-1* und durch MLN4924 bei *SCC-25* beobachtet werden. Cortisol induzierte antagonistische Effekte ($\gamma > 1$). Bei den FasL responsiven Zelllinien *PCI 1-1* und *PCI 13-1* bewirkte Cortisol eine signifikante Antagonisierung der FasL-Wirkung. Die Zelllinie *PCI 13-1* entwickelte unter Cortisol eine Resistenz gegenüber FasL. Die FasL-resistenten Zelllinien (*PCI 9-1* und *PCI 52*) konnten von keinem der vier Inhibitoren sensitiviert werden. Bemerkenswerterweise wurde die resistente Zelllinie *SCC-25* durch MLN4924 mit einem superadditiven Synergismus ($\gamma < 1$) höchstsignifikant ($p < 0,001$) sensitiviert.

III. Ergebnisse

Zelllinie	IC ₅₀ [ng/m]	Sensitivierung (FasL _{mono} /FasL _{kombi})	Interaktionsindex γ (nach Tallarida)	p-Wert (t-Test)
PCI 1-1				
FasL	37,3	-	-	-
Cort so [IC ₁₀] + FasL	> 88,8 [‡]	0,4-fach [‡]	2,4 ^{***}	0,00006 ^{***}
MLN4924 [IC ₁₀] + FasL	33,6	1,1-fach	1,1 ^{***}	0,32
QNZ [IC ₁₀] + FasL	44,3 [‡]	0,8-fach [‡]	1,2 ^{***}	0,08
TPCA-1 [IC ₁₀] + FasL	41,9 [‡]	0,9-fach [‡]	1,6 ^{***}	0,13
PCI 9-1				
FasL	-†	-	-	-
Cort so [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,5 ^{***}	0,072
MLN4924 [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,7 ^{***}	0,12
QNZ [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,1 ^{***}	0,12
TPCA-1 [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,2 ^{***}	0,074
PCI 13-1				
FasL	55,5	-	-	-
Cort so [IC ₁₀] + FasL	> 200 [‡]	0,3-fach [‡]	4,1 ^{***}	0,00031 ^{***}
MLN4924 [IC ₁₀] + FasL	> 71,9 [‡]	0,8-fach [‡]	1,6 ^{***}	0,0039 ^{**}
QNZ [IC₁₀] + FasL	24,4	2,3-fach	0,8[*]	0,11
TPCA-1 [IC ₁₀] + FasL	> 55,1 [‡]	1-fach	1,2 ^{***}	0,0014 ^{**}
PCI 52				
FasL	-†	-	-	-
Cort so [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,5 ^{***}	0,015 [*]
MLN4924 [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,4 ^{***}	0,027 [*]
QNZ [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,1 ^{***}	0,23
TPCA-1 [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,4 ^{***}	0,13
SCC-25				
FasL	-†	-	-	-
Cort so [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,5 ^{***}	0,00075 ^{***}
MLN4924 [IC₁₀] + FasL	39,7	5-fach	0,3[*]	0,0031^{**}
QNZ [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	2 ^{***}	0,0017 ^{**}
TPCA-1 [IC ₁₀] + FasL	> 200 [†]	1-fach	1,6 ^{***}	0,00045 ^{***}
HaCaT				
FasL	> 68,7 [‡]	-	-	-
Cort so [IC ₁₀] + FasL	> 59,1	1,2-fach	1,4 ^{***}	0,3
MLN4924 [IC₁₀] + FasL	17,6	3,9-fach	0,5[*]	0,004^{**}
QNZ [IC₁₀] + FasL	28,7	2,4-fach	0,8[*]	0,014[*]
TPCA-1 [IC₁₀] + FasL	27,5	2,5-fach	0,8[*]	0,00077^{***}

Tab. 14: Analyse apoptotischer Sensitivierungseffekte durch NF-κB-Inhibitoren. Die IC₅₀-Werte der FasL-Mono- bzw. Kombinationstherapien mit Angabe der Wirksamkeitssmaximierungen nach konstanter, kombinatorischer Inkubation mit Cortisol, MLN4924, QNZ bzw. TPCA-1 [IC₁₀]. Der Interaktionsindex γ nach Tallarida (Kap. 2.2.6.7) zur Bestimmung synergistischer Therapieeffekte: • = superadditiv, ** = additiv, *** = antagonistisch. Proben, bei denen Sensitivierungseffekte erzielt werden konnten, wurden fett gedruckt hervorgehoben. Zeilen, für die keine IC₅₀-Werte bestimmt werden konnten, sowie Zeilen, die nach Kombinationstherapie therapieresistent waren, wurden mit † markiert. Hier erfolgte die Berechnung von γ folgendermaßen: Für γ [IC₅₀ von B (FasL) in Kombination mit A (Inhibitor)] sowie γ [IC₅₀ von B (FasL) in der Monotherapie] wurden 200 ng/m FasL als IC₅₀-Wert angenommen. Des Weiteren wurden Proben, in denen FasL keine vollständigen Sättigungskurven zur IC₅₀-Bestimmung induzieren konnte, mit ‡ markiert. Proben, bei denen die zusätzliche Applikation der NF-κB-Inhibitoren zu einer Verminderung der FasL-Wirkung führte, wurden mit † gekennzeichnet. Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test genutzt. Hierfür wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplicaten durchgeführt, berechnet. Angabe von repräsentativen p-Werten der jeweiligen log₂-Verdünnungsstufe, die an der berechneten IC₅₀-Dosis der Kombinationstherapie lagen. Signifikante p-Werte < 0,05 wurden mit *, hochsignifikante p-Werte < 0,01 wurden mit ** und höchstsignifikante p-Werte < 0,001 wurden mit *** gekennzeichnet.

III. Ergebnisse

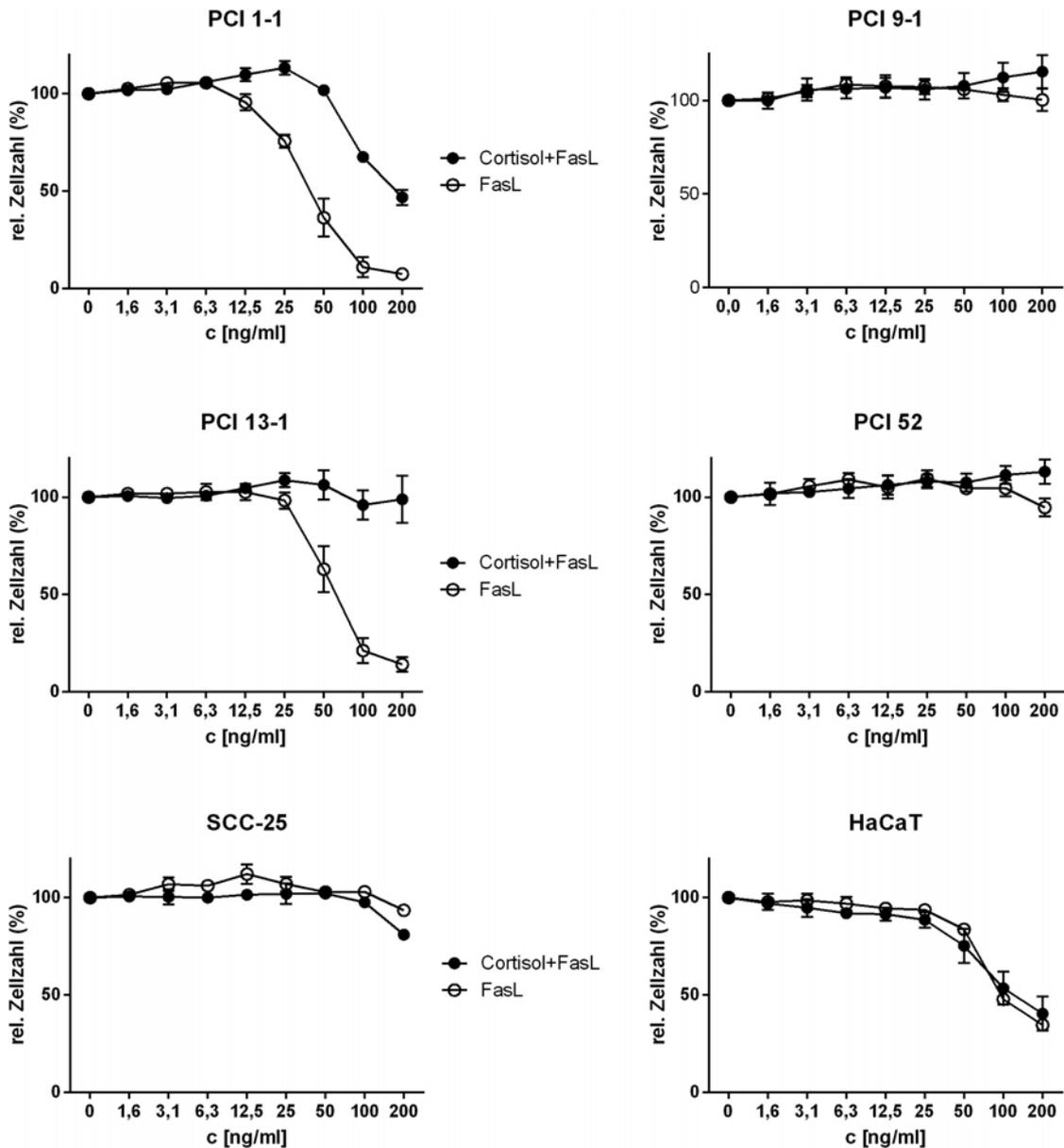


Abb. 20: Cortisol antagonisierte die Wirkung von FasL. Das Zellpane wurde mit FasL [ng/ml] in den angegebenen Konzentrationsstufen bzw. kombiniert mit Cortisol [konstant IC_{10}] behandelt. Die Zellviabilität wurde nach 72-stündiger Inkubation mittels kräftiger Zytotoxizitätstests als relative Zellzahl (%), in Bezug zur auf 100 % normierten Kontrolle, validiert. Bei drei Zelllinien zeigten sich dosisabhängige Effekte in der Monotherapie mit FasL. Cortisol konnte keine Zellen für FasL sensitiveren. Es kam bei zwei Zellen (*PCI 1-1* und *PCI 13-1*) unter Cortisol-Behandlung zu höchst signifikanten Rechtsverschiebungen ($p = 0,00006$ bzw. $0,00031$) der Zytotoxizitätskurven. Die Abbildungen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen der in Triplicaten durchgeführten Verdünnungsreihen. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchläufen reproduziert ($n = 3$). Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test.

III. Ergebnisse

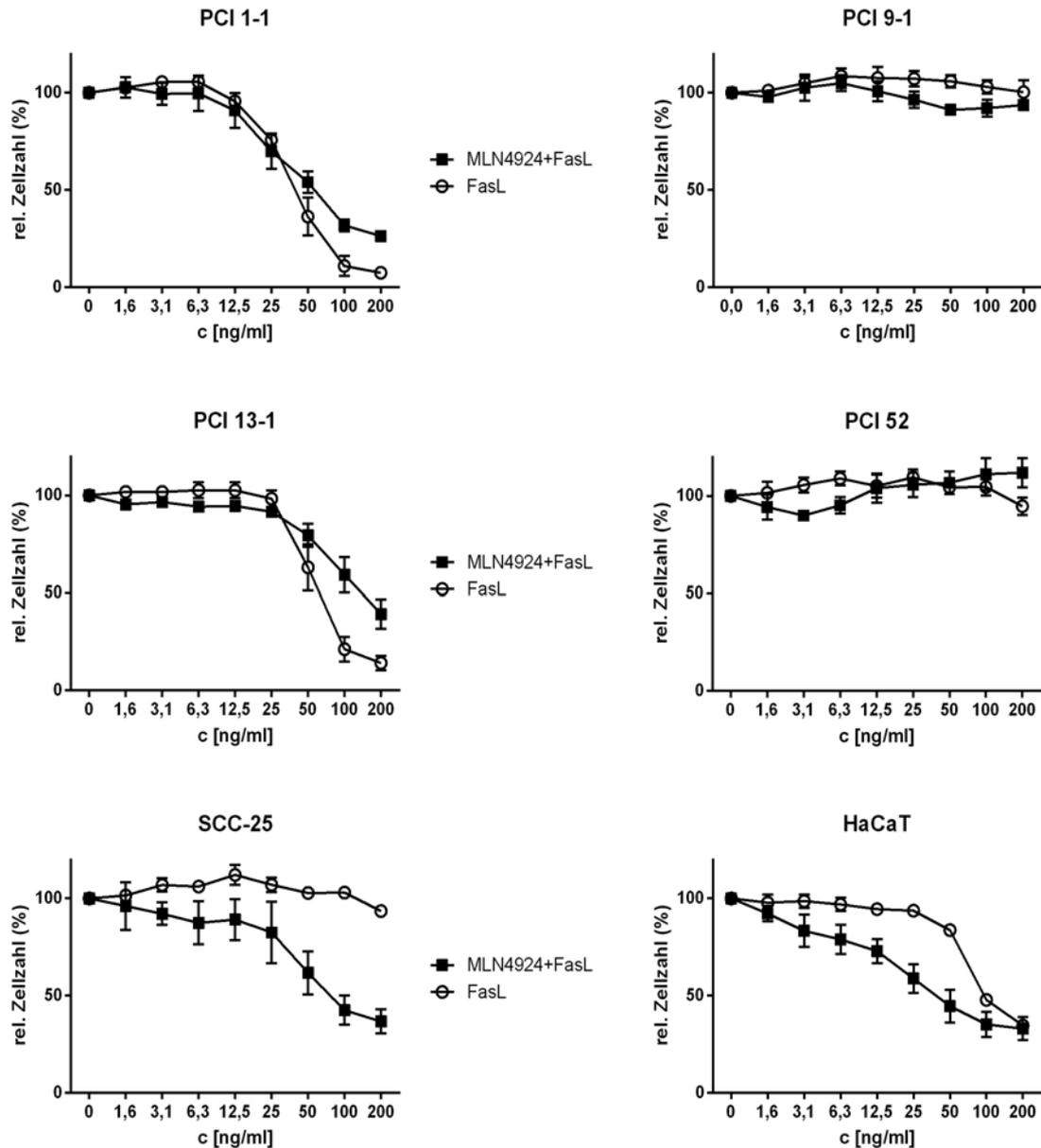


Abb. 21: MLN4924 sensitivierte die resistente Zelllinie SCC-25 hochsignifikant für FasL. Das Zellpane wurde mit FasL [ng/ml] in den angegebenen Konzentrationsstufen inkubiert. Um die Sensitivierung des HNSCC für FasL analysieren zu können, wurden die Zellen mit MLN4924 [konstant IC_{10}] als Kombinationstherapie behandelt. Die Zellviabilität wurde nach 72-stündiger Inkubation mittels kristalloptischen Zytotoxizitätstests an seriell verdünnten Zellen (%), in Bezug zur auf 100 % normierten Kontrolle, validiert. Bei drei Zelllinien (PCI 1-1, PCI 13-1 und HaCaT) zeigten sich dosisabhängige Effekte in der Monotherapie mit FasL. MLN4924 konnte zwei Zelllinien (SCC-25 und HaCaT) hochsignifikant ($p = 0,0031$ bzw. $0,004$) für FasL sensitivieren. Bemerkenswerterweise gelang die Sensitivierung der FasL-resistenten Zelllinie SCC-25. Die Abbildungen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen der in Triplicaten durchgeführten Verdünnungsreihen. Die Ergebnisse wurden in jeweils dreivoneinander unabhängigen Versuchsdurchführungen reproduziert ($n = 3$). Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test.

III. Ergebnisse

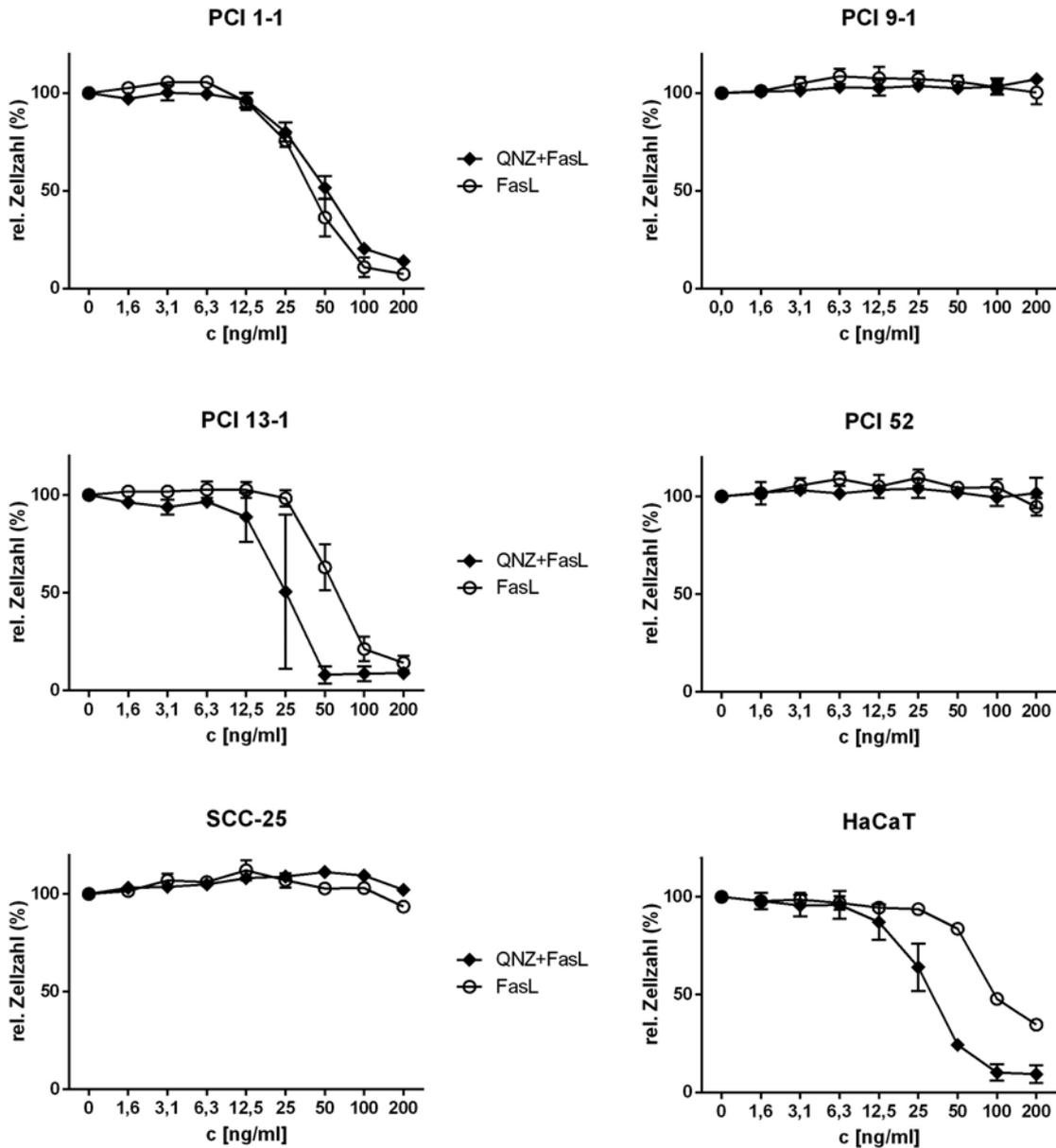


Abb. 22: QNZ induzierte in zwei Zelllinien synergistische Effekte mit FasL. Das Ze pane wurde mit FasL [ng/ml] in den angegebenen Konzentrationsstufen inkubiert. Um die Sensitivierung des HNSCC für FasL zu analysieren, wurden die Zellen mit QNZ [konstant IC_{10}] als Kombinationstherapie behandelt. Die Zytotoxizität wurde nach 72-stündiger Inkubation mittels kristalvioletter Zytotoxizitätstests als relative Zellzahl (%), in Bezug zur auf 100 % normierten Kontrolle, validiert. Bei den Zelllinien zeigten sich dosisabhängige Effekte in der Monotherapie mit FasL. QNZ konnte zwei Zelllinien (*PCI 13-1* und *HaCaT*) mit synergistischen Therapieeffekten ($\gamma = 0,8$) für FasL sensitivieren. Bei den weiteren Proben (*PCI 1-1*, *PCI 9-1*, *PCI 52* und *SCC-25*) waren keine sensitivierenden Effekte dieser Kombinationstherapie nachweisbar. Die Abbildungen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplicaten durchgeführten Verdünnungsreihen. Die Ergebnisse wurden in jeweils dreivoneinander unabhängigen Versuchsdurchläufen reproduziert ($n = 3$). Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test.

III. Ergebnisse

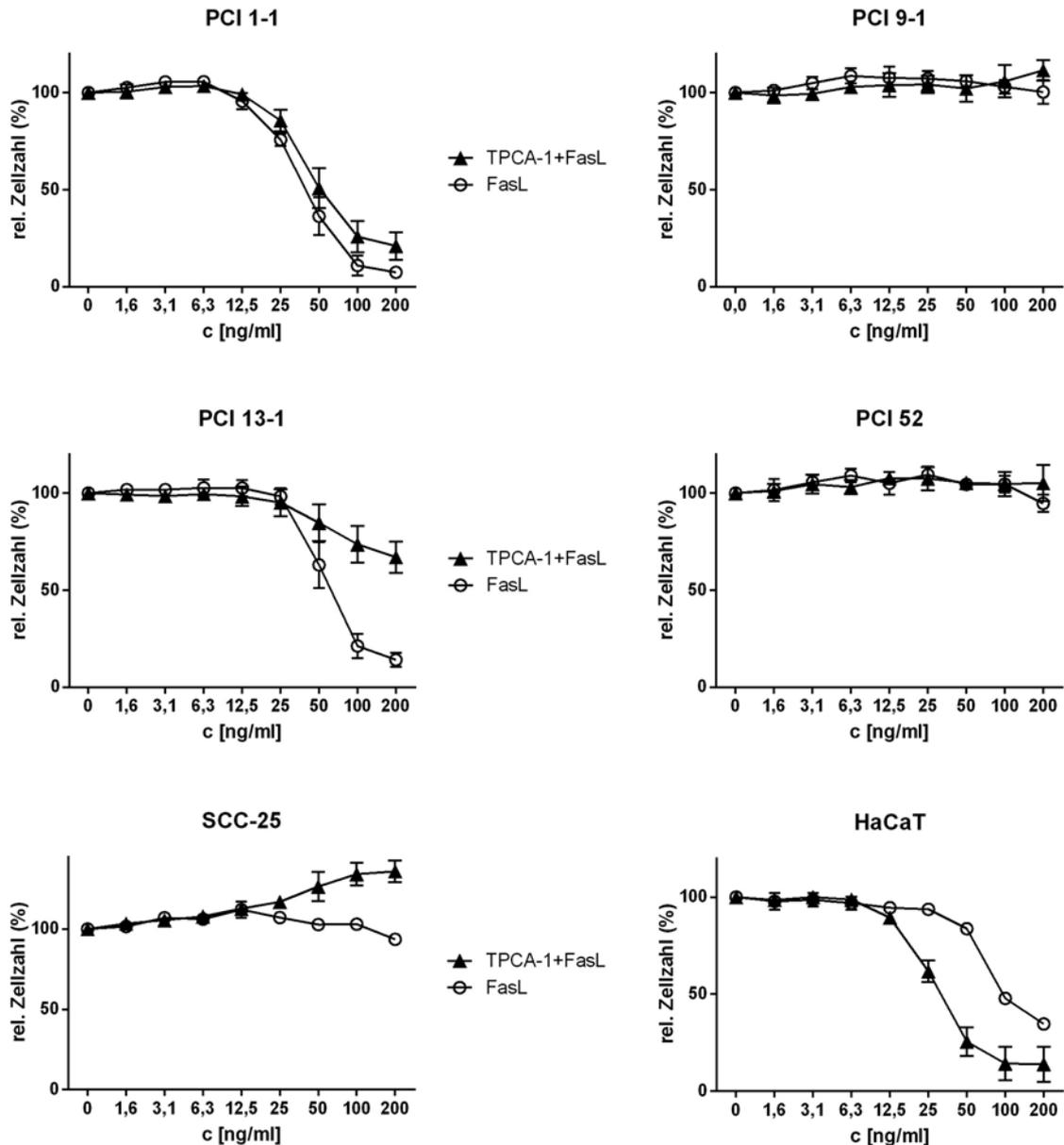


Abb. 23: TPCA-1 sensitivierte HaCaT höchstsignifikant für FasL. Das Ze pane wurde mit FasL [ng/ml] in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Um die Sensitivierung des HNSCC für FasL zu analysieren, wurden die Zellen mit TPCA-1 [konstant IC_{10}] als Kombinationstherapie behandelt. Die Zellvitalität wurde nach 72-stündiger Inkubation mittels kristalloxydometrischen Zytotoxizitätstests als relative Zellzahl (%), in Bezug zur auf 100 % normierten Kontrolle, validiert. Bei drei Zelllinien zeigten sich dosisabhängige Effekte in der Monotherapie mit FasL. TPCA-1 konnte eine Zelle (HaCaT) höchstsignifikant ($p = 0,00077$) für FasL sensitivieren. Die Abbildungen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen der in Triplicaten durchgeführten Verdünnungsreihen. Die Ergebnisse wurden in jeweils dreivoneinander unabhängigen Versuchsdurchläufen reproduziert ($n = 3$). Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test.

3.7 Genexpressionsanalyse NF- κ B-abhängiger Zielgene

Manche der NF- κ B-Inhibitoren induzierten IL-8-senkende Effekte, andere wirkten proinflammatorisch (Kap. 3.4). Außerdem zeigten sich anti- und proliferative Effekte (Kap. 3.5.1). Um dieses heterogene Verhalten zu validieren, wurde die Expression ausgewählter pro- und antiapoptotischer sowie proinflammatorischer Gene analysiert, die klassischerweise über den NF- κ B-Signalweg reguliert werden. Das Expressionsniveau des zu untersuchenden Genpanels wurde nach Inhibitor-Inkubation [IC_{100} (Tab. 13)] als RT-qPCR analysiert (Kap. 2.2.4). Dieses wurde auf β -Actin normiert und zur Kontrolle als relatives Expressionslevel validiert. Dabei wurden FC-Werte > 2 bzw. $< (-) 2$ als signifikant im Sinne einer differentiellen Expressionsregulation definiert. Zur Datenvisualisierung wurde eine geclusterte heatmap mit gradueller Farbcodierung erstellt (Abb. 24).

3.7.1 Heterogene Expression NF- κ B-medierter Zielgene nach targetierter pathway-Inhibition

Die Zelllinien wurden entsprechend ihrer zytotoxischen Suszeptibilität für FasL (Kap. 3.5.1) als responsiv, sensitivierbar oder resistent klassifiziert (Abb. 24). Das Expressionsprofil war nach Behandlung mit den NF- κ B-pathway-Inhibitoren von einer auffallenden Heterogenität gekennzeichnet. Viele Proben bzw. Gene zeigten ein inhomogenes Ansprechen, weshalb diese grau gekennzeichnet wurden. Es ist anzunehmen, dass diese Gene keiner spezifischen Regulation unterlagen. Bei den responsiven Zelllinien dominierte die Herabregulation der antiapoptotischen Gene. Die homogensten, clusterartigen Effekte induzierte MLN4924. Bei PCI 1-1 und PCI 13-1 induzierte es eine mittlere bis starke Herabregulation der Expression der Gene BIRC2, BIRC3 und CFLAR. Andererseits bewirkte MLN4924 die gesteigerte Expression des IL-8-Gens, was vereinbar mit der induzierten Sekretion auf Zytokinebene war (Kap. 3.4). Daneben imponierte die Hochregulation antiapoptotischer Gene in den resistenten Zelllinien. Cortisol und QNZ zeigten spenderabhängige, inhomogene Expressionsmuster. Dagegen regulierte TPCA-1 homogen das IL-8-Gen herab. Mit Ausnahme von PCI 13-1, kam es im gesamten Zellpanel zur ausgeprägten Reduktion der IL-8-Expression, was mit den IL-8-sELISAs übereinstimmte (Abb. 16 & Abb. 17), wo TPCA-1 die IL-8-Titer auf Zytokinebene signifikant senken konnte (Ausnahme: PCI 13-1).

III. Ergebnisse

Cortisol

		responsiv			sensitivierbar		resistent	
		PCI 1-1	PCI 13-1	HaCaT	SCC-25	PCI 9-1	PCI 52	
proapoptotisch	BAX	(-) 1,1/(+) 1,2	(-) 2,3/(-) 1,1	(-) 3,1/(-) 1,8	(-) 1,4/(-) 1,9	(+) 1,4/(-) 1,1	(-) 1,1/(-) 2,2	
	BCL2	(-) 1,2/(-) 4,5	(+) 2,3/(+) 1,4	(-) 1,2/(+) 2,9	(+) 1,3/(-) 1,9	(-) 1,1/(-) 20,5	(-) 1,5/(+) 1,6	
	BIRC2	(-) 1,4/(+) 1,8	(-) 1,3/(-) 1,1	(-) 3,8/(+) 1,1	(-) 1,7/(-) 2,4	(+) 1,5/(-) 2,6	(+) 1,2/(+) 9,3	
antiapoptotisch	BICR3	(+) 14,2/(+) 16,7	(+) 3,3/(+) 1,4	(-) 1,2/(+) 8,4	(+) 1,3/(-) 1,2	(+) 16,7/(+) 5,1	(+) 11,1/(+) 339,9	
	CFLAR	(+) 1,1/(+) 1,6	(-) 1,8/(+) 1,5	(-) 3,7/(+) 1,1	(-) 1,5/(-) 2,3	(+) 3,9/(+) 1,0	(+) 1,7/(+) 17,6	
	XIAP	(-) 1,2/(+) 1,6	(-) 1,2/(+) 2,2	(-) 3,7/(+) 1,4	(-) 2,3/(-) 1,1	(+) 1,6/(-) 3,2	(+) 1,9/(+) 35,5	
inflammatorisch	IL-6	(-) 1,1/(+) 1,1	(+) 1,1/(+) 3,8	(-) 9,3/(-) 14,2	(-) 1,8/(-) 1,5	(+) 1,4/(-) 1	(+) 6,1/(+) 28,9	
	IL-8	(-) 2,0/(+) 1,8	(+) 2,5/(+) 4,4	(-) 6,5/(+) 1,4	(-) 3,7/(-) 2,8	(+) 2,4/(-) 1,1	(+) 23,9/(+) 36,9	

MLN4924

		responsiv			sensitivierbar		resistent	
		PCI 1-1	PCI 13-1	HaCaT	SCC-25	PCI 9-1	PCI 52	
proapoptotisch	BAX	(-) 2,3/(-) 2,4	(-) 5,5/(-) 3,1	(+) 1,1/(+) 1,6	(+) 3,4/(+) 1,7	(+) 1,1/(+) 1,5	(+) 1,2/(+) 1,3	
	BCL2	(-) 1,1/(+) 1	(-) 2,3/(+) 1,2	(-) 1,6/(-) 9,0	(+) 10/(+) 1,7	(+) 2,5/(+) 4,5	(+) 5,3/(+) 9	
	BIRC2	(-) 8,3/(-) 2,1	(-) 5,2/(-) 5,0	(+) 1,3/(+) 2,5	(+) 1,9/(-) 1,2	(-) 1,3/(+) 1,2	(+) 1,4/(+) 1,9	
antiapoptotisch	BICR3	(-) 30,7/(-) 10,5	(-) 14,5/(-) 4,1	(-) 5,3/(-) 1,6	(-) 4,9/(-) 19,3	(-) 5,4/(-) 4,9	(-) 2,2/(-) 1,6	
	CFLAR	(-) 2,3/(+) 1	(-) 4,7/(-) 1,1	(-) 1,3/(+) 2	(+) 2,3/(-) 1,4	(+) 1,2/(+) 1,2	(-) 1,1/(+) 2,2	
	XIAP	(-) 1,6/(+) 1,9	(-) 4,3/(+) 1,6	(+) 1,3/(+) 7,4	(+) 3,4/(+) 2,6	(+) 1,3/(+) 1,8	(+) 2/(+) 9,2	
inflammatorisch	IL-6	(-) 9,3/(-) 2,5	(-) 5,1/(+) 1,3	(-) 22,4/(-) 19,7	(-) 1,2/(-) 2,8	(+) 2,7/(+) 3,0	(+) 4,8/(+) 7	
	IL-8	(+) 4,5/(+) 25,6	(+) 45,1/(+) 70,8	(+) 1,3/(+) 2,9	(+) 7,4/(-) 1,3	(+) 2,1/(+) 1,4	(+) 248,1/(+) 53,7	

QNZ

		responsiv			sensitivierbar		resistent	
		PCI 1-1	PCI 13-1	HaCaT	SCC-25	PCI 9-1	PCI 52	
proapoptotisch	BAX	(-) 1,4/(+) 1	(-) 1,8/(-) 1,4	(-) 1,1/(+) 1,4	(+) 1,9/(-) 1,2	(-) 1,3/(-) 1,1	(-) 1,2/(+) 1,5	
	BCL2	(+) 1,2/(+) 2,3	(-) 1,3/(+) 1,1	(-) 1,5/(-) 2,7	(+) 1,1/(-) 2,8	(-) 6,1/(-) 3,1	(+) 1,3/(+) 2,2	
	BIRC2	(-) 10,6/(+) 1,2	(-) 1,5/(-) 2,4	(-) 1,5/(-) 1,7	(+) 6,2/(-) 2,4	(-) 1,4/(-) 2,8	(-) 1,2/(-) 1,8	
antiapoptotisch	BICR3	(+) 1,8/(+) 3,1	(+) 1/(+) 1,4	(-) 1,1/(+) 1,5	(+) 3,2/(-) 4,5	(-) 3,4/(-) 2,1	(-) 2,5/(-) 2,2	
	CFLAR	(-) 2,3/(-) 1	(-) 1,9/(-) 1,2	(-) 1,4/(-) 1	(+) 2,8/(-) 4,2	(-) 2,4/(-) 2,7	(-) 2,5/(+) 1,6	
	XIAP	(-) 2/(+) 2,4	(-) 1,8/(-) 1,6	(-) 1,1/(+) 1,6	(+) 3,2/(-) 1,6	(-) 2,6/(-) 2,3	(-) 2,4/(+) 3,2	
inflammatorisch	IL-6	(+) 3,3/(+) 21,7	(-) 1,2/(+) 3	(-) 1,1/(-) 1,6	(+) 2,5/(-) 1	(+) 2,3/(+) 2,8	(+) 1,6/(+) 1,6	
	IL-8	(+) 11,1/(+) 83,4	(+) 1,1/(+) 7,2	(-) 2,4/(+) 8,9	(+) 5/(-) 2,9	(-) 1,2/(-) 1,2	(+) 2,1/(-) 1,5	

TPCA-1

		responsiv			sensitivierbar		resistent	
		PCI 1-1	PCI 13-1	HaCaT	SCC-25	PCI 9-1	PCI 52	
proapoptotisch	BAX	(+) 1,9/(+) 1,5	(-) 2,3/(-) 1,7	(+) 1/(+) 1,2	(-) 1,2/(+) 1	(+) 1,4/(-) 1,2	(-) 1,4/(-) 1,3	
	BCL2	(-) 1,1/(+) 1,6	(-) 8/(-) 7,4	(+) 1,2/(-) 18,5	(-) 14,5/(-) 3,2	(+) 2,2/(+) 1,5	(-) 4,2/(-) 1,1	
	BIRC2	(-) 3/(+) 1,7	(-) 3,1/(-) 2,4	(+) 1,3/(-) 2,8	(+) 1,6/(-) 2,1	(+) 1,3/(-) 3,5	(-) 1,2/(+) 1,1	
antiapoptotisch	BICR3	(-) 1,5/(-) 1,2	(+) 1,4/(+) 2,4	(-) 6,5/(-) 4,5	(-) 2,7/(-) 21,3	(+) 1/(-) 4,2	(-) 1,2/(+) 1,1	
	CFLAR	(+) 1,1/(+) 1,7	(-) 2,4/(-) 1	(-) 1,1/(-) 1,6	(-) 1,2/2,3 (-)	(+) 1,7/(-) 3,6	(-) 7/(-) 2,7	
	XIAP	(+) 1,9/(+) 5,9	(+) 1,3/(+) 6,2	(+) 1,9/(+) 1,5	(+) 1,1/(+) 1,9	(+) 2,3/(-) 2,9	(-) 1,5/(+) 2	
inflammatorisch	IL-6	(-) 3,2/(-) 1,2	(+) 4,4/(+) 4,7	(+) 2,1/(-) 5,5	(-) 4,2/(-) 4,9	(-) 2/(-) 1,2	(+) 14,1/(+) 1,4	
	IL-8	(-) 14,8/(-) 1	(+) 1,6/(+) 1,8	(-) 296,7/(-) 10,9	(-) 1,5/(-) 114,1	(-) 3,5/(-) 2,8	(-) 1,2/(-) 3	

Fold change (Expressionslevel C/Expressionslevel Probe)

	Hochregulation des Gens in beiden Versuchsdurchgängen \geq Faktor (+) 2
	Hochregulation des Gens in einem Versuchsdurchgang \geq Faktor (+) 2
	Hochregulation des Gens in beiden Versuchsdurchgängen zwischen Faktor (+) 1 bis < (+) 2
	Inkonsistente Genexpression (+ und -)
	Herunterregulation des Gens in beiden Versuchsdurchgängen zwischen Faktor (-) 1 bis < (-) 2
	Herunterregulation des Gens in einem Versuchsdurchgang \geq Faktor (-) 2
	Herunterregulation des Gens in beiden Versuchsdurchgängen \geq Faktor (-) 2

Expressionsregulation

Leicht: > 2 bis < 5-fach
Mittel: \geq 5 bis < 10-fach
Stark: \geq 10-fach

Abb. 24: Heatmap zur Expressionsanalyse apoptotischer und inflammatorischer Gene. Die Zeilen wurden für 24 Stunden mit dem NF- κ B-pathway-Inhibitor [IC₁₀₀] inkubiert und die Genexpression mittels RT-qPCR analysiert. Dargestellt sind die Daten von zwei, unabhängig voneinander durchgeführten Messungen (n = 2). Die Herunterregulation der Genaktivität wurde sequenziert, die Heraufregulation entsprechend grün dargestellt. Graue Flächen bedeuten ein inhomogenes Verhalten. Die Datenauswertung erfolgte mit der modifizierten $\Delta\Delta$ Ct-Methode nach Pfaff (Kap. 2.2.6.3). Die Profilderechnungen Expressionsanalysen sind im Appendix (Abb. 29 & 30) angehängt.

3.8 Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion

Die NF- κ B-pathway-Inhibitoren wirkten spender- und wirkstoffabhängig antiproliferativ (Kap. 3.3.1). Zur Analyse, ob Antiproliferation, Apoptose oder andere Zelltodformen induziert wurden, erfolgte nach 48-stündiger Inkubation [IC₁₀₀ (Tab. 13)] ein durchflusszytometrischer Annexin V PE/7-AAD-Assay.

3.8.1 Etablierung einer validen Apoptose-Bestimmung

Um die Validität des Tests (Kap. 2.2.5.1) zu überprüfen, wurde die Referenzzelllinie HaCaT für 24 Stunden mit FasL [200 ng/ml] inkubiert und mittels FACS vermessen (Abb. 25). In der Kontrolle waren etwa 90 % der Zellen Annexin V- und 7-AAD-negativ (Q4). Nach FasL-Inkubation verlagerte sich die Population nach Q2 (Annexin V+/7-AAD+). In diesem Quadranten, der spätapoptotische Zellen darstellt, konnte mehr als die Hälfte der Gesamtpopulation detektiert werden. Die Zunahme von Annexin V PE angefärbten Zellen war im Histogramm (FL2-H) mit einem distinkten Peak bei 50 RFU (relative fluorescence units) nachweisbar.

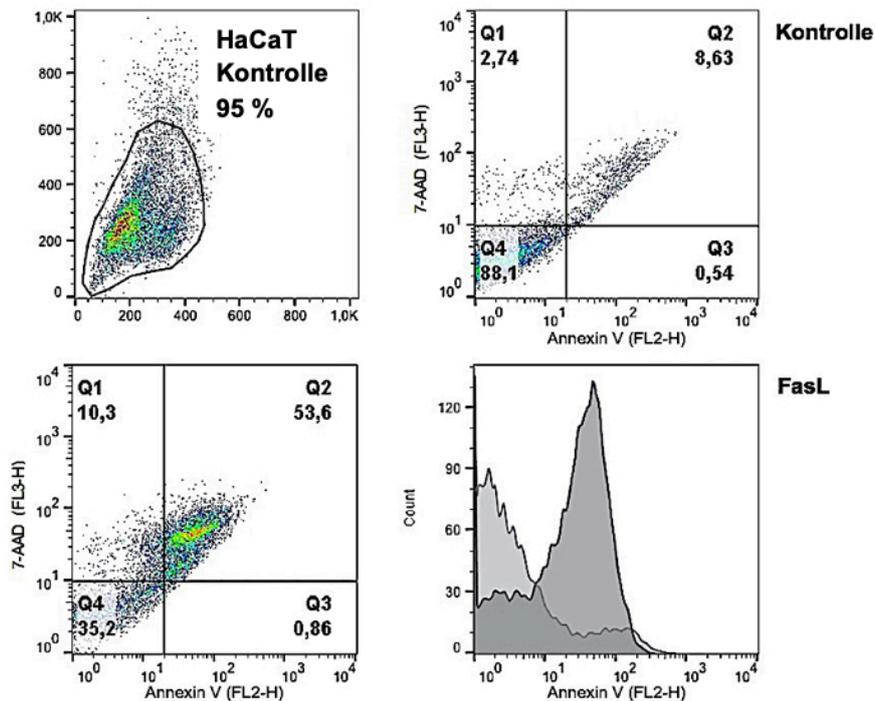


Abb. 25: Kontrollversuch zur Methodenvvalidierung des FACS-Apoptose-Assays. Die Referenzzelllinie HaCaT wurde als Postkontrolle mit FasL [200 ng/ml] inkubiert, mit der Annexin V PE/7-AAD-Doppel-färbemethode vorbereitet und durchflusszytometrisch im BD FACSCaliburSM (Kap. 2.2.5) analysiert. Es zeigte sich, verglichen zur Kontrolle, distinkte Verschiebungen der FasL-inkubierten Probe von Q4 (Annexin V-/7-AAD-) nach Q2 (Annexin V+/7-AAD+) im Quadrantenplot und Histogramm, was die valide Detektion von Apoptose anzeigt.

III. Ergebnisse

Zur weiteren Validierung des Assays wurde die FasL-responsive Zelllinie PCI 1-1 vermessen (Abb. 26). Nach FasL-Stimulation zeigte sich eine distinkte Verlagerung der Zellpopulation von Q4 nach Q2, welche im Histogramm einen prominenten Peak bei 50 RFU präsentierte. Da die für HaCaT beschriebenen Messergebnisse (Abb. 25) mit PCI 1-1 reproduzierbar waren, wurde von einem validen Verfahren zur Detektion von Apoptose bei den zu untersuchenden Zelllinien des HNSCC ausgegangen. Diese Zellen stellten sich als nicht konzentrische Populationen in den Messungen dar. Dieses Verhalten zeigten u. a. auch Zellen in Untersuchungen von *Azizi et al.* beim Einsatz dieses Kits¹⁷⁴.

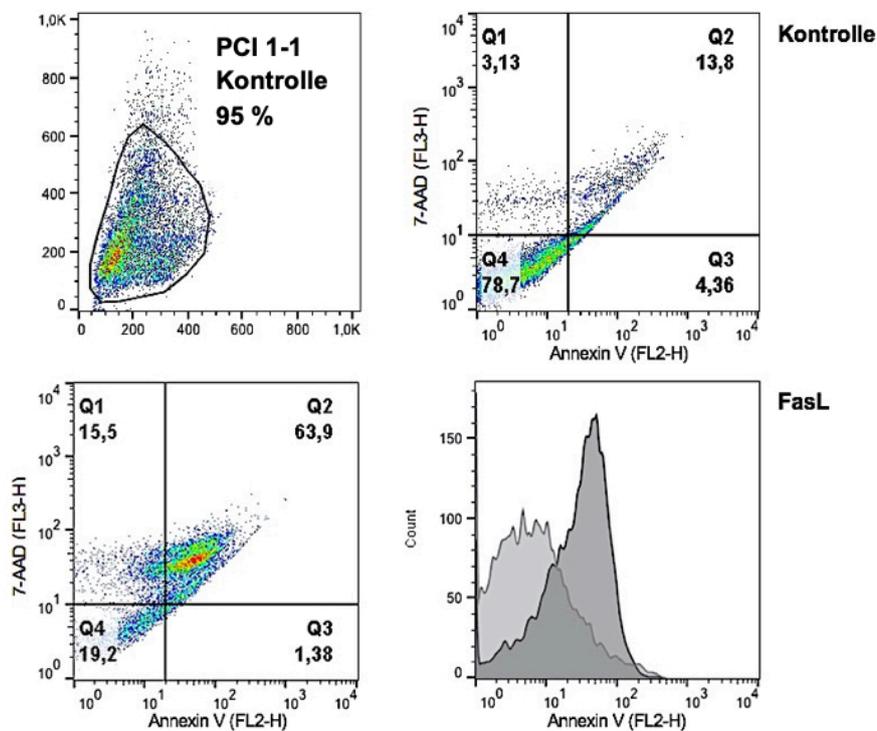


Abb. 26: Methodenvvalidierung zum Nachweis der Apoptose im HNSCC. Die Zelle PCI 1-1 wurde als Postkontrolle für 24 Stunden mit FasL [200 ng/ml] inkubiert. Die nach FasL-Behandlung zum Kontrollversuch mit HaCaT analoge Quadrantenverschiebung der Lebendzellpopulation von Q4 nach Q2 demonstrierte den validen Nachweis von Apoptose mit dem Annexin V PE/7-AAD-Apoptose-Assay.

3.8.2 Apoptoseinduktion durch NF- κ B-pathway-Inhibitoren

Die FACS-Analysen ergaben bei zwei Drittel der Proben eindeutige proapoptotische Effekte der Inhibitoren mit signifikanten Verschiebungen von Q4 nach Q2 [Tab. 15 (fett gedruckt)]. Als signifikant wurde ein Ergebnis bezeichnet, wenn mehr als 50 % der Zellen nach Inkubation mit den NF- κ B-pathway-Inhibitoren in Q2 zu liegen kamen und im Histogramm distinkte Annexin V-Peaks (FL2-H) nachweisbar waren.

Es imponierte eine teilweise heterogene Responsivität für die NF- κ B-Inhibitoren. Am wirksamsten war MLN4924 [IC₁₀₀ von Ø 84,7 μ M], welches im gesamten Zellpanel eindeutige Verschiebungen nach Q2 induzierte. Es wurden 59,3 bis 82 % der Zellpopulationen positiv auf Annexin V PE und 7-AAD getestet. TPCA-1 [IC₁₀₀ von Ø 70,9 μ M] demonstrierte mit einer signifikanten Induktion Annexin V- und 7-AAD-positiver Zellen (69 bis 82,3 %) bei fünf der sechs Zelllinien ebenfalls eine hohe proapoptotische Wirkung. QNZ [IC₁₀₀ von Ø 6,5 μ M] konnte bei vier Zelllinien effektive Verlagerungen nach Q2 bewirken. Hierbei waren 61,2 bis 93,8 % der Zellpopulation Annexin V- und 7-AAD-positiv. Cortisol [IC₁₀₀ von Ø 280 μ M] induzierte Apoptose nur bei PCI 52, weshalb gegebenenfalls eine spenderabhängige, schwach Apoptose-induzierende Wirksamkeit für Cortisol anzunehmen ist.

III. Ergebnisse

Zelllinie	Proben (n = 1)	Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)
PCI 1-1	Kontrolle	9,7	17	4,1	69,2
	Cortisol	3,1	13,6	5,3	78,1
	MLN4924	5,6	82	2,6	9,8
	QNZ	2,6	93,1	2,6	1,7
	TPCA-1	4,2	73,4	7,7	14,7
PCI 9-1	Kontrolle	4,6	22,4	16,9	56,1
	Cortisol	3,3	38,5	19,6	38,7
	MLN4924	13,8	69,2	4,6	12,4
	QNZ	5,8	93	0,3	0,9
	TPCA-1	9,2	82,3	2,4	6,1
PCI 13-1	Kontrolle	15	18,9	5,9	60,2
	Cortisol	5,4	32,5	12,7	49,4
	MLN4924	8,3	75,6	2	14,1
	QNZ	36,9	61,2	0,3	1,6
	TPCA-1	2,6	31,8	8	57,6
PCI 52	Kontrolle	4,2	16,7	14,3	64,8
	Cortisol	26,3	54,8	6,4	12,5
	MLN4924	14	79,6	1,8	4,6
	QNZ	5,7	93,8	0,2	0,3
	TPCA-1	11,1	73,4	6,4	9,1
SCC-25	Kontrolle	3,7	18,4	13,3	64,6
	Cortisol	3,2	33,1	15,5	48,2
	MLN4924	3,7	59,3	11,3	25,7
	QNZ	2,7	31,7	15,8	49,8
	TPCA-1	7,4	69	2,7	20,9
HaCaT	Kontrolle	8,1	9,4	3,4	79,1
	Cortisol	10,4	33	3,6	53
	MLN4924	9,5	67,8	3,1	19,7
	QNZ	8,8	42,1	5,3	43,8
	TPCA-1	4,6	72,3	5,4	17,6

Tab. 15: Analyse des Annexin V PE/7-AAD-FACS-Apoptose-Assays. Stimulation der Zellen mit Cortisol, MLN4924, QNZ bzw. TPCA-1 [IC₁₀₀] für 48 Stunden. Dabei wurden in Q1 Zellen abgedet, die sich in unspezifischen Zelltod befinden, in Q2 spätapoptotische (hellgrau markierte Tabellenspalte), in Q3 frühapoptotische und in Q4 tote Zellen. Fettgedruckte Werte in Spalte Q2 spiegeln die signifikante Induktion von Apoptose im Vergleich zur Kontrolle wider. Diese Beurteilung erfolgte semiquantitativ, wenn sich die prozentuale größte Zellfraktion in diesem Quadranten befand.

4 Diskussion

Die Inflammation ist ein zentraler Aspekt der Tumorbilogie, da sie zur Initiation und Progression neoplastischer Prozesse beiträgt. Obwohl die Bedeutung inflammatorischer Prozesse im Zusammenhang von Tumorerkrankungen schon lange bekannt ist, gewinnen diese im Zuge der aktuellen Entwicklung zielgerichteter Tumorthérapien zunehmendes Interesse¹⁷⁵.

4.1 “Back to Virchow”¹⁷⁶

Rudolf Virchow begründete mit seiner Erstbeschreibung des lymphoretikulären Infiltrats die Tumorummunologie und legte das Fundament für das Verständnis über die Entstehung von Tumoren aus chronisch-entzündeten Geweben. Das Immunsystem trägt zur Karzinogenese bei, weshalb Balkwill und Mantovani titelten „*Inflammation and cancer: back to Virchow?*“¹⁷⁶. Der genetische Schaden ist der initiale Auslöser, die Entzündung der Akzelerator^{177,178}. Diese Erkenntnis ist für die moderne Onkotherapie von zentraler Bedeutung und macht *Virchows* Erkenntnis aktuell. Der NF- κ B pathway ist einer der wichtigsten proinflammatorischen und antiapoptotischen Signalwege und bietet als molekulares Bindeglied zwischen Inflammation und Krebs ein plausibles target der Tumorthérapie. Da das HNSCC durch Inflammation und ausgeprägte Aktivierung des NF- κ B pathways gekennzeichnet ist, erscheinen NF- κ B-pathway-Inhibitoren in diesem Kontext von besonderem Nutzen sein zu können. Durch die Auswahl von Cortisol, MLN4924, QNZ und TPCA-1 wurden vier Inhibitoren analysiert, die diesen Signalweg auf unterschiedlichen Ebenen adressieren.

4.1.1 Analyse des autokrinen durch TNF- α getriggerten Feedbackmechanismus zur Induktion der Inflammation im HNSCC

Die dichotome, dosisabhängige Rolle von TNF- α ist bekannt¹⁷⁹. Einerseits kann es durch Aktivierung des Akt-Signalwegs das Zellüberleben induzieren¹⁸⁰. Andererseits kann TNF- α durch die veränderte Homöostase zellulärer Signalproteine proapoptotisch wirken¹⁸¹. TNF- α ist der potenteste Induktor des NF- κ B pathways^{55,182}. Nach *Jackson-Bernitsas et al.* ist dieser Signalweg konstitutiv durch die autokrine Freisetzung von TNF- α in HNSCC-Zellen aktiviert (Abb. 3)⁷⁸. Dies konnte ebenfalls für das untersuchte Zellpanel auf Zytokinebene gezeigt werden

(Abb. 14). Die Titer lagen zwar nahe der Nachweisgrenze, dennoch entsprachen sie den von *Nakano* und *von Biberstein et al.* für das HNSCC publizierten Daten^{183,184}. Dem gegenüber konnten *Chen* und *Woods et al.* keine Sekretion von TNF- α im HNSCC nachweisen, was auf eine spenderabhängige Freisetzung [vgl. SCC-25 (Abb. 14)] hinweisen könnte^{185,186}.

TNF- α induzierte im vorliegenden Panel keine antiproliferativen Effekte, was die Resistenz des HNSCC gegen extrinsische Apoptosestimuli zeigt¹⁸⁷. Es ist anzunehmen, dass kein inadäquater Rezeptorbesatz hierfür verantwortlich ist, wie *Jackson-Bernitsas* und *von Biberstein et al.* bestätigen^{78,184}. Die Überexpression löslicher TNF-Rezeptoren könnte durch kompetitiven Antagonismus funktionell inhibierend bzw. senkend auf die TNF- α -Level wirken¹⁸³. Dies könnte, neben der vermutlich geringen Testsensitivität, die beschriebenen niedrigen Messwerte erklären (Abb. 14). Entsprechend berichten *Aderka et al.*, dass Tumorzellen lösliche TNF-Rezeptoren freisetzen können, was *Su et al.* für das HNSCC belegen^{188,189}.

Die Relevanz von TNF- α als proinflammatorischem Trigger des HNSCC zeigte sich in seiner signifikanten Induktion der IL-8-Sekretion (Abb. 11), was *Cohen et al.* bestätigen¹⁶¹. Ferner zeigen *Reers et al.* für das HNSCC, dass es induziert durch Chemo- oder Strahlentherapie TNF- α ausschüttet, was die Bedeutung dieses Signalwegs auch im Zusammenhang mit konventionellen Tumorthérapien andeutet¹⁹⁰. Somit kann die Hypothese der NF- κ B-medierten, selbstverstärkenden Inflammation, getriggert durch autokrines TNF- α , grundsätzlich als plausibel erachtet werden. Dennoch ist bei Betrachtung der TNF- α -Konzentrationen, die zur Induktion der IL-8-Sekretion notwendig waren (Kap. 3.4.1), fraglich, ob die nachweisbaren TNF- α -Werte ausreichend für eine adäquate Induktion des NF- κ B-Signalwegs wären oder ob extrinsische Quellen in Frage kommen müssten.

4.1.2 IL-8 als Biomarker für auf Inflammation eingestellte HNSCC-Zellen

Die starke Ausschüttung von IL-8 ist charakteristisch für das HNSCC, weshalb es als Biomarker in Patientenseren nachweisbar ist⁵⁸. Die untersuchten HNSCC-Zelllinien sezernierten hohe IL-8-Basal-Level, die von TNF- α signifikant getriggert wurden (Abb. 11). Auch *Chen et al.* konnten vergleichbare IL-8-Level

verifizieren, ohne eine TNF- α -Sekretion nachweisen zu können⁵⁸. Das könnte dafür hinweisgebend sein, dass die detektierten TNF- α -Werte unerheblich für die IL-8-Expression sind. Diese Annahme wird durch *Pries et al.* unterstützt, die vergleichbare, TNF- α -unabhängige IL-8-Level im HNSCC beschreiben¹⁹¹. Daher erscheint es in diesem Kontext als plausibel, Signalproteine des NF- κ B pathways durch zielgerichtete Therapiestrategien zu attackieren.

4.2 Vergleichende Analyse der NF- κ B-pathway-Inhibitoren für die prospektive Therapie des HNSCC

Als potentieller Wirkstoff für den klinischen Einsatz qualifizierte sich in der vorliegenden Studie lediglich TPCA-1. Während Cortisol kaum zytotoxische (bzw. antagonistische) Effekte induzierte, hemmten TPCA-1, MLN4924 und QNZ die Zellproliferation bereits bei niedrigen mikromolaren IC₅₀-Werten. Obwohl diese Konzentrationen für den Einsatz einer rein antiproliferativ intendierten Therapie als zu hoch erscheinen könnten, wäre diese Wirkung als zusätzlicher positiver (Neben-) Effekt zu beurteilen. Im Hinblick auf die Anwendung als entzündungshemmende Therapeutika zeigten weder Cortisol noch QNZ signifikante IL-8-senkende Effekte. Bemerkenswert war die starke IL-8-Zunahme unter Therapie mit MLN4924, wodurch sich diese Wirkstoffe für den weiteren Einsatz disqualifizierten.

TPCA-1 kristallisierte sich aufgrund der nachfolgend erläuterten Eigenschaften als geeigneter NF- κ B-Inhibitor für die prospektive klinische Therapie des HNSCC heraus:

- 1) TPCA-1 wirkte in niedrig mikromolaren Dosen antiproliferativ (Abb. 15),
- 2) hemmte signifikant die TNF- α -induzierte IL-8-Sekretion (Abb. 17),
- 3) regulierte spezifisch die IL-8-Expression herab (Abb. 24),
- 4) wirkte sensitivierend für den TNF- α -induzierten Zelltod (Abb. 19),
- 5) interferierte gering mit der FasL-vermittelten Apoptose (Abb. 23) und
- 6) induzierte nachweislich Apoptose (Tab. 15).

4.2.1 Analyse der hohen Wirksamkeit von TPCA-1 im HNSCC

Es stellt sich die Frage, warum TPCA-1 im Vergleich der vier NF- κ B-Inhibitoren insgesamt am effektivsten wirkt. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist seine

Wirkung nicht auf einen detaillierten molekularen Mechanismus zurückzuführen. TPCA-1 adressiert hochspezifisch die IKK β -Untereinheit des IKK-Komplexes im klassischen NF- κ B pathway, während die anderen Inhibitoren indirekt die I κ B α -Phosphorylierung bzw. den NF- κ B pathway beeinflussen. Es ist davon auszugehen, dass TPCA-1 im analysierten Zellpanel der einzige Inhibitor war, der den klassischen NF- κ B-Signalweg zielgerichtet hemmen konnte, da nur TPCA-1 die IL-8-Sekretion als dessen Surrogatmarker signifikant blockierte. Die weiteren Wirkstoffe könnten den klassischen oder alternativen Weg beeinflusst haben, mutmaßlich unspezifisch. In den HNSCC-Zellen induzierten sie ein Ungleichgewicht der NF- κ B-regulierten Genexpression, was die unspezifische und teilweise proinflammatorische Zellreaktion erklären könnte. Der Hauptvorteil von TPCA-1 liegt in seiner selektiven und zielgerichteten Wirksamkeit¹⁰⁶. Bekannt ist, dass der NF- κ B-Signalweg im HNSCC konstitutiv aktiviert ist. Ausgelöst wird seine permanente Aktivierung durch IKK, was mit der gesteigerten Phosphorylierung seines Kinaseprodukts I κ B α (pI κ B α) korreliert ist. pI κ B α , welches in ruhenden Zellen im dephosphorylierten Zustand inhibierend wirksam ist, wird nach Stimulation mit TNF- α proteasomal degradiert und der kanonische Signalweg aktiviert⁷⁸. Die deutliche Reduktion der Entzündung könnte durch die spezifische Wirkung von TPCA-1 als IKK β -Inhibitor induziert worden sein. Bemerkenswerterweise kam es unter TNF- α -Inkubation zur Verstärkung der Reduktion des IL-8-Titers. Dies lässt vermuten, dass TPCA-1 eine höhere Wirksamkeit unter getriggelter Inflammationslage besitzen könnte und möglicherweise eine hohe Spezifität für Krebszellen hat, die extrinsisch proinflammatorisch stimuliert werden. Des Weiteren sensibilisierte TPCA-1 die Zellen für den TNF- α -induzierten Zelltod, was erstmalig gezeigt werden konnte und die Bedeutung des NF- κ B pathways für Therapieresistenzen unterstreicht. Hervorzuheben ist, dass dieser Effekt bei allen Zelllinien zu finden war. Im Vergleich induzierten die anderen Inhibitoren keine bzw. deutlich geringere Effekte, weshalb von einer spezifischen Wirkung von TPCA-1 ausgegangen werden kann. Seine molekulare Wirksamkeit beruht auf der Hemmung der TNF- α -induzierten I κ B α -Degradation, was *Rauert-Wunderlich et al.* für das Multiple Myelom zeigen konnten. Sie inhibierten durch TPCA-1 die Hochregulation von IL-8 durch Blockade des klassischen NF- κ B pathways¹⁰⁶.

4.2.1.1 Die Bedeutung von IKK β als target zielgerichteter Tumorthherapie

Der NF- κ B pathway ist als ein wesentlicher Pathomechanismus des HNSCC anerkannt¹⁹². Krebsgenomanalysen zeigen, dass 8,5 % der Patienten Mutationen in den IKK-kodierenden Genen tragen, wovon 5 % auf IKBKB entfallen^{193,194}. Diverse Autoren berichten von einer konstitutiven Aktivierung des IKK-Komplexes, was den NF- κ B pathway in Tumorzellen induziert⁷⁸. *Karin et al.* beschrieben IKK β als molekularen Linker zwischen Inflammation und Krebs^{81,195}. Dies kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Als einziger Wirkstoff konnte TPCA-1 die IL-8-Sekretion, bei gleichzeitiger Sensitivierung der HNSCC-Zellen für den TNF- α -induzierten Zelltod, inhibieren. Korrelationsanalysen ergaben, dass die Effekte unabhängig von der Zellviabilität erzielt wurden, was auf die zielgerichtete Inhibition des klassischen NF- κ B pathways hinweist. Anzunehmen ist, dass IKK β ein zentraler Promotor der Inflammation im HNSCC ist, was es als sinnvolle Zielstruktur qualifiziert. Dies ist konsistent mit den Angaben von *Li et al.* Diese Arbeitsgruppe konnte durch spezifische IKK β -Inhibition therapieresistente HNSCC-Zellen proapoptotisch sensitivieren und einen proliferativen Rückkopplungsmechanismus ausgehend vom epidermal growth factor receptor (EGFR) durchbrechen¹⁹⁶. Dies könnte es als target zur Sensitivierung für Systemtherapien bzw. Inhibitoren in Form von Kombinationsbehandlungen interessant machen, was *Li et al.* beispielsweise für Gefitinib zeigen¹⁹⁷. Bislang ist jedoch unklar, welche Mechanismen die IKK-Daueraktivierung induzieren. Grundsätzlich bewirkt die Phosphorylierung von Serin 177 und 181 die Aktivierung von IKK β ¹⁹⁸. *Jackson-Bernitsas et al.* weisen auf RIPK1, TAK1, PI3K, AKT1 und Ras als mögliche Ursachen hin⁷⁸. Tatsächlich ergaben Krebsgenom-Analysen des HNSCC signifikante Koexpressionen des IKBKB-Gens mit den Genen RIPK1, AKT1 und HRAS^{193,194}. Außerdem ist ein Feedback-Mechanismus ausgehend von EGFR über PI3K, Akt, mTORC1, IKK bis NF- κ B für das HNSCC bekannt, dessen Hemmung durch IKK β -Inhibition die Zellproliferation blockiert, Apoptose induziert und IKK β als Schlüsselprotein beider Signalwege identifiziert¹⁹⁹.

4.2.2 Analyse der insuffizient wirkenden Inhibitoren

4.2.2.1 Cortisol

Cortisol wies stark antagonistische Effekte auf, deren mechanistische Grundlagen bislang nicht vollständig verstanden sind¹⁰¹. Zwei Studien beschreiben die Ineffizienz von Cortisol bei der Therapie von HNSCC. *Thurnher et al.* erklären diese mit der geringen Wirksamkeit von Cortisol auf die Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins, was mit den vorliegenden Daten übereinstimmt (Abb. 24)^{200,201}. Auch weitere Autoren verweisen auf die verstärkte Expression antiapoptotischer Gene^{102,202,203}. Tatsächlich stimulierte Cortisol die Bcl-2-Expression der Zelllinie PCI 13-1 (Abb. 24), was die induzierte FasL- bzw. Apoptose-Resistenz dieser Zelllinie erklären könnte (Abb. 20). Außerdem wäre eine refraktäre NF- κ B-Funktion denkbar¹⁰¹. Die antiinflammatorischen glucocorticoiden Effekte beruhen u. a. auf der gesteigerten Expression des NF- κ B-Inhibitors I κ B α ²⁰⁴. Aufgrund der konstitutiven IKK-Aktivierung kann spekuliert werden, ob durch die gesteigerte proteasomale Degradation von I κ B α die Wirkung der Glucocorticoide auf den NF- κ B pathway kompensiert wird. Der klinische Einsatz von Cortisol zur Hemmung der Inflammation und proapoptotischen Sensitivierung des HNSCC muss äußerst kritisch bewertet werden, weshalb aufgrund der vorliegenden Daten davon abgeraten werden muss.

4.2.2.2 MLN4924

Die Inflammation der HNSCC-Zellen wurde durch MLN4924 massiv induziert, was eine neue Erkenntnis ist. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang unbekannt. Wie Genexpressionsanalysen zeigten (Abb. 24), könnte er transkriptionell bedingt, möglicherweise NF- κ B-induziert und relativ spezifisch für die Expression des IL-8-Gens sein. Deshalb muss die Verwendung von MLN4924 für die klinische Tumorthherapie intensiv evaluiert werden, da IL-8 die Tumorphyse begünstigt^{205,206}. Es wurde die Hypothese überprüft, ob MLN4924 die TNF- α -Sekretion induziert, was auto- bzw. parakrin die IL-8-Sekretion verstärken könnte (Abb. 3). Es waren keine signifikanten TNF- α -Signale nachweisbar, weshalb dieser Mechanismus ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise inhibierte MLN4924 effizient die Zellproliferation, interferierte

kaum mit FasL und wirkte teilweise sogar sensitivierend für den FasL- und TNF- α -induzierten Zelltod. *Zhang et al.* konnten detailliertere Einblicke in diesen Wirkmechanismus geben. MLN4924 induziert die Akkumulation von c-Myc, eines CRL-Ligasesubstrats des NEDD8-Konjugationswegs, welches das proapoptotische Protein Noxa transkriptionell aktiviert²⁰⁷. Auch andere Autoren konnten zell-todinduzierende Effekte von MLN4924 für das HNSCC darlegen, das durch die Reduktion von c-FLIP für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert wurde. *Zhao et al.* konnten die MLN4924-abhängige, JNK-medierte proteasomale c-FLIP-Degradation nachweisen, was die unspezifische Wirkung auf transkriptioneller Ebene erklärt (Abb. 24). Dies könnte möglicherweise eine Ursache der MLN4924-induzierten IL-8-Expression sein. Es ist bekannt, dass MLN4924 den mitogenen JNK-Signalweg im HNSCC aktiviert¹¹⁰. *Gross et al.* konnten im HNSCC durch Inhibition dieses pathways die IL-8-Sekretion hemmen, was den JNK/AP-1-Signalweg als mögliche Ursache der MLN4924-induzierten IL-8-Sekretion in Frage kommen lässt^{208,209}.

4.2.2.3 QNZ

QNZ konnte sich ebenfalls nicht als wirksamer antiinflammatorischer Wirkstoff erweisen, da es - ähnlich wie MLN4924 - die TNF- α -induzierte IL-8-Freisetzung verstärkte (Abb. 17). Der Wirkmechanismus von QNZ ist bislang unbekannt^{111,112}. Daten für das HNSCC sind nicht publiziert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass QNZ die Aktivierung der NF- κ B-Untereinheit p65 inhibiert, ohne dabei I κ B zu degradieren^{113,114}. Dies entspricht den Arbeiten von *Vigont und Wu et al.*, wonach QNZ den IKK-Komplex nicht hemmt, was möglicherweise eine Erklärung für die TNF- α -getriggerte IL-8-Freisetzung im HNSCC liefern könnte (Abb. 17)^{210,211}. QNZ hemmte hocheffektiv die Zellproliferation und wirkte sensitivierend für den FasL-induzierten Zelltod (Abb. 15 & Abb. 22), jedoch spenderabhängig, was die einzigen positiven Aspekte zugunsten von QNZ waren. Dies ist vereinbar mit den Daten von *Liu und Tsai et al.*, die zeigten, dass QNZ über die Reduktion antiapoptotischer Proteine (bspw. MCL-1, XIAP und c-FLIP) wirkt. Übereinstimmende genregulatorische Wirkungen konnten in der Expressionsanalyse gezeigt werden, die eine herabregulierende Wirkung von QNZ vorzugsweise auf antiapoptotische Gene zeigte, die jedoch von einer stark inhomogenen

Spenderabhängigkeit geprägt war (Abb. 24). Daneben gibt es Hinweise, dass QNZ nicht direkt, sondern über vorgeschaltete, Ca^{2+} -vermittelte Schritte den NF- κB pathway inhibiert, wodurch *Pozzobon et al.* die IL-8-Sekretion inhibieren konnten^{212,213}. Dies könnte erklären, warum QNZ in HNSCC-Zellen mit konstitutiver IKK-Aktivierung die IL-8-Sekretion kontraproduktiv beeinflusste.

4.2.3 Apoptose als (Neben-) Effekt der targetierten NF- κB -Inhibition

Zytotoxische Effekte wurden validiert, wie beispielsweise der durch TPCA-1 sensitivierte TNF- α -induzierte Zelltod (Abb. 19). Überraschenderweise konnten die NF- κB -Inhibitoren auch den FasL-vermittelten Zelltod begünstigen (Abb. 21 - 23). Da die NF- κB -Inhibition genregulatorisch wirkt, kann nicht notwendigerweise von einer direkten Induktion der Apoptose ausgegangen werden. Durchflusszytometrisch konnte ein signifikanter Anstieg der apoptosespezifischen Fluoreszenzfarbstoffe nachgewiesen werden (Tab. 15), was die Induktion der Apoptose durch targetierte NF- κB -Inhibition beschreibt. Somit stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um einen Nebeneffekt handelt oder ein direkter Zusammenhang besteht. *Pikarsky et al.* konnten ebenfalls durch NF- κB -Inhibition Apoptose induzieren⁷⁵. *Greten et al.* zeigten, dass mittels IKK β -Inhibition Apoptose durch Suppression des antiapoptotischen Proteins Bcl-XL induziert wird⁷⁴. *Duffey et al.* berichten, dass sie durch Expression des NF- κB -Inhibitors I $\kappa\text{B}\alpha\text{M}$ die Apoptose bei TNF- α -resistenten HNSCC-Zellen induzieren konnten¹⁸⁷. Somit kristallisiert sich IKK β , auch bei der Induktion von Apoptose, als möglicherweise entscheidendes Schlüsselprotein heraus. Dementsprechend konnten *Li et al.* durch IKK β -Inhibition HNSCC-Zellen proapoptotisch sensitivieren, was Caspasenaktivierungen anzeigen. SCC-25 wies hierbei einen signifikanten Anstieg der Caspasenaktivität um 50 % auf¹⁹⁹. Bemerkenswerterweise zeigte sich bei TPCA-1 eine vergleichbare Zunahme spätapoptotischer SCC-25-Zellen (Tab. 15), was die proapoptotische Wirkung der IKK β -Inhibition demonstriert. Dies bestätigen *Nan et al.*, die die TPCA-1-induzierte Apoptose durchflusszytometrisch validierten¹¹⁷. Jedoch scheinen auch weitere Mechanismen die Apoptose induzieren zu können. Für QNZ, welches in der vorliegenden Studie hochpotent, aber spenderspezifisch Apoptose auslöste, konnten *Shi et al.* zeigen, dass es ROS-abhängig und durch Einleitung des Zellzyklusarrest wirkt²¹⁴. *Zhao et al.* konnten die proapoptotische

Potenz von MLN4924 ebenfalls durchflusszytometrisch nachweisen und diese auf die Degradation von c-FLIP zurückführen¹¹⁰.

4.3 Die Bedeutung der Regulation onkogener NF- κ B-Zielgene

NF- κ B reguliert als Transkriptionsfaktor u. a. antiapoptotische und proinflammatorische Gene, welche die maligne Transformation induzieren. Die Unterdrückung der Regulationsmechanismen dieser Zielgene könnte zur Beseitigung von Resistenzmechanismen beitragen. Die Wirksamkeit der IKK β -Inhibition war auf Transkriptionsebene durch die homogene Herunterregulation der inflammatorischen Gene durch TPCA-1 erkennbar. Die Bedeutung von IKK β bezüglich Induktion und Hemmung der Inflammation von Tumorzellen wird im Vergleich mit MLN4924 und QNZ deutlich, die die Inflammation bei Adressierung anderer Signalproteine des NF- κ B pathways massiv verstärkten, was sich ebenfalls auf transkriptioneller Ebene abzeichnete. Zusätzlich besaß TPCA-1 proapoptotische Eigenschaften. Jedoch war das Expressionsmuster dieser Gene ausgeprägt heterogen, was die Analyse erschwert und keine spezifische Wirkung vermuten lässt. Dagegen induzierten MLN4924 und QNZ die Inflammation, was die transkriptionelle Hochregulation der Interleukin-Gene demonstrierte. Diese Wirkstoffe scheinen vielmehr proapoptotisch auf Tumorzellen zu wirken (Kap. 4.2.2.2 & 4.2.2.3). Jedoch war hier kein einheitliches Expressionsmuster erkennbar. QNZ regulierte in einer HNSCC-Zelllinie das antiapoptotische Genpanel herab, was die Apoptoseinduktion in der Durchflusszytometrie erklären könnte und eine Spenderspezifität andeutet. Eine gewisse Affinität von QNZ für proapoptotische, NF- κ B-medierte Proteine konnten auch *Yen* und *Tsai et al.* feststellen^{115,215}. Hierzu kongruent verhielt sich MLN4924. Wie andere Autoren darlegen, werden durch MLN4924 proapoptotische Proteine hoch- und antiapoptotische Proteine herunterreguliert^{108,207,216}. Möglicherweise beruhen die Effekte von MLN4924 und QNZ auf Proteinebene, was die unspezifischen Wirkungen in der Expressionsanalyse andeuten. Letztlich könnten sich individuelle Indikationen für den Einsatz von NF- κ B-Inhibitoren anbieten, die, je nach Genexpressionssignatur, vorteilhaft sein könnten und individuell geprüft werden müssten. Insgesamt betrachtet exponierte sich insbesondere TPCA-1 aufgrund seiner selektiven antiinflammato-

rischen und proapoptischen Effekte auf Transkriptions- und Zytokinebene für die prospektive klinische Tumortherapie.

4.4 Perspektiven antiinflammatorischer Tumortherapien

Das Verständnis von Krebs als chronisch-entzündlicher Erkrankung hat die Onkologie revolutioniert. Gelänge es, die angeborene Immunität gegenüber entarteten Zellen therapeutisch zu nutzen bzw. durch Reduktion einer überschießenden Immunreaktion die Tumorpromotion zu stoppen, stünden neue Therapieoptionen bereit. Um die körpereigene Immunabwehr zur Bekämpfung der Tumorzellen zu nutzen, bedarf es eines tiefen Verständnisses der Tumorbiologie. Dabei zeichnet sich das HNSCC durch eine enorm heterogene Mutationslandschaft aus, die wirksame Therapien erschwert²¹⁷. Die Entschlüsselung von spenderspezifischen Konstellationen, die von einer antiinflammatorischen Therapie profitieren würden, könnte durch next generation sequencing erfolgen, um personalisiert und maßgeschneidert therapieren zu können^{218,219}.

Was Tumoren jedoch eint, ist die chronische Inflammation. Als Relaisstation und gemeinsamer Endstrecke diverser Signalwege dient dabei NF- κ B²²⁰. Die zielgerichtete Inhibition des NF- κ B pathways erscheint daher aus mehrfacher Sicht sinnvoll zu sein. Zum einen könnte durch eine entzündungshemmende Therapie die Tumorpromotion limitiert und das Krebsrisiko prophylaktisch gesenkt werden, wie es für nichtsteroidale Antirheumatika bekannt ist^{221,222}. Diese Therapie wäre zwar nicht primär kurativ intendiert, jedoch könnte es, ähnlich einer HIV-Therapie, zur funktionellen Heilung mit latentem Verbleib des Tumors kommen²²³. Letztlich könnte dies zur Lebenszeitverlängerung und Steigerung der Lebensqualität der Patienten beitragen. Zum anderen könnten in Folge der NF- κ B-Inhibition Resistenzmechanismen aufgehoben werden. Durch die Kombination mehrerer zielgerichteter Wirkstoffe könnte das komplexe Geflecht dysregulierter Signalwege effektiv attackiert werden, um immunescape-Mechanismen des Tumors zu blockieren²²⁴. Durch das konzeptionelle Verständnis von Krebs als inflammatorischer Erkrankung könnten sich außerdem bereits etablierte Therapieregimen, beispielsweise aus dem rheumatischen Formenkreis oder chronisch-entzündlicher bzw. infektiöser Erkrankungen, anbieten und das therapeutische Arsenal erweitern.

4.4.1 Die Bedeutung des TME für die Aktivierung des NF- κ B pathways

Direkte onkogene Mutationen von Signalproteinen des NF- κ B pathways sind selten. Beispielweise besitzen weniger als 10 % der HNSCC-Patienten Mutationen der für IKK-kodierenden Gene^{193,194}. Jedoch können extrinsische Stimuli zur NF- κ B-Daueraktivierung beitragen²²⁵. Das direkte Tumorumfeld triggert den NF- κ B pathway durch parakrine Freisetzung von TNF- α . *Takahashi et al.* zeigten, dass tumorassoziierte Fibroblasten eine erhöhte TNF-Genexpression aufweisen²²⁶. Auch mesenchymale Stammzellen und Makrophagen können durch TNF- α -Sekretion den NF- κ B pathway induzieren^{227,228}. Wie *Scherzad et al.* fordern, muss die lokale Tumor-Wirts-Interaktion in die Therapie des HNSCC einbezogen werden, um Fortschritte beim Therapieoutcome erzielen zu können²²⁹.

4.4.2 Möglichkeiten NF- κ B-targetierender Strategien für die Onkotherapie

Klassische Tumorthapien können aufgrund der Aktivierung des NF- κ B pathways proinflammatorisch wirken, was ihre intendierte Wirkung konterkariert und zu Tumorprogression und Therapieresistenz beiträgt⁷⁶. Daher könnten durch die zielgerichtete Inhibition von NF- κ B die Effekte konventioneller Therapien gesteigert und möglicherweise ihre Nebenwirkungen reduziert werden. Synergistisch wirkende Kombinationstherapien sind sinnvoll, da antiinflammatorische Therapien *per se* keine zytotoxischen Effekte induzieren und insgesamt geringere therapeutische Wirkstoffdosen gestatten könnten²³⁰. Insbesondere die spezifische IKK β -Inhibition erscheint hierbei als aussichtsreich, da TPCA-1 antiinflammatorische mit proapoptotischen Eigenschaften vereint. Deshalb kann vermutet werden, dass Kombinationen mit anderen target-Inhibitoren oder Chemo- bzw. Radiotherapien wirkungsvoll sein und bestehende Resistenzen auflösen könnten. Erste Berichte zeigen, dass TPCA-1 *in vitro* sensitivierend für TKI wirkt¹¹⁷. Aufgrund von IAP-Überexpressionen kämen für das HNSCC beispielsweise SMAC mimetics in Frage. Hierdurch konnten die beschriebenen Zelllinien bereits *in vitro* erfolgreich für Todeslidanden sensitiviert werden^{170,171,172,173,231}. Bei der Referenzzelllinie HaCaT, bei der eine Überaktivierung des NF- κ B pathways vorliegt, zeigten sich in der vorliegenden Arbeit hochsignifikante Sensitivierungseffekte, weshalb sie modellhaft für eine erfolgreiche proapoptotische Sensitivierung durch NF- κ B-Inhibition stehen kann²³². Da TPCA-1 nur mäßig sensitivierend für

FasL wirkt, könnten hierdurch apoptotische Effekte induziert werden. Dies bestätigen *Ren et al.*, die durch NF- κ B-Inhibition TRAIL-resistente HNSCC-Zellen sensibilisieren konnten²³³. Des Weiteren ist bekannt, dass es nach IAP-Inhibition zur NIK-Akkumulation mit Aktivierung beider NF- κ B-Signalwege kommt, was die kombinierte Anwendung mit SMAC mimetics plausibel macht²³⁴.

Da inflammatorische Prozesse die Tumorpromotion im Frühstadium der Karzinogenese triggern, könnte die Anwendung von NF- κ B-pathway-Inhibitoren präventiv wirksam sein, wie beispielsweise bei der prophylaktischen Einnahme von ASS beim kolorektalen Karzinom²²¹. *In vivo* wurde bereits gezeigt, dass die Einnahme nichtsteroidaler, entzündungshemmender Medikamente das Überleben von HNSCC-Patienten signifikant verlängert²²². Eine antiphlogistische Medikation wäre vermutlich deutlich verträglicher als konventionelle zytotoxische Therapien und könnte in frühen Tumorstadien als Progressionsprophylaxe verabreicht werden. Um zu diesem Zweck das HNSCC frühzeitig diagnostizieren zu können, sind hochsensitive Marker notwendig. Möglicherweise könnte der IL-8-Spiegel als Screeningparameter im Serum oder Speichel bestimmt werden, was die Wechselwirkung der Tumorzellen mit dem NF- κ B-induzierenden TME anzeigen könnte^{156,235}.

4.4.3 Gefahren NF- κ B-targetierender Tumorthérapien

Trotz aller positiven Aspekte muss auch die Kehrseite antiinflammatorischer Therapiekonzepte berücksichtigt werden. Die systemische Immunsuppression durch Inhibition des NF- κ B pathways hätte aufgrund seines ubiquitären Vorkommens massive Nebenwirkungen zur Folge. Beschrieben sind u. a. hepatotoxische Effekte, Embryopathien und opportunistische Infektionen^{236,237}. Eine entscheidende Nebenwirkung der Langzeit-IKK β -Hemmung ist die ausgeprägte Fähigkeit von NF- κ B-Inhibitoren durch exzessive Aktivierung des Inflammasoms die IL-1 β -Freisetzung bei bakteriellen Infektionen zu verstärken. Dies würde zum septischen Schock mit Organversagen und dem acute respiratory distress syndrome führen²³⁸. Um dies zu vermeiden, wäre die zeitlich begrenzte Applikation unter antibiotischer Abschirmung und Hospitalisierung angezeigt²³⁴. Da bislang kaum klinische Studien zu den untersuchten Wirkstoffen durchgeführt wurden, bleibt es offen, ob diese ebenfalls zu diesem Nebenwirkungsprofil führen. Eine Phase-I-

Studie von MLN4924 an soliden Tumoren ergab vielversprechende Ergebnisse, jedoch auf Kosten hoher Nebenwirkungen²³⁹. Von daher sind weitere Studien indiziert, um Vor- und Nachteile dieser Wirkstoffe in Mono- und adjuvanten Kombinationstherapien sowie die erforderlichen Konzentrationen und deren Pharmakologie zu überprüfen. Letztlich könnte es durch die selektive Inhibition spezifischer NF- κ B-Proteine bzw. -Untereinheiten, wie dem beim HNSCC überaktivierten IKK β , möglich sein, die Toxizität von Systemtherapien zu minimieren. Durch Synergieeffekte könnte zudem die Therapiesensitivität des HNSCC gesteigert werden. Außerdem müssen für eine effektive Therapie die Wechselwirkungen mit dem inflammatorischen TME mitbetrachtet werden, da diese durch parakrines signaling möglicherweise den zentralen Induktor des NF- κ B pathways darstellen, weshalb sie im Mittelpunkt weiterer Forschungen stehen sollten. Bemühungen, die dichotomen Eigenschaften von NF- κ B als molekularem Hauptschalter diverser Signalwege vollständig zu verstehen, könnten zur Entwicklung neuer Therapien beitragen. Künftige Immuntherapien müssen alle Aspekte der Karzinogenese, wie der Tumorpromotion, berücksichtigen, um die infausten Prognosen von HNSCC-Patienten entscheidend zu verbessern. Wie *Prescott und Cook* kritisch reviewten, sind noch viele Gesichtspunkte der Wirksamkeiten und Wechselwirkungen von NF- κ B-pathway- bzw. IKK β -Inhibitoren zu klären, bevor diese in die klinische Tumortherapie Einzug halten können²²⁵.

Würde es gelingen, Wirkstoffe bzw. Kombinationstherapien zu entwickeln, die zielgerichtet Tumorzellen und proinflammatorische Wechselwirkungen mit dem TME adressieren, ohne die Immunantwort systemisch zu supprimieren, könnte der Tumor in Schach gehalten und somit die Letalität von Krebserkrankungen durch Tumorprogression und Metastasierung gesenkt werden. Die Erkenntnisse der vorgelegten Arbeit zur zielgerichteten NF- κ B-pathway-Inhibition durch den Wirkstoff TPCA-1 könnten möglicherweise hierzu einen bescheidenen Beitrag geleistet haben.

5 Zusammenfassung

Entzündliche Prozesse stellen einen zentralen Aspekt der Karzinogenese dar und können sowohl zur Induktion als auch zum Progress von Tumoren beitragen. Der NF- κ B-Signalweg ist einer der wichtigsten Signaltransduktionswege der Inflammation und Tumorpromotion, was ihn zur plausiblen Zielstruktur für die prospektive klinische Tumorthherapie machen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften von vier unterschiedlich targetierenden NF- κ B-pathway-Inhibitoren – Cortisol, MLN4924, QNZ und TPCA1 – auf die Inflammation, Zellproliferation und proapoptotische Sensitivierung am *in vitro* Modell des HNSCC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Auswahl des Inhibitors bzw. seines targets entscheidend für den wirkungsvollen Einsatz dieser Wirkstoffgruppe in der antiproliferativen Therapie des HNSCC zu sein scheint. Beispielsweise vermittelte MLN4924 die Freisetzung von IL-8. Cortisol bewirkte die Resistenz der FasL-induzierten Apoptose von HNSCC-Zellen. QNZ wirkte in einigen Zelllinien antiproliferativ und sensitivierend für den FasL-induzierten Zelltod, beeinflusste jedoch in diesem Zusammenhang kontraproduktiv die IL-8-Sekretion. Dies disqualifizierte diese Wirkstoffe für die Anwendung in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. Dahingegen qualifizierte sich TPCA-1 aufgrund folgender Eigenschaften als geeigneter Wirkstoff für den prospektiven klinischen Einsatz:

- 1) TPCA-1 wirkte antiproliferativ,
- 2) hemmte die TNF- α -induzierte Inflammation,
- 3) regulierte die IL-8-Expression herab,
- 4) wirkte sensitivierend für den TNF- α -induzierten Zelltod,
- 5) interferierte kaum mit der FasL-vermittelten Apoptose und
- 6) induzierte Apoptose.

6 Literaturverzeichnis

1. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2014;26(2):123-141. doi:10.1016/j.coms.2014.01.001.
2. Krisanaprakornkit S, Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncol*. 2012;2012:681469.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.
4. Robert Koch-Institut. Bericht vom Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg) Berlin, 2016.
5. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.
6. Coordes A et al. Role of miRNA in Malignoma of Head and Neck. *Laryngo-Rhino-Otol* 2014; 93: 201–210.
7. Le Campion A, Ribeiro CMB, Luiz RR, da Silva Junior FF, Barros HCS, Dos Santos KCB et al. Low Survival Rates of Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Dent*. 2017;2017:5815493.
8. Horch HH. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. 4. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2007. ISBN 978-3-437-05417-4.
9. Schwenzer N. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme-Verlag; 2010. ISBN 978-3-13-593504-1.
10. DGZMK. S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. In: AWMF online (Stand September 2012).
11. Lubin JH, Purdue M, Kelsey K, Zhang ZF, Winn D, Wei Q, et al. Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2009;170(8):937-47.
12. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6(5):963-8.
13. Garbuglia AR. Human papillomavirus in head and neck cancer. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1705-26.
14. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):309-16.
15. Hougeir FG, Yiannias JA, Hinni ML, Hentz JG, el-Azhary RA. Oral metal contact allergy: a pilot study on the cause of oral squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol*. 2006;45(3):265-71.
16. Hiddemann W. *Die Onkologie*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010. ISBN 978-3-540-79724-1.
17. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72(3 Suppl):962-70.

VI. Literaturverzeichnis

18. Foulds L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.* 1954;14(5):327-39.
19. Hennings H, Glick AB, Greenhalgh DA, Morgan DL, Strickland JE, Tennenbaum T, et al. Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1993;202(1):1-8.
20. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017;23(10):1124-34.
21. Vinay Kumar: Robbins Basic Pathology. 10. Auflage. Elsevier, Philadelphia, 2018. ISBN 978-0-323-35317-5.
22. Cognetti DM, Weber RS, Lai SY. Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer.* 2008;113(7 Suppl):1911-32.
23. Backes C, Bier H, Knopf A. Therapeutic implications of tumor free margins in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(48):84320-8.
24. Jones AS, Phillips DE, Helliwell TR, Roland NJ. Occult node metastases in head and neck squamous carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993;250(8):446-9.
25. Pimenta Amaral TM, Da Silva Freire AR, Carvalho AL, Pinto CA, Kowalski LP. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncol.* 2004;40(8):780-6.
26. Semrau R, Fietkau R, Werner JA, Mueller RP (2007) Radiochemotherapie als Behandlungsstandard fortgeschrittener Kopf-Hals-Karzinome. *Onkologe* 13:165–173.
27. Semrau R. The Role of Radiotherapy in the Definitive and Postoperative Treatment of Advanced Head and Neck Cancer. *Oncol Res Treat.* 2017;40(6):347-52.
28. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(17):1695-704.
29. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkquist E, Gorbounova V, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(17):1705-15.
30. Munker R, Wollenberg B, Schalhorn A. Grundzüge der Chemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren. In: Wollenberg B, Zimmermann F (Hrsg.) Klinik des Rezidivtumors im Kopf-Hals-Bereich. München: Zuckschwerdt Verlag; 2003. ISBN 978-3-86371-134-4.
31. Vogl SE, Schoenfeld DA, Kaplan BH, Lerner HJ, Engstrom PF, Horton J. A randomized prospective comparison of methotrexate with a combination of methotrexate, bleomycin, and cisplatin in head and neck cancer. *Cancer.* 1985;56(3):432-42.
32. Velez-Garcia E, Sridhar KS, Knight W, Hochster H, et al. A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 1992;10(2):257-63.
33. Forastiere AA, Metch B, Schuller DE, Ensley JF, Hutchins LF, Triozzi P, et al. Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1992;10(8):1245-51.
34. Vega-Stromberg T. Chemotherapy-induced secondary malignancies. *J Infus Nurs.* 2003;26(6):353-61.

VI. Literaturverzeichnis

35. Blagosklonny MV. Analysis of FDA approved anticancer drugs reveals the future of cancer therapy. *Cell Cycle*. 2004;3(8):1035-42.
36. Green MR. Targeting targeted therapy. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2191-3.
37. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol*. 1993;11(10):1873-8.
38. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(11):1116-27.
39. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*. 2010;11(1):21-8.
40. Saba NF, Mody MD, Tan ES, Gill HS, Rinaldo A, Takes RP, et al. Toxicities of systemic agents in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN); A new perspective in the era of immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;115:50-8.
41. Price KA, Cohen EE. Current treatment options for metastatic head and neck cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2012;13(1):35-46.
42. Raulf N, El-Attar R, Kulms D, Lecis D, Delia D, Walczak H, et al. Differential response of head and neck cancer cell lines to TRAIL or Smac mimetics is associated with the cellular levels and activity of caspase-8 and caspase-10. *Br J Cancer*. 2014;111(10):1955-64.
43. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3293-304.
44. Moy JD, Moskovitz JM, Ferris RL. Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2017;76:152-66.
45. Ribas A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2517-9.
46. Schwab KS, Kristiansen G, Schild HH, Held SEA, Heine A, Brossart P. Successful Treatment of Refractory Squamous Cell Cancer of the Head and Neck with Nivolumab and Ipilimumab. *Case Rep Oncol*. 2018;11(1):17-20.
47. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1909;5:273–90.
48. Martinez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res*. 2015;21(22):5047-56.
49. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1-27.
50. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982;55(3-4):329-33.
51. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.

52. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev.* 1989;47(1):23-5.
53. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
54. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014:149185.
55. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.* 2004;6(3):203-8.
56. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a000034.
57. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med.* 2006;4:48.
58. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999;5(6):1369-79.
59. Jain A, Kaczanowska S, Davila E. IL-1 Receptor-Associated Kinase Signaling and Its Role in Inflammation, Cancer Progression, and Therapy Resistance. *Front Immunol.* 2014;5:553.
60. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* 2016;37(9):11553-72.
61. Mann EA, Spiro JD, Chen LL, Kreutzer DL. Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg.* 1992;164(6):567-73.
62. Chan LP, Wang LF, Chiang FY, Lee KW, Kuo PL, Liang CH. IL-8 promotes HNSCC progression on CXCR1/2-mediated NOD1/RIP2 signaling pathway. *Oncotarget.* 2016;7(38):61820-31.
63. Jones VS, Huang RY, Chen LP, Chen ZS, Fu L, Huang RP. Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1865(2):255-65.
64. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 23):5591-6.
65. Limoge M, Safina A, Beattie A, Kapus L, Truskinovsky AM, Bakin AV. Tumor-fibroblast interactions stimulate tumor vascularization by enhancing cytokine-driven production of MMP9 by tumor cells. *Oncotarget.* 2017;8(22):35592-608.
66. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell.* 2010;17(2):135-47.
67. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009;30(7):1073-81.
68. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986;46(5):705-16.

69. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 2012;26(3):203-34.
70. Dondelinger Y, Darding M, Bertrand MJ, Walczak H. Poly-ubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11-12):2165-76.
71. Sun SC. The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(9):545-58.
72. Brown KD, Claudio E, Siebenlist U. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):212.
73. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2001;107(2):135-42.
74. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 2004;118(3):285-96.
75. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004;431(7007):461-6.
76. Taniguchi K, Karin M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(5):309-24.
77. Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 2010;102(4):639-44.
78. Jackson-Bernitsas DG, Ichikawa H, Takada Y, Myers JN, Lin XL, Darnay BG, et al. Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2007;26(10):1385-97.
79. Bonomi M, Patsias A, Posner M, Sikora A. The role of inflammation in head and neck cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;816:107-27.
80. Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome. *N Engl J Med.* 2011;364(19):1844-54.
81. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):749-59.
82. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001;107(3):241-6.
83. Godwin P, Baird AM, Heavey S, Barr MP, O'Byrne KJ, Gately K. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front Oncol.* 2013;3:120.
84. Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, Lai GM, Liao CM, Gao M, et al. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(9):1709-16.
85. Heyninck K, Beyaert R. Crosstalk between NF-kappaB-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2001;4(5):259-65.

86. Au PY, Yeh WC. Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv Exp Med Biol.* 2007;597:32-47.
87. Naude PJ, den Boer JA, Luiten PG, Eisel UL. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J.* 2011;278(6):888-98.
88. Dondelinger Y, Aguilera MA, Goossens V, Dubuisson C, Grootjans S, Dejardin E, et al. RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. *Cell Death Differ.* 2013;20(10):1381-92.
89. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature.* 2015;517(7534):311-20.
90. Han J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol.* 2011;12(12):1143-9.
91. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science.* 2002;296(5573):1634-5.
92. Bai L, Smith DC, Wang S. Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2014;144(1):82-95.
93. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
94. Heinrich PC. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage. Berlin: Springer-Verlag; 2014. ISBN 978-3-642-17971-6.
95. Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:337-56.
96. Derakhshan A, Chen Z, Van Waes C. Therapeutic Small Molecules Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Cancers with Deregulation of Extrinsic and Intrinsic Cell Death Pathways. *Clin Cancer Res.* 2017;23(6):1379-87.
97. Li C, Egloff AM, Sen M, Grandis JR, Johnson DE. Caspase-8 mutations in head and neck cancer confer resistance to death receptor-mediated apoptosis and enhance migration, invasion, and tumor growth. *Mol Oncol.* 2014;8(7):1220-30.
98. Henry CM, Martin SJ. Caspase-8 Acts in a Non-enzymatic Role as a Scaffold for Assembly of a Pro-inflammatory "FADDosome" Complex upon TRAIL Stimulation. *Mol Cell.* 2017;65(4):715-29 e5.
99. Safa AR. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncol.* 2012;34(3):176-84.
100. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science.* 1996;274(5288):784-7.
101. Erstad DJ, Cusack JC, Jr. Targeting the NF-kappaB pathway in cancer therapy. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013;22(4):705-46.
102. Gruver-Yates AL, Cidlowski JA. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells.* 2013;2(2):202-23.
103. Belz K, Schoeneberger H, Wehner S, Weigert A, Bonig H, Klingebiel T, et al. Smac mimetic and glucocorticoids synergize to induce apoptosis in childhood ALL by promoting ripoptosome assembly. *Blood.* 2014;124(2):240-50.

104. Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*. 2009;458(7239):732-6.
105. Lan H, Tang Z, Jin H, Sun Y. Neddylation inhibitor MLN4924 suppresses growth and migration of human gastric cancer cells. *Sci Rep*. 2016;6:24218.
106. Rauert-Wunderlich H, Siegmund D, Maier E, Giner T, Bargou RC, Wajant H, et al. The IKK inhibitor Bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NFkappaB transcription factors. *PLoS One*. 2013;8(3):e59292.
107. Godbersen JC, Humphries LA, Danilova OV, Kebbekus PE, Brown JR, Eastman A, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 thwarts microenvironment-driven NF-kappaB activation and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Clin Cancer Res*. 2014;20(6):1576-89.
108. Wang Y, Luo Z, Pan Y, Wang W, Zhou X, Jeong LS, et al. Targeting protein neddylation with an NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induced apoptosis or senescence in human lymphoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(3):420-9.
109. Vanderdys V, Allak A, Guessous F, Benamar M, Read PW, Jameson MJ, et al. The Neddylation Inhibitor Pevonedistat (MLN4924) Suppresses and Radiosensitizes Head and Neck Squamous Carcinoma Cells and Tumors. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(2):368-80.
110. Zhao L, Yue P, Lonial S, Khuri FR, Sun SY. The NEDD8-activating enzyme inhibitor, MLN4924, cooperates with TRAIL to augment apoptosis through facilitating c-FLIP degradation in head and neck cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(12):2415-25.
111. Tobe M, Isobe Y, Tomizawa H, Nagasaki T, Takahashi H, Hayashi H. A novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation: structure-activity relationships and biological facts of 6-aminoquinazoline derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2003;11(18):3869-78.
112. Tobe M, Isobe Y, Tomizawa H, Nagasaki T, Takahashi H, Fukazawa T, et al. Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation. *Bioorg Med Chem*. 2003;11(3):383-91.
113. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Van de Leur E, Lehnen E, Liedtke C, Weiskirchen R. NLRP3 inflammasome expression is driven by NF-kappaB in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458(3):700-6.
114. Liu YC, Wu RH, Wang WS. Regorafenib diminishes the expression and secretion of angiogenesis and metastasis associated proteins and inhibits cell invasion via NF-kappaB inactivation in SK-Hep1 cells. *Oncol Lett*. 2017;14(1):461-7.
115. Yen TH, Hsieh CL, Liu TT, Huang CS, Chen YC, Chuang YC, et al. Amentoflavone Induces Apoptosis and Inhibits NF-kB-modulated Anti-apoptotic Signaling in Glioblastoma Cells. *In Vivo*. 2018;32(2):279-85.
116. Siveen KS, Sikka S, Surana R, Dai X, Zhang J, Kumar AP, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(2):136-54.
117. Nan J, Du Y, Chen X, Bai Q, Wang Y, Zhang X, et al. TPCA-1 is a direct dual inhibitor of STAT3 and NF-kappaB and regresses mutant EGFR-associated human non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(3):617-29.

118. Podolin PL, Callahan JF, Bolognese BJ, Li YH, Carlson K, Davis TG, et al. Attenuation of murine collagen-induced arthritis by a novel, potent, selective small molecule inhibitor of I κ B Kinase 2, TPCA-1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophene-carboxamide), occurs via reduction of proinflammatory cytokines and antigen-induced T cell Proliferation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(1):373-81.
119. Lagler C, El-Mesery M, Kübler AC, Müller-Richter UDA, Stühmer T, Nickel J, Müller TD, Wajant H, Seher A. The anti-myeloma activity of bone morphogenetic protein 2 predominantly relies on the induction of growth arrest and is apoptosis-independent. *Hsieh Y-H, ed. PLoS ONE.* 2017;12(10):e0185720.
120. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2017 Jul;18(7):40.
121. Heo DS, Snyderman C, Gollin SM, Pan S, Walker E, Deka R, Barnes EL, Johnson JT, Herberman RB, Whiteside TL. Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.* 1989 Sep 15;49(18):5167-75.
122. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur.* 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2011, ISBN 3-8274-2572-7.
123. Roche Innovatis AG. CASY® Cell Counter + Analyser System Model TT Operator Manual. Version 2.3E
124. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 1986 Nov 15;159(1):109-13.
125. Noeske K. Die Bindung von Kristallviolett an Desoxyribonukleinsäure Cytophotometrische Untersuchungen an normalen und Tumorzellkernen. *Histochemie* September 1966, Volume 7, Issue 3, pp 273-287.
126. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Apr 1;2016(4):pdb.prot087379.
127. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971 Sep;8(9):871-4.
128. Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 1971 Jun 24;15(3):232-236.
129. Stanker LH, Hnasko RM. A Double-Sandwich ELISA for Identification of Monoclonal Antibodies Suitable for Sandwich Immunoassays. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:69-78.
130. Monika Jansohn, Sophie Rothhämel (Hrsg.): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5. Aufl. 2012. Spektrum Akademischer Verlag. ISBN: 978-3-8274-2429-7.
131. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1979;76(2):615-619.
132. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology.* 1990;28(3):495-503.
133. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2010;(45):2565.

134. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 1999 Oct 8;75(2-3):291-5.
135. Herzenberg LA, Sweet RG. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am.* 1976 Mar;234(3):108-17.
136. Göhde W, Dittrich W. Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium. Patent DE1815353, 1975.
137. Shuler ML, Aris R, Tsuchiya HM. Hydrodynamic focusing and electronic cell-sizing techniques. *Appl Microbiol.* 1972 Sep;24(3):384-8.
138. Radbruch A. *Flow Cytometry and Cell Sorting.* Berlin: Springer-Verlag; 2000. ISBN 978-3-540-65630-2.
139. Loken MR, Sweet RG, Herzenberg LA. Cell discrimination by multiangle light scattering. *J Histochem Cytochem.* 1976 Jan;24(1):284-91.
140. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207, 1992.
141. Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol.* 1998;33(6):525-33.
142. Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Dalglish AG, Gibson FM. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood.* 1996 Mar 15;87(6):2244-51.
143. Robertson BR, Button DK, Koch AL (1998) Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 64: 3900–3909.
144. Longobardi Givan A. *Flow Cytometry: First Principles.* 2. Auflage. Hoboken: Wiley-Liss; 2001. ISBN 0-471-38224-8.
145. Rasmussen R: Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, and Nakagawara, K, eds. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications.* Springer Press, Heidelberg (2001). ISBN 3-540- 66736-9, 21-34.
146. Kück U. *Praktikum der Molekulargenetik.* Heidelberg: Springer-Verlag. 2005. ISBN: 3-540-21166-7.
147. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 2001;29(9):e45.
148. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIO-Spektrum* 2004; 1/2004: 92-95.
149. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
150. Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik.* 6. Auflage. Springer-Verlag, Berlin 2013, ISBN 978-3-642-34260-8.
151. Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain.* 2002 Jul;98(1-2):163-8.

152. Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, et al. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog.* 1999;26(2):119-29.
153. Wolf JS, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Bancroft CC, Capo DE, et al. IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1812-20.
154. Chan LP, Liu C, Chiang FY, Wang LF, Lee KW, Chen WT, et al. IL-8 promotes inflammatory mediators and stimulates activation of p38 MAPK/ERK-NF-kappaB pathway and reduction of JNK in HNSCC. *Oncotarget.* 2017;8(34):56375-88.
155. Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;31:61-71.
156. St. John MAR, Li Y, Zhou X, et al. Interleukin 6 and Interleukin 8 as Potential Biomarkers for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(8):929-935.
157. Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, et al. Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(4):664-72.
158. Ren Q, Kari C, Quadros MR, Burd R, McCue P, Dicker AP, et al. Malignant transformation of immortalized HaCaT keratinocytes through deregulated nuclear factor kappaB signaling. *Cancer Res.* 2006;66(10):5209-15.
159. Jia D, Li L, Andrew S, Allan D, Li X, Lee J, et al. An autocrine inflammatory forward-feedback loop after chemotherapy withdrawal facilitates the repopulation of drug-resistant breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 2017;8(7):e2932.
160. Lin S, Shang Z, Li S, Gao P, Zhang Y, Hou S, et al. Neddylation inhibitor MLN4924 induces G2 cell cycle arrest, DNA damage and sensitizes esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *Oncol Lett.* 2018;15(2):2583-9.
161. Cohen RF, Contrino J, Spiro JD, Mann EA, Chen LL, Kreutzer DL. Interleukin-8 expression by head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;121(2):202-9.
162. Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol.* 2000;15(4):1303-25.
163. Varfolomeev EE, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell.* 2004;116(4):491-7.
164. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 2001;21(12):3964-73.
165. Anany MA, Kreckel J, Fullsack S, Rosenthal A, Otto C, Siegmund D, et al. Soluble TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances poly(I:C)-induced RIPK1-mediated necroptosis. *Cell Death Dis.* 2018;9(11):1084.
166. Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A. Cycloheximide-mediated sensitization to TNF-alpha-induced apoptosis in human colorectal cancer cell line COLO 205; role of FLIP and metabolic inhibitors. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56 Suppl 3:101-18.

167. El-Mesery M, Seher A, Stuhmer T, Siegmund D, Wajant H. MLN4924 sensitizes monocytes and maturing dendritic cells for TNF-dependent and -independent necroptosis. *Br J Pharmacol.* 2015;172(5):1222-36.
168. Derakhshan A, Chen Z, Van Waes C. Therapeutic Small Molecules Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Cancers with Deregulation of Extrinsic and Intrinsic Cell Death Pathways. *Clin Cancer Res.* 2017;23(6):1379-87.
169. Chen YK, Huse SS, Lin LM. Expression of inhibitor of apoptosis family proteins in human oral squamous cell carcinogenesis. *Head Neck.* 2011;33(7):985-98.
170. Brands RC, Herbst F, Hartmann S, Seher A, Linz C, Kübler AC, et al. Cytotoxic effects of SMAC-mimetic compound LCL161 in head and neck cancer cell lines. *Clin Oral Investig.* 2016;20(9):2325-32.
171. Brands RC, Scheurer MJJ, Hartmann S, Seher A, Kübler AC, Müller-Richter UDA. Apoptosis-sensitizing activity of birinapant in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Lett.* 2018;15(3):4010-6.
172. Scheurer MJJ, Seher A, Steinacker V, Linz C, Hartmann S, Kübler AC, et al. Targeting inhibitors of apoptosis in oral squamous cell carcinoma in vitro. *J Craniomaxillofac Surg.* 2019;47(10):1589-99.
173. Brands RC, Scheurer MJJ, Hartmann S, Seher A, Freudlsperger C, Moratin J, Hoffmann J, Kübler AC, Müller-Richter UDA. Sensitization to apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020.
174. Azizi M, Ghourchian H, Yazdian F, Bagherifam S, Bekhradnia S, Nyström B. Anti-cancerous effect of albumin coated silver nanoparticles on MDA-MB 231 human breast cancer cell line. *Sci Rep.* 2017 Jul 12;7(1):5178.
175. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-7.
176. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539-45.
177. Mantovani A. Effects on in vitro tumor growth of murine macrophages isolated from sarcoma lines differing in immunogenicity and metastasizing capacity. *Int J Cancer.* 1978;22(6):741-6.
178. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med.* 1999;5(7):828-31.
179. Bertazza L, Mocellin S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Curr Med Chem.* 2010;17(29):3337-52.
180. Sandra F, Matsuki NA, Takeuchi H, Ikebe T, Kanematsu T, Ohishi M, et al. TNF inhibited the apoptosis by activation of Akt serine/threonine kinase in the human head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Signal.* 2002;14(9):771-8.
181. Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ.* 2009;49:1-15.
182. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-63.

183. Nakano Y, Kobayashi W, Sugai S, Kimura H, Yagihashi S. Expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90(8):858-66.
184. von Biberstein SE, Spiro JD, Lindquist R, Kreutzer DL. Enhanced tumor cell expression of tumor necrosis factor receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg.* 1995;170(5):416-22.
185. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999;5(6):1369-79.
186. Woods KV, El-Naggar A, Clayman GL, Grimm EA. Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens. *Cancer Res.* 1998;58(14):3132-41.
187. Duffey DC, Crowl-Bancroft CV, Chen Z, Ondrey FG, Nejad-Sattari M, Dong G, et al. Inhibition of transcription factor nuclear factor-kappaB by a mutant inhibitor-kappaBalpha attenuates resistance of human head and neck squamous cell carcinoma to TNF-alpha caspase-mediated cell death. *Br J Cancer.* 2000;83(10):1367-74.
188. Aderka D, Englemann H, Hornik V, Skornick Y, Levo Y, Wallach D, et al. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res.* 1991;51(20):5602-7.
189. Su TR, Chang KL, Lee CH, Chen CH, Yang YH, Shieh TY. Expression of tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in betel-quit-chewing patients at different stages of treatment for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2004;40(8):804-10.
190. Reers S, Pfannerstill AC, Rades D, Maushagen R, Andratschke M, Pries R, et al. Cytokine changes in response to radio-/chemotherapeutic treatment in head and neck cancer. *Anticancer Res.* 2013;33(6):2481-9.
191. Pries R, Thiel A, Brocks C, Wollenberg B. Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo.* 2006;20(1):45-8.
192. Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene.* 2011;30(14):1615-30.
193. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):p11.
194. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-4.
195. Karin M. The I kappa B kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res.* 2008;18(3):334-42.
196. Li Z, Yang Z, Lapidus RG, Liu X, Cullen KJ, Dan HC. IKK phosphorylation of NF-kappaB at serine 536 contributes to acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell cancer. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):3098-110.
197. Li Z, Liao J, Yang Z, Choi EY, Lapidus RG, Liu X, et al. Co-targeting EGFR and IKKbeta/NF-kappaB signalling pathways in head and neck squamous cell carcinoma: a

- potential novel therapy for head and neck squamous cell cancer. *Br J Cancer*. 2019;120(3):306-16.
198. Israel A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(3):a000158.
199. Li Z, Yang Z, Passaniti A, Lapidus RG, Liu X, Cullen KJ, et al. A positive feedback loop involving EGFR/Akt/mTORC1 and IKK/NF-kB regulates head and neck squamous cell carcinoma proliferation. *Oncotarget*. 2016;7(22):31892-906.
200. Thurnher D, Bakroeva M, Formanek M, Knerer B, Kornfehl J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit telomerase activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Head Neck*. 2001;23(12):1049-55.
201. Thurnher D, Bakroeva M, Schutz G, Pelzmann M, Formanek M, Knerer B, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol*. 2001;121(8):957-62.
202. Pufall MA. Glucocorticoids and Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2015;872:315-33.
203. Lin KT, Wang LH. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. *Steroids*. 2016;111:84-8.
204. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 1995;270(5234):286-90.
205. Chan LP, Wang LF, Chiang FY, Lee KW, Kuo PL, Liang CH. IL-8 promotes HNSCC progression on CXCR1/2-mediated NOD1/RIP2 signaling pathway. *Oncotarget*. 2016;7(38):61820-31.
206. Chan LP, Liu C, Chiang FY, Wang LF, Lee KW, Chen WT, et al. IL-8 promotes inflammatory mediators and stimulates activation of p38 MAPK/ERK-NF-kappaB pathway and reduction of JNK in HNSCC. *Oncotarget*. 2017;8(34):56375-88.
207. Zhang W, Liang Y, Li L, Wang X, Yan Z, Dong C, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 (TAK-924/Pevonedistat) induces apoptosis via c-Myc-Noxa axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Prolif*. 2018:e12536.
208. Gross ND, Boyle JO, Du B, Kekatpure VD, Lantowski A, Thaler HT, et al. Inhibition of Jun NH2-terminal kinases suppresses the growth of experimental head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(19):5910-7.
209. Wolf JS, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Bancroft CC, Capo DE, et al. IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2001;7(6):1812-20.
210. Vigont, V.A., Zimina, O.A., Glushankova, L.N. et al. Store-operated calcium entry into SK-N-SH human neuroblastoma cells modeling huntington's disease. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A* (2012) 6: 206.
211. Wu J, Shih HP, Vigont V, Hrdlicka L, Diggins L, Singh C, et al. Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment. *Chem Biol*. 2011;18(6):777-93.

212. Choi S, Kim JH, Roh EJ, Ko MJ, Jung JE, Kim HJ. Nuclear factor-kappaB activated by capacitative Ca²⁺ entry enhances muscarinic receptor-mediated soluble amyloid precursor protein (sAPPalpha) release in SH-SY5Y cells. *J Biol Chem.* 2006;281(18):12722-8.
213. Pozzobon T, Facchinello N, Bossi F, Capitani N, Benagiano M, Di Benedetto G, et al. *Treponema pallidum* (syphilis) antigen TpF1 induces angiogenesis through the activation of the IL-8 pathway. *Sci Rep.* 2016;6:18785.
214. Shi H, Li Y, Ren X, Zhang Y, Yang Z, Qi C. A novel quinazoline-based analog induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human A549 lung cancer cells via a ROS-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;486(2):314-20.
215. Tsai JJ, Pan PJ, Hsu FT. Regorafenib induces extrinsic and intrinsic apoptosis through inhibition of ERK/NF-kappaB activation in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2017;37(2):1036-44.
216. Wang J, Wang S, Zhang W, Wang X, Liu X, Liu L, et al. Targeting neddylation pathway with MLN4924 (Pevonedistat) induces NOXA-dependent apoptosis in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;490(4):1183-8.
217. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science.* 2011;333(6046):1157-60.
218. Zhang J, Spath SS, Marjani SL, Zhang W, Pan X. Characterization of cancer genomic heterogeneity by next-generation sequencing advances precision medicine in cancer treatment. *Precis Clin Med.* 2018;1(1):29-48.
219. Roychowdhury S, Iyer MK, Robinson DR, Lonigro RJ, Wu YM, Cao X, et al. Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. *Sci Transl Med.* 2011;3(111):111ra21.
220. Stadler ME, Patel MR, Couch ME, Hayes DN. Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008;22(6):1099-124, vii.
221. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet.* 2011;377(9759):31-41.
222. Hedberg ML, Peyser ND, Bauman JE, Gooding WE, Li H, Bholra NE, et al. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs predicts improved patient survival for PIK3CA-altered head and neck cancer. *J Exp Med.* 2019;216(2):419-27.
223. Mousseau G, Mediouni S, Valente ST. Targeting HIV transcription: the quest for a functional cure. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;389:121-45.
224. Matta A, Ralhan R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol.* 2009;1:6.
225. Prescott JA, Cook SJ. Targeting IKKbeta in Cancer: Challenges and Opportunities for the Therapeutic Utilisation of IKKbeta Inhibitors. *Cells.* 2018;7(9).
226. Takahashi H, Sakakura K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Toyoda M, Nishiyama M, et al. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(11):1407-17.
227. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(1):71-8.

228. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol.* 2014;41(2):217-34.
229. Scherzad A, Steber M, Gehrke T, Rak K, Froelich K, Schendzielorz P, et al. Human mesenchymal stem cells enhance cancer cell proliferation via IL-6 secretion and activation of ERK1/2. *Int J Oncol.* 2015;47(1):391-7.
230. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-99.
231. Eytan DF, Snow GE, Carlson SG, Schiltz S, Chen Z, Van Waes C. Combination effects of SMAC mimetic birinapant with TNFalpha, TRAIL, and docetaxel in preclinical models of HNSCC. *Laryngoscope.* 2015;125(3):E118-24.
232. Ren Q, Kari C, Quadros MR, Burd R, McCue P, Dicker AP, et al. Malignant transformation of immortalized HaCaT keratinocytes through deregulated nuclear factor kappaB signaling. *Cancer Res.* 2006;66(10):5209-15.
233. Ren X, Xu Z, Myers JN, Wu X. Bypass NFkappaB-mediated survival pathways by TRAIL and Smac. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(7):1031-5.
234. Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(1):33-40.
235. Dahiya K, Dhankhar R. Updated overview of current biomarkers in head and neck carcinoma. *World J Methodol.* 2016;6(1):77-86.
236. Wolenski FS, Fisher CD, Sano T, Wyllie SD, Cicia LA, Gallacher MJ, et al. The NAE inhibitor pevonedistat (MLN4924) synergizes with TNF-alpha to activate apoptosis. *Cell Death Discov.* 2015;1:15034.
237. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):725-34.
238. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell.* 2007;130(5):918-31.
239. Lockhart AC, Bauer TM, Aggarwal C, Lee CB, Harvey RD, Cohen RB, et al. Phase Ib study of pevonedistat, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, in combination with docetaxel, carboplatin and paclitaxel, or gemcitabine, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2018.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
Akt	AKR thymoma
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ASS	Acetylsalicylsäure
BAFF-R	B-cell activating factor receptor
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BG	Background
BH	Bcl-2 homology
Bspw.	Beispielsweise
Caspase	Cysteinyln-aspartate specific protease
CD40	Cluster of differentiation 40
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	Complementary DNA
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
c-FLIP	Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein
CHX	Cycloheximid
clAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein
Cis	Carcinoma in situ
CRL	Cullin-RING-ligase
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
Ct-Wert	Cycle threshold
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8 (bzw. IL-8)
CXCR	Chemokine receptor
CYLD	Cylindromatosis tumor suppressor protein
DD	Death domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxynukleinsäure
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain
Fas	FS7-associated cell surface antigen
FasL	Fas Ligand
FC	Fold change
FL2-H	Fluorescent channel 2-height
Fn14	Fibroblast growth factor-inducible factor 14
FSC-H	Forward scatter height

VI. Literaturverzeichnis

GC	Glucocorticoid
Gy	Gray
HaCaT	Human adult low calcium high temperature keratinocyte cells
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
IC ₁₀	Inhibitory concentration of 10 %
IC ₁₀₀	Maximum inhibitory concentration
I κ B	Inhibitor of kappa B
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IgG1	Immunglobulin G1
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LL	Lower left
LR	Lower right
LT β R	Lymphotoxin- β receptor
LUBAC	Linear ubiquitin chain assembly complex
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL-1	Myeloid cell leukemia 1
MHC	Major histocompatibility complex
MLKL	Mixed-lineage kinase domain-like protein
MLN4924	Inhibitor des NF- κ B pathways (bzw. Pevonedistat)
MMP	Matrix-Metalloprotease
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert
NAE	NEDD8 activating enzyme
NEDD8	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8
NEMO	NF- κ B essential modifier
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIK	NF- κ B-inducing kinase
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OD	Optical density
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
pI κ B α	Phospho-I κ B α
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
QNZ	N4-[2-(4-Phenoxyphenyl)Ethyl] Quinazolin-4,6-Diamin
RANK	Receptor activator of NF- κ B
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom
RHD	Rel homology domain
RIP2	Receptor-interacting protein 2

RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Reverse-transcription quantitative real-time polymerase chain reaction
RFU	Relative fluorescence units
SCF	Skp, Cullin, F-box containing
SD	Standardabweichung
sELISA	Sandwich-ELISA
SODD	Silencer of death domain
SMAC/Diablo	Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI
SSC-H	Side scatter height
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STABW	Standardabweichung
TAB	TAK1-binding protein
TAF	Tumor-associated fibroblasts
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TAM	Tumor-associated macrophages
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TME	Tumor microenvironment (bzw. Tumormikroumgebung)
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor
TPCA-1	2-[(Aminocarbonyl)amino]-5-(4-Fluorophenyl)-3-Thiophencarboxamid
TPF	Docetaxel, Cisplatin, 5-Fluorouracil
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAILR	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	Tumor stem cell
TWEAK	TNF-like weak inducer of apoptosis
Ub	Ubiquitin
UL	Upper left
UR	Upper right
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten
2-JÜR	2-Jahres-Überlebensrate
5-FU	5-Fluorouracil
7-AAD	7-Aminoactinomycin

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema des klassischen pathways.	8
Abb. 2: Schema des alternativen pathways.	10
Abb. 3: Der TNF- α – NF- κ B – Interleukin-Loop.	12
Abb. 4: Übersicht der Signaltransduktionen ausgehend von TNF-R.	14
Abb. 5: Signalwege der Apoptose.	16
Abb. 6: Positivkontrolle der TNF- α -sELISA.	29
Abb. 7: Lineare Regressionsanalyse zur Bestimmung der Zytokinkonzentration [ng/ml].	30
Abb. 8: Geräte-Setup.	36
Abb. 9: Positionierung des Quadrantenmarkers.	36
Abb. 10: Regressionsanalyse zur Bestimmung der Halbhemmkonzentrationen.	43
Abb. 11: IL-8-Sekretion.	46
Abb. 12: Modell der konstitutiven NF- κ B-Aktivierung im HNSCC.	47
Abb. 13: Proliferatives Verhalten der HNSCC-Zellen unter TNF- α -Stimulation.	48
Abb. 14: TNF- α -Freisetzung.	50
Abb. 15: Biologische Aktivität der NF- κ B-pathway-Inhibitoren.	51
Abb. 16: IL-8-Titer nach NF- κ B-pathway-Inhibition im HNSCC.	54
Abb. 17: Korrelation von IL-8 und Zellzahl.	56
Abb. 18: Antiproliferative Effekte der Inhibitoren des NF- κ B pathways.	58
Abb. 19: TPCA-1-vermittelte Sensitivierung des HNSCC für den TNF- α -induzierten Zelltod.	60
Abb. 20: Cortisol antagonisierte die Wirkung von FasL.	63
Abb. 21: MLN4924 sensitivierte die resistente Zelllinie SCC-25 hochsignifikant für FasL.	64
Abb. 22: QNZ induzierte in zwei Zelllinien synergistische Effekte mit FasL.	65
Abb. 23: TPCA-1 sensitivierte HaCaT höchstsignifikant für FasL.	66
Abb. 24: Heatmap zur Expressionsanalyse apoptotischer und inflammatorischer Gene.	68
Abb. 25: Kontrollversuch zur Methodenvalidierung des FACS-Apoptose-Assays.	69
Abb. 26: Methodenvalidierung zum Nachweis der Apoptose im HNSCC.	70

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräteverzeichnis.	22
Tab. 2: Softwareverzeichnis.	22
Tab. 3: Materialliste.	23
Tab. 4: Zellkulturmedien.	23
Tab. 5: Chemikalien, Inhibitoren & Reagenzien.	24
Tab. 6: Kits.	25
Tab. 7: Lösungen & Puffer.	25
Tab. 8: Primer.	26
Tab. 9: Zellpanel.	26
Tab. 10: Instrument-Setting.	35
Tab. 11: Verzeichnis der statischen Softwares.	37
Tab. 12: Analyse der biologischen Aktivität der NF- κ B-pathway-Inhibitoren.	52
Tab. 13: Zelllinienspezifische inhibitorische Konzentrationen der NF- κ B-Inhibitoren.	53
Tab. 14: Analyse apoptotischer Sensitivierungseffekte durch NF- κ B-Inhibitoren.	62
Tab. 15: Analyse des Annexin V PE/7-AAD-FACS-Apoptose-Assays.	72

IV Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die durch ihr Zutun zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Alexander C. Kübler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, sowie seinem Oberarzt Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. Roman C. Brands für die freundliche Überlassung dieses Forschungs- und Promotionsthemas sowie der Zurverfügungstellung des wissenschaftlichen Labors zur Durchführung meiner Experimente. Lieber Roman, herzlichen Dank Dir für die großartige Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich für die intensive Betreuung während der experimentellen Phase bei Herrn Dr. rer. nat. Axel Seher, Leiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg bedanken, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch den Mitarbeiterinnen des wissenschaftlichen Labors Frau Margit Schleyer und Frau Irina KuceroV gilt mein Dank für ihre hilfsbereite und kollegiale Zusammenarbeit.

Außerdem geht ein Dankeschön an Frau Dr. rer. nat. Imme Haubitz für ihre Unterstützung und Ratschläge bei der statistischen Auswertung.

Für die Zurverfügungstellung ihres Geräteparks möchte ich mich beim Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg bedanken. Außerdem ein großer Dank an das Labor von Herrn Professor Dr. Harald Wajant für die Überlassung der Zelltodliganden.

Zu guter Letzt gebührt der größte Dank meiner Familie und ganz besonders meiner Anja, die mir diesen Weg ermöglicht haben und immer zu mir stehen.

V Lebenslauf

Name	Dr. med. dent. Mario Joachim Johannes Scheurer	
Geburt	07. Juli 1990 in Offenburg/Baden-Württemberg	
Schule	1997-2001	Grundschule am Alten Schloss Lörzweiler
	2001-2010	Bischöfliches Willigis-Gymnasium Mainz
	März 2010	Allgemeine Hochschulreife
Grundwehrdienst	April 2010 bis April 2011	5./LazReg. 21 Rennerod & Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz, Abt. für Anästhesie und Intensivmedizin & Abt. für Mund-, Kiefer- und Plastische Ge- sichtschirurgie
Studium	April 2011	Studium der Zahnheilkunde Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	Juni 2016	Zahnärztliche Prüfung Auszeichnung für das beste Examen Adolf-und-Inka-Lübeck-Preis Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	Juli 2016	Approbation als Zahnarzt
	Oktober 2016	Studium der Humanmedizin Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	September 2017	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	März 2020	Promotion zum Dr. med. dent. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	November 2021	Ärztliche Prüfung
	November 2021	Approbation als Arzt

VI Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

- **Scheurer MJJ**, Brands RC, El-Mesery M, Hartmann S, Müller-Richter UDA, Kübler AC et al. The Selection of NFkappaB Inhibitors to Block Inflammation and Induce Sensitisation to FasL-Induced Apoptosis in HNSCC Cell Lines Is Critical for Their Use as a Prospective Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6).

Beiträge zu weiteren Publikationen:

- Hartmann S, Zwick L, **Scheurer MJJ**, Fuchs AR, Brands RC, Seher A, Böhm H, Kübler AC, Müller-Richter UDA. MAGE-A11 expression contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *Clin Oral Investig.* 2017 Oct 15.
- Brands RC, **Scheurer MJJ**, Hartmann S, Seher A, Kübler AC, Müller-Richter UDA. Apoptosis-sensitizing activity of birinapant in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncology Letters.* 2018;15(3):4010-4016.
- **Scheurer MJJ**, Seher A, Steinacker V, Linz C, Hartmann S, Kübler AC et al. Targeting inhibitors of apoptosis in oral squamous cell carcinoma in vitro. *J Craniomaxillofac Surg.* 2019.
- Brands RC, **Scheurer MJJ**, Hartmann S, Seher A, Freudlsperger C, Moratin J, Hoffmann J, Kübler AC, Müller-Richter UDA. Sensitization to apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Dr. med. dent. Mario J. J. Scheurer, an Eides statt, die Dissertation „Inhibitoren des NF- κ B pathways zur *in vitro* Blockade der Inflammation und proapoptotischen Sensitivierung des oralen Plattenepithelkarzinoms für den prospektiven Einsatz in der Tumortherapie“ eigenständig, d. h. selbständig und ohne Zuhilfenahme Dritter, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 2022

Anhang

Expressionsprofil NF- κ B-medierter Zielgene im HNSCC

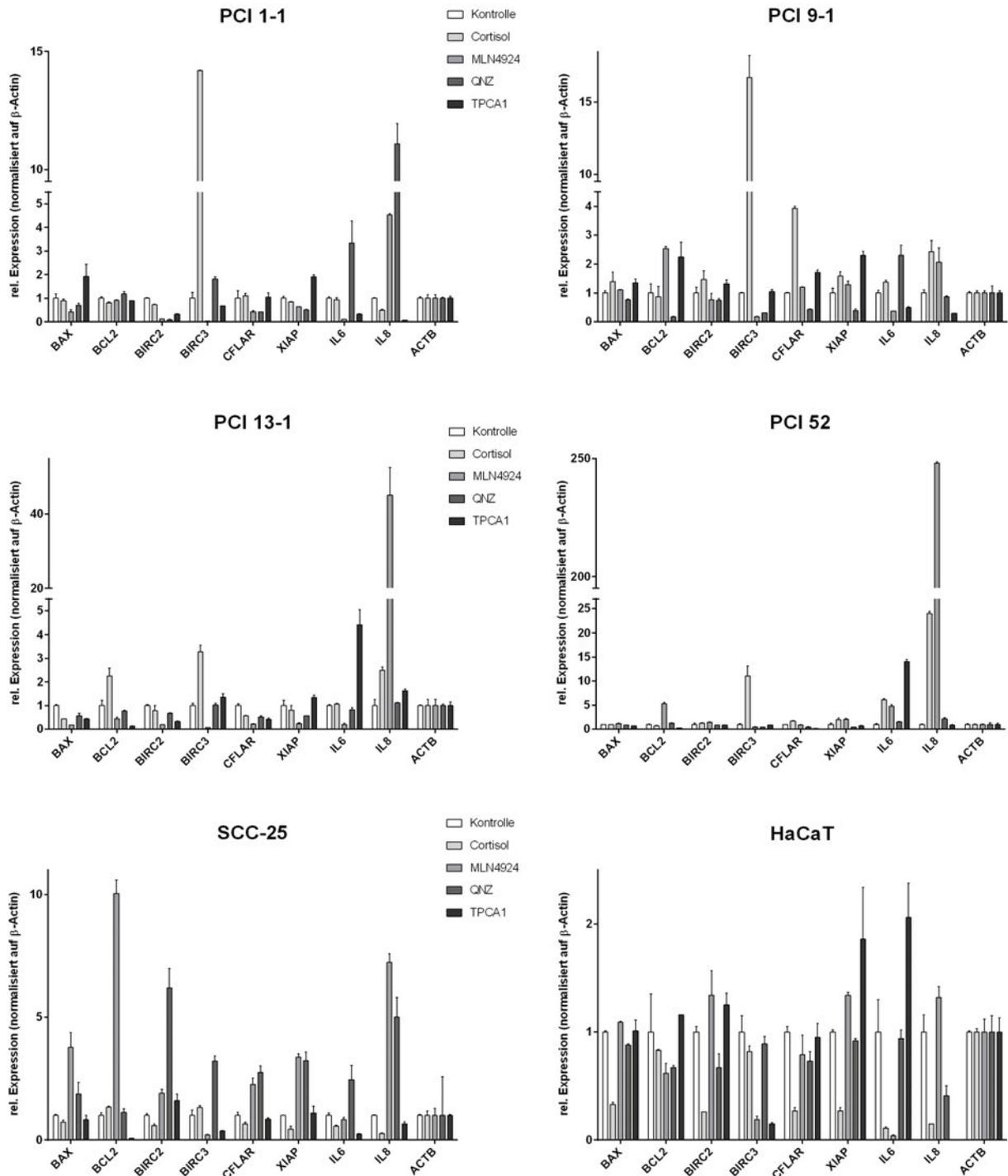


Abb. 29: Expressionsanalyse (I). Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den NF- κ B-pathway-Inhibitoren [IC₁₀₀] inkubiert und die relative Genexpression mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression des analysierten Gens wurde auf das Hausgen β -Actin normiert. Die Datenauswertung erfolgte mit der modifizierten $\Delta\Delta$ Ct-Methode nach Pfaff (Kap. 2.2.6.3).

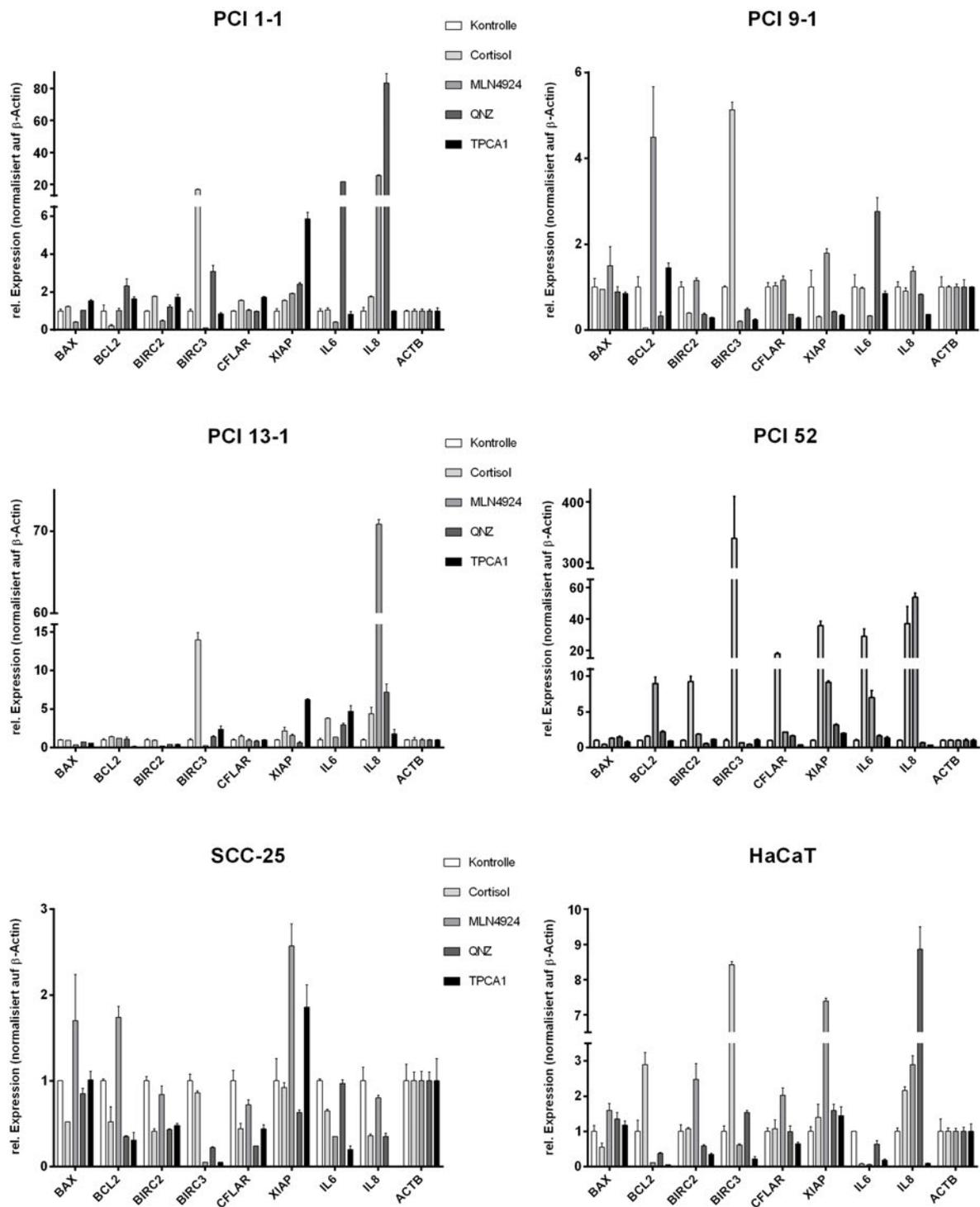


Abb. 30: Expressionsanalyse (II). Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den NF-κB-Pathway-Inhibitoren [IC₁₀₀] incubiert und die relative Genexpression mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression des analysierten Gens wurde auf das Hausgen β-Actin normiert. Die Datenauswertung erfolgte mit der modifizierten ΔΔCt-Methode nach Pfaff (Kap. 2.2.6.3).