

Aus der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Das Phosphoproteom von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-
Bereichs nach Bestrahlung und Applikation des Cyclooxygenase-
Inhibitors Flurbiprofen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Katrin Gellner
aus Groß-Umstadt

Mainz, 2012

Wissenschaftlicher Vorstand:



1. Gutachter



2. Gutachter



Tag der Promotion:

11. Dezember 2012

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIII
1. Einleitung und Ziel der Dissertation	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Hals-Bereichs	3
2.1.1 Pathogenese	4
2.1.1.1 Störungen in mitogenen Signalkaskaden	7
2.1.1.2 Störungen der Zellzyklus-Kontrolle	8
2.1.1.3 Störungen der Zelldifferenzierung und des Zell-Zell-Kontakts	11
2.1.1.4 Dysregulierte Kontrolle des programmierten Zelltodes	13
2.1.2 Therapie	14
2.1.2.1 Grundzüge des klinischen Vorgehens	14
2.1.2.2 Bestrahlungstherapie bei HNSCC-Erkrankungen	16
2.1.2.3 Molekularbiologische Folgen der Bestrahlung	18
2.1.2.4 Mechanismen der Radioresistenz	20
2.1.2.5 Inhibitoren des EGFR	23
2.2 Die Rolle der Cyclooxygenasen und ihrer Inhibitoren in der Karzinogenese	24
2.2.1 Der Cyclooxygenase-Inhibitor Flurbiprofen	28
2.3 Proteomik und Phosphoproteomik	31
2.3.1 Auftrennung von Proteingemischen durch zweidimensionale Elektrophorese	32
2.3.2 Chromatographische Trennung von Proteingemischen	33
2.3.3 Massenspektrometrie in der Proteomik	33
2.3.4 Die Analyse von Phosphoproteinen	39
3. Materialien und Methoden	41
3.1 Materialien	41
3.1.1 Tumorzelllinien und Zellkultur	41
3.1.2 Chemikalien	41
3.1.3 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	41
3.1.4 Cyclooxygenase-Inhibitor Flurbiprofen	43

3.1.5	Strips zur Isoelektrischen Fokussierung	43
3.1.6	Polyacrylamid-Gele	44
3.1.7	Immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie-Säulen	44
3.1.8	Geräte und Software	44
3.1.9	Verbrauchsmaterialien	46
3.1.10	Kits	47
3.2	Methoden	48
3.2.1	Kultur der Tumorzelllinien	48
3.2.2	Flurbiprofeninkubation und Bestrahlung der Tumorzelllinien	49
3.2.3	Ernte der Zellen	49
3.2.4	Die Aufreinigung des Phosphoproteoms – ein Überblick	50
3.2.5	Lyse der Zellen und Proteomisolierung	51
3.2.6	Durchführung von Proteinbestimmungen	52
3.2.7	Isolierung des Phosphoproteoms	53
	3.2.7.1 Durchführung der Immobilisierten Metallaffinitätschromatographie	53
	3.2.7.2 Aufkonzentrierung der Elutionsfraktionen durch Ultrazentrifugation	54
3.2.8	Erste Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese: Isoelektrische Fokussierung	56
3.2.9	Zweite Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese	57
	3.2.9.1 Äquilibration	58
	3.2.9.2 Gelelektrophorese	58
3.2.10	Anfärben der Gele	59
	3.2.10.1 Anfärben der Gele mit speziellem Phosphoproteinfarbstoff	59
3.2.11	Scannen der Gele	60
3.2.12	Analyse der Gelbilder	60
3.2.13	Picken der Spots, Trypsinierung und Proteinextraktion	62
3.2.14	Proben-Aufbereitung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie	63
3.2.15	Recherche nach der biologischen Relevanz der Ergebnisse	64
4.	Ergebnisse	66
4.1	Validierung der Phosphoprotein-Aufreinigung	66
	4.1.1 NanoUPLC-MS: Anteil der Phosphoproteine in Gesamt- und Phosphoproteomproben	66

4.1.1.1	Versuchsgruppe Nullkontrolle	66
4.1.1.2	Versuchsgruppe 8 Gy Bestrahlung	68
4.1.1.3	Versuchsgruppe 200 µM Flurbiprofenapplikation	68
4.1.1.4	Versuchsgruppe 200 µM Flurbiprofenapplikation plus 8 Gy Bestrahlung	69
4.1.1.5	Ergebnisse der Validierung der Phosphoprotein-Anreicherung durch nanoUPLC-MS im Überblick	70
4.2	Proteinidentifizierung und Effekte der Zellbehandlung	71
4.2.1	Spots mit deutlich veränderter Intensität	73
4.2.1.1	8 Gy Bestrahlung verglichen mit der Nullkontrolle	73
4.2.1.2	Applikation von 200 µM Flurbiprofen im Vergleich zur Nullkontrolle	74
4.2.1.3	Applikation von 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio im Vergleich zur Nullkontrolle	75
4.2.1.4	Applikation von 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung mit 8 Gy	75
4.2.1.5	Applikation von 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio im Vergleich zur alleinigen Applikation von 200 µM Flurbiprofen	76
4.2.2	Zusätzliche Effekte der Flurbiprofen-Applikation im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung	77
4.2.3	Systembiologische Aspekte und molekulare Funktionen der differentiell exprimierter Proteine	79
4.2.3.1	Interaktionen und Interaktionspartner der systembiologisch relevanten Proteine	82
4.2.4	Ergebnisse der nanoUPLC-MS Versuche	84
5.	Diskussion	86
5.1	Einordnung der differentiell exprimierten Proteine in den zellulären Kontext und Bedeutung der Ergebnisse für die Fragestellungen des Experiments	86
5.1.1	14-3-3 Protein Sigma (Gen: SFN)	86
5.1.2	60 kDa Heat Shock Protein (Gen: HSPD1)	87
5.1.3	78 Da Glucose-related Protein (Gen: HSPA5)	90
5.1.4	Calreticulin (Gen: CALR)	93
5.1.5	Elongation Factor-1 Delta (Gen: EEF1D)	96
5.1.6	Nucleophosmin (Gen: NPM1)	97

5.1.7	Stress-70 Protein (Gen. HSPA9)	101
5.2	Diskussion der experimentellen Methode	106
5.2.1	Allgemeine Limitationen des Experiments	106
5.2.2	Methodische Alternativen und Perspektiven	109
6.	Zusammenfassung	113
7.	Literaturverzeichnis	115
8.	Anhang	144
8.1	Effekte der Bestrahlung auf die Phosphoprotein-Expression in den nano-UPLC-MS Versuchen	144
8.2	Effekte von Flurbiprofen auf die Phosphoprotein-Expression in den nanoUPLC-MS Versuchen	145
8.3	Zusätzliche Effekte der Flurbiprofenapplikation im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung	146
	Danksagung	149
	Lebenslauf	150

Abkürzungsverzeichnis

15-PGDH	15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase
2D PAGE	<i>Two-Dimensional Polyacrylamid Gel Electrophoresis</i>
2D DIGE	<i>Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis</i>
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Proteinkinase B; <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARF	p14ARF ist das Produkt eines alternativen Leserasters (<i>alternative reading frame</i> , ARF) des Genlocus CDKN2A (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATM Kinase	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-2-associated death promotor</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BID	<i>BH3 Interacting-domain Death agonist</i>
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
BisAA	Bisacrylamid
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CAD	Caspase-Aktivierte DNAase
Cdc25	<i>Cell division cycle protein 25</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>

CERT	<i>Chemotherapy Enhanced Radiotherapy</i>
CHAPS	3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat
Chk	<i>Cell cycle checkpoint kinase</i>
cm	Zentimeter
c-myc	<i>cellular myelocytomatosis oncogene</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRT	Calreticulin
c-src	<i>cellular sarcoma</i> , Tyrosinkinase Src
dest	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DTT	Dithiotreitol
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ECD	<i>Electron Capture Dissociation</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ErbB	ErbB steht für <i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene</i> ; der Begriff „ErbB Proteinfamilie“ wird synonym zur „EGFR (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>) Proteinfamilie“ verwendet
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
et al.	<i>et alii</i>
ETD	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FT-ICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
g	Angabe der Beschleunigung während der Zentrifugation als Vielfaches der Erdbeschleunigung

GeneRIF	<i>Gene References Into Functions</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GRP	<i>Gastrin-Releasing Peptide</i>
GRP-75	<i>75kDa Glucose-Regulated Protein</i>
GRPR	<i>Gastrin-Releasing Peptide Receptor</i>
Gy	Gray; SI-Einheit der durch ionisierende Strahlung verursachten Energiedosis
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HCl	<i>Acidum hydrochloricum</i> , Salzsäure
HED	Hydroxyethyldisulfid
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPV	Humane Papillomaviren
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HuR	<i>Human antigen R</i>
IAA	Iodacetaldehyd
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinity Tags</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
i.F.	im Folgenden
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like Growth Factor-1 Receptor</i>
IKK	<i>Inhibitor of NFκB Kinase</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>

IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IRE1	<i>Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease</i>
IRF1	Interferon Regulationsfaktor 1
i.S.	im Sinne
ITD	<i>Ion Trap Detector</i>
iTRAQ	<i>Isobaric Peptide Tags for Relative and Absolute Quantification</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
mA	Milliampere
mAb	<i>monoclonal Antibody</i>
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 2 oncogene; p53 Inhibitor</i>
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
m/z	Masse-zu-Ladung
nanoUPLC	<i>Nano Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng	Nanogramm
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>Nitric Oxide Synthetase</i>
Noxa	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NPM1	Nucleophosmin
NSAID	<i>Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug</i>
o.a.	oben angeführt/e/en
o.g.	oben genannt/e/en
p16	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
p21	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1</i>
p53	zelluläres Tumorantigen p53
p75NTR	p75 Neurotrophin-Rezeptor
PAI	<i>Protein Abundance Index</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PERK	<i>eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3, PRKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PG	Prostaglandin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKR	Protein Kinase R; <i>Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase</i>
PMF	Peptidmassen Fingerabdruck
ppm	<i>parts per million</i>
pRb	Retinoblastom-Protein
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homologue</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
Puma	<i>Bcl-2-binding component 3</i>
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
Ras	<i>Rat sarcoma protein</i>

RHAMM	<i>Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT	Radiotherapie
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
resp.	respektive
s.	siehe
s.a.	siehe auch
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture</i>
siRNA	<i>small interfering Ribonucleic Acid</i>
sog.	sogenannte/n
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes / Proteins</i>
s.u.	siehe unten
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
Tbl	Tablette
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGP	Trenngelpuffer
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
TOF	<i>Time Of Flight</i>
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
TX	Thromboxan
u.a.	und andere
u.ä.	und ähnliche
UPR	Unfolded Protein Response
usf.	und so fort
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem

V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vol	Volumen
vs.	<i>versus</i>
WEBGestalt	<i>Web-based Gene Set Analysis Toolkit</i>
XIC	<i>Extracted Ion Current</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Modell der Mehrstufenkarzinogenese beim Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs	5
Abbildung 2.2	Die Hauptmerkmale des Krebs (<i>the Hallmarks of Cancer</i>)	6
Abbildung 2.3	Der MALDI-Prozess	35
Abbildung 2.4	Der ESI-Prozess	35
Abbildung 2.5	Aufbau eines TOF-Flugrohrs mit Reflektor	36
Abbildung 2.6	Aufbau und Funktionsweise eines Quadrupol-Analysators	37
Abbildung 2.7	Das Prinzip der MS/MS-Tandem-Massenspektrometrie	39
Abbildung 3.1	Die Isolierung des Phosphoproteoms aus den Tumorzelllinien	51
Abbildung 4.1	Prozentualer Anteil phosphorylierbarer Proteine in Nativprobe, aufgereinigter Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen	70
Abbildung 4.2	Gepickte und identifizierte Proteine im <i>Uniongel</i>	72
Abbildung 4.3	<i>STRING</i> -Analyse der systembiologisch relevanten, in ihrer Expression veränderten Proteine	82
Abbildung 4.4	<i>STRING</i> -Analyse der systembiologisch relevanten, in ihrer Expression veränderten Proteine mit ihren wahrscheinlichsten funktionellen Interaktionspartnern	82
Abbildung 5.1	Die Überexpression von NPM in Tumorzellen führt zur verstärkten Proliferation und zur Inhibition der Apoptose	99
Abbildung 5.2	NPM und ARF regulieren das Zellwachstum und die Proliferation, indem sie Stabilität und/oder Aktivität des jeweils anderen kontrollieren	99
Abbildung 5.3	Übersicht über die Methoden zur Anreicherung von Phosphoproteinen und Phosphopeptiden aus komplexen Proben	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Behandlung der Tumorzelllinien in den vier Behandlungsarmen	50
Tabelle 4.1	Anteil phosphorylierbarer Proteine in der Nullkontrolle von Nativprobe und aufgereinigter Probe nach IMAC sowie Anteil phosphorylierbarer Proteine in der aufgereinigten Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen	67
Tabelle 4.2	Anteil phosphorylierbarer Proteine der Versuchsgruppe 8 Gy Bestrahlung von Nativprobe und aufgereinigter Probe nach IMAC sowie Anteil phosphorylierbarer Proteine in der aufgereinigten Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen	68
Tabelle 4.3	Anteil phosphorylierbarer Proteine in der Versuchsgruppe 200 µM Flurbiprofenapplikation von Nativprobe und aufgereinigter Probe nach IMAC sowie Anteil phosphorylierbarer Proteine in der aufgereinigten Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen	69
Tabelle 4.4	Anteil phosphorylierbarer Proteine in der Versuchsgruppe 200 µM Flurbiprofenapplikation plus 8 Gy Bestrahlung von Nativprobe und aufgereinigter Probe nach IMAC sowie Anteil phosphorylierbarer Proteine in der aufgereinigten Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen	69
Tabelle 4.5	Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Bestrahlung vs. Nullkontrolle	73
Tabelle 4.6	Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Flurbiprofen vs. Nullkontrolle	74
Tabelle 4.7	Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Flurbiprofen plus Bestrahlung vs. Nullkontrolle	75
Tabelle 4.8	Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Flurbiprofen plus Bestrahlung vs. alleinige Bestrahlung	76
Tabelle 4.9	Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Flurbiprofen plus Bestrahlung vs. alleinige Flurbiprofen-Applikation	77
Tabelle 4.10	Proteine, die sowohl im Vergleich Bestrahlung vs. Nullkontrolle als auch im Vergleich Kombinationsbehandlung vs. Nullkontrolle deutlich verändert exprimiert sind: Darstellung der Richtung des Effekts einer zusätzlichen Flurbiprofenapplikation	78
Tabelle 4.11	GO-Annotationen der differentiell exprimierten Proteine	79
Tabelle 4.12	Überblick über die Regulation der differentiell exprimierten Proteine	81

Tabelle 4.13	Durch <i>STRING</i> -Analyse vorhergesagte funktionelle Interaktionspartner der aus systembiologischer Sicht relevanten, in ihrer Expression veränderten Proteine	83
Tabelle .8.1	Phosphoproteine mit Hinweis auf Steigerung der Expression durch Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen	144
Tabelle 8.2	Phosphoproteine mit Hinweis auf Minderung der Expression durch Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen	144
Tabelle 8.3	Phosphoproteine mit Hinweis auf Steigerung der Expression durch Flurbiprofenbehandlung in den nanoUPLC-MS Versuchen	145
Tabelle 8.4	Phosphoproteine mit Hinweis auf Minderung der Expression durch Flurbiprofenbehandlung in den nanoUPLC-MS Versuchen	146
Tabelle 8.5	Phosphoproteine mit Hinweis auf zusätzliche Steigerung der Expression durch kombinierte Behandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen	147
Tabelle 8.6	Phosphoproteine mit Hinweis auf zusätzliche Minderung der Expression durch kombinierte Behandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen	147
Tabelle 8.7	Phosphoproteine mit Hinweis auf weniger stark ausgeprägte Minderung der Expression durch kombinierte Behandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen	148

1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Die Behandlung von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich gestaltet sich noch immer schwierig, denn auch neue Medikamente wie die Inhibitoren des epithelialen Wachstumsfaktors, die heute zusätzlich zur operativen Tumorentfernung, Radio- und / oder Chemotherapie eingesetzt werden, zeigten in der klinischen Erprobung bisher keine überzeugenden Langzeiterfolge. Eine der Ursachen für ausbleibende Therapieerfolge liegt in der Entwicklung von Radioresistenz in bestimmten Populationen von Tumorzellen, die auch nach einer Radiotherapie proliferieren und eine verminderte Remission oder ein Tumorrezidiv bedingen können. Die Entwicklung der Radioresistenz in Tumorzellen ist in weiten Teilen ein noch wenig verstandener Prozess und neben Mechanismen, die den Tumorzellen inhärent sind – wie beispielsweise Dysregulationen verschiedener Signalkaskaden – scheinen auch bestrahlungsinduzierte Effekte an einer zunehmenden Radioresistenz bestimmter Tumorzellen beteiligt zu sein. Die häufig vorliegende vermehrte Expression von Prostaglandinen in malignen Tumoren ist assoziiert mit einem geringeren Ansprechen der Tumorzellen auf eine Behandlung mit ionisierenden Strahlen – vermutlich indem sie einerseits zu einer verstärkten Ausschüttung angiogener Faktoren führt und andererseits die Apoptose von Tumorzellen verhindert. Folgerichtig konnten Experimente mit Cyclooxygenase-Inhibitoren deren Tumor-inhibierende Wirkungen nachweisen. Diese Wirkungen sind jedoch nicht allein Folge der reduzierten Prostaglandinsynthese. Auch Cyclooxygenase-unabhängige Mechanismen sind nachweislich an der Hemmung des Tumorwachstums beteiligt. Es scheint sich dabei jedoch nicht um einen Gruppeneffekt der Cyclooxygenase-Inhibitoren zu handeln, sondern um jeweils substanzspezifische Mechanismen, die noch nicht vollständig bekannt sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen von ionisierender Bestrahlung und des Cyclooxygenase-Inhibitors Flurbiprofen auf das Phosphoproteom einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie des Kopf-Halsbereichs, dessen Analyse verglichen mit der Analyse von Gesamtproteomen speziellen experimentellen Herausforderungen gegenübersteht. Viele intrazelluläre Prozesse werden durch Proteinphosphorylierung kontrolliert und die Phosphoproteomik eröffnet Möglichkeiten, gezielt diese regulierenden Proteine zu untersuchen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch Betrachtung von differentiell exprimierten Phosphoproteinen unter Bestrahlung und Flurbiprofenapplikation, Hinweise auf Mechanismen der bestrahlungsinduzierten Radioresistenz zu finden sowie Cyclooxygenase-unabhängige Flurbiprofenwirkungen zu ermitteln. Dies soll zum besseren Verständnis der genannten Prozesse beitragen und behilflich sein, Hypothesen zu bilden, die in Folgeexperimenten untersucht werden können. Methodisch wurden für diese Arbeit Zellkulturen angelegt, die mit ionisierenden Strahlen, Flurbiprofen oder deren Kombination behandelt wurden. Aus den isolierten Proteinen wurden die Phosphoproteine aufgereinigt und diese durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie durch anschließende MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert.

Die Auswertung erfolgte insbesondere im Hinblick auf die im Folgenden genannten Fragestellungen:

- Welche Effekte hat die Bestrahlung auf das Phosphoproteom?
- Welche Effekte hat Flurbiprofen auf das Phosphoproteom?
- Wie wirkt sich eine additionalere Flurbiprofenapplikation auf bestrahlungsinduzierte Reaktionen aus?
- Entsteht durch die Flurbiprofenapplikation eine Verstärkung tumorinhibierender Bestrahlungseffekte bzw. eine Radiosensitivierung?
- Ist bei den flurbiprofeninduzierten Effekten von einem zugrundeliegenden Cyclooxygenase-unabhängigen Mechanismus auszugehen?

2. Literaturdiskussion

2.1 Das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Hals-Bereichs

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) subsumieren die epithelialen Malignome der Nasen- und Mundhöhle, der Nasennebenhöhlen, des Pharynx sowie des Larynx. Als wichtigste Risikofaktoren für all diese Tumoren gelten der chronische Alkohol- und Tabakabusus (1) – letzterer sowohl in Form des inhalativen Rauchens als auch als Kauen von Paan (Syn. *betel quid*), einer Paste aus Betelblättern, gelöschtem Kalk, geriebener Betelnuss und Tabakbeimengungen, die in Südostasien als Mund-erfrischer benutzt wird (2), (3). Alkohol- und Tabakkonsum sind in der Genese von 75 % aller HNSCCs involviert und die Kombination beider Noxen hat einen multiplikativen Effekt auf das Risiko der Karzinomentstehung (4), (5), (6). Auch die Infektion des Epithels mit den onkogenen Subtypen 16 und 18 des humanen Papillomavirus (HPV) gilt heute als gesicherter Risikofaktor für die Entstehung bestimmter Subtypen des HNSCCs (7). Etwa 25 % der HNSCCs enthalten HP-virale DNA und insbesondere Karzinome des Oropharynx bei nicht trinkenden und nicht rauchenden Personen sind mit HPV assoziiert: 72 % dieser Tumoren sind HPV positiv (7). Der karzinogene Effekt der Infektion ist dabei bedingt durch die viralen Proteine E6 und E7, die zur Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 und Retinoblastomprotein (Rb) führen (8). Es bestehen wesentliche molekularbiologische Unterschiede zwischen HPV positiven und HPV negativen Karzinomen (9), die vermutlich zum besseren Ansprechen der HPV positiven Karzinome auf Radio- und/oder Chemotherapie sowie zur besseren Prognose der Erkrankung beitragen (10). Eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) gilt als weiterer Risikofaktor für die Karzinomentstehung. Eine Assoziation besteht dabei allerdings lediglich für die Malignome im Bereich des Nasopharynx (11), (12).

Weltweit werden jährlich etwa 650.000 Neuerkrankungen und 350.000 Todesfälle durch Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs gezählt (13). Hochrisikoregionen für orale Karzinome sind Melanesien (eine Gruppe pazifischer Inseln nordöstlich von Australien), das südliche Zentralasien, West- und Südeuropa

sowie das südliche Afrika; für Larynxkarzinome gelten Süd- und Osteuropa, Südamerika und Westasien als Hochrisiko-Regionen (13). In Deutschland registrierte das Robert-Koch-Institut im Jahr 2006 14.750 Neuerkrankungen und 6.311 Todesfälle. Mit einem Anteil von 5 % beim männlichen und 1,7 % beim weiblichen Geschlecht gehören HNSCCs hierzulande eher zu den weniger häufigen Malignomerkrankungen. Die Register der Bundesländer ergeben 5-Jahres Überlebensraten für Mundhöhlen- und Rachenkarzinome von 36-45 % bei Männern und von 50-63 % bei Frauen. Bei Larynxkarzinomen ist die Überlebensrate mit 58-76 % etwas günstiger (14). Nur in etwa einem Drittel der Fälle kann die Erkrankung in den gut kontrollierbaren frühen Stadien entdeckt werden. Überwiegend handelt es sich zum Zeitpunkt der Diagnose bereits um eine lokal fortgeschrittene Erkrankung, die regionale Lymphknoten befallen und Nachbarorgane infiltriert hat (15). Vielfach ist die nur gering ausgeprägte Symptomatik für die Diagnoseverzögerung verantwortlich (16).

Über lange Zeit stellten die chirurgische Tumorsektion und die Radiotherapie die wesentlichen Therapieoptionen dar. Die Integration von Chemotherapeutika sowie die Einführung der Inhibitoren des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) in etablierte Therapieregime haben jedoch zuletzt Verbesserungen der klinischen Ergebnisse gezeigt und zumindest die Chemotherapie ist nun ebenfalls als weiterer Grundpfeiler der Therapie akzeptiert (17). Dennoch fehlen für das HNSCC weiterhin evidenzbasierte Biomarker, die Ärzten Möglichkeiten eröffnen, Patienten in Remission besser überwachen zu können, das Ansprechen auf eine bestimmte Therapieform vorhersagen und den Zeitpunkt der Diagnose vorverlegen zu können. Weitere Studien, die helfen die Pathogenese und die Entwicklung von Therapie-resistenz auf der molekularen Ebenen aufzudecken, sind notwendig, um diese Ziele zu erreichen und effizientere Therapiemethoden zu entwickeln.

2.1.1 Pathogenese

Für die Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs gilt wie für die meisten anderen sporadisch auftretenden Tumoren, dass sie das Resultat einer allmählichen Akkumulation von Veränderungen in Tumorsuppressor- und Proto-onkogenen sind, die in einem mehrstufigen Prozess, ausgehend von einem normalen

Epithel über Hyperplasie, Dysplasie und Carcinoma in situ zu einem invasiven Karzinom führen (18), (19). Die Entwicklung eines differenzierten Modells dieser sog. Mehrstufen - Karzinogenese für das HNSCC begann mit der Beobachtung, dass in Proben aus diesen Tumoren wiederkehrende Muster von Deletionen, Duplikationen und Rearrangements chromosomaler Segmente erkennbar waren (20), (21), s.a. Abb. 2.1. Den meisten dieser abnormalen chromosomalen Regionen, konnten seither Tumorsuppressor- oder Onkogene zugeordnet werden.

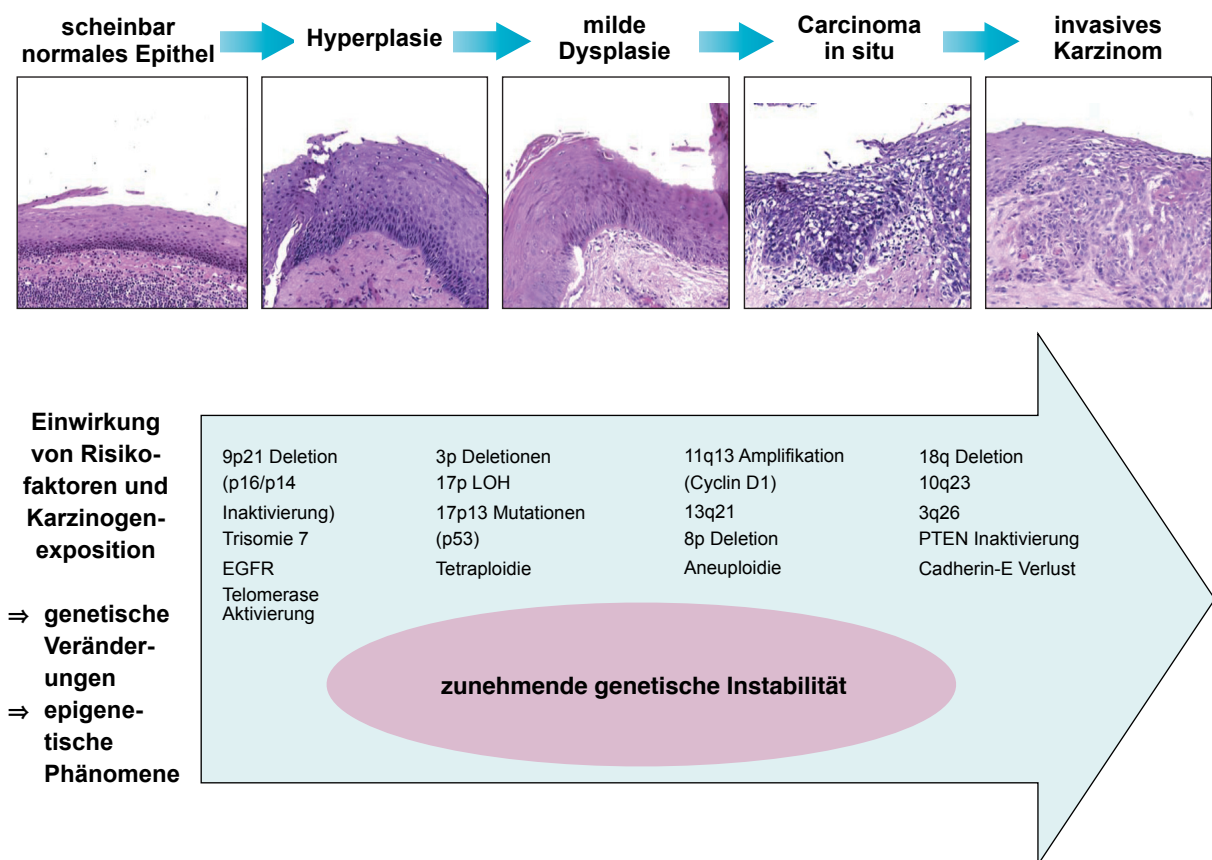


Abb. 2.1: Modell der Mehrstufenkarzinogenese beim Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs. Sie beschreibt die Serie der Ereignisse (Initiation, Promotion und Progression), die zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms führen. Die histologischen Veränderungen (s. Bilder, HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung) verlaufen parallel zu Akkumulation molekularer (d.h. genetischer und epigenetischer) Veränderungen, von denen einige in ihrer ungefähren Abfolge angegeben sind. EGFR = *Epidermal Growth Factor Receptor*; LOH = *Loss of Heterozygosity*; PTEN = *Phosphatase and Tensin Homologue*. Verändert nach (17)

Nach Vogelstein ist die Akkumulation von etwa zehn molekularen Veränderungen notwendig, um die maligne Entartung einer Zelle auszulösen (22). Forschungsarbeiten der letzten Jahrzehnte ließen ein enorm vielschichtiges und komplexes Bild der erworbenen Dysregulationen in Krebszellen entstehen, die von

Hanahan und Weinberg sechs Kategorien – den sog. *Hallmarks of Cancer* – zugeordnet werden. Demnach zeichnen sich Tumorzellen aus durch (a) Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, (b) Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (c) Umgehen des programmierten Zelltodes (Apoptose), (d) unbegrenztes replikatives Potential, (e) fortwährende Angiogenese sowie durch (f) Gewebeinvasion und Metastasierung. Die Abb. 2.2 veranschaulicht das Zusammenspiel der genannten Prozesse bei der Karzinogenese (23).

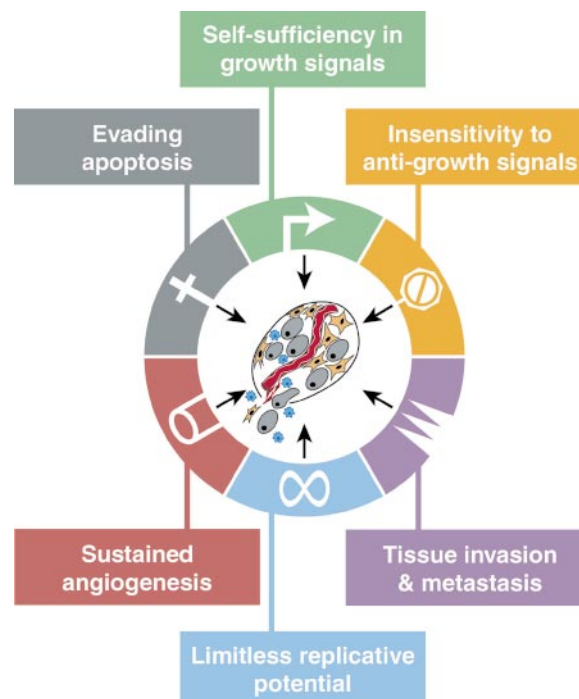


Abb. 2.2. Die Hauptmerkmale des Krebs (*the Hallmarks of Cancer*). Nach Hanahan und Weinberg kann davon ausgegangen werden, dass von den meisten, wenn nicht gar von allen, Tumorentitäten während ihrer malignen Entartung die gleichen funktionellen Fähigkeiten akquiriert werden. Die Hauptmerkmale des Krebs sind demnach: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen (*self-sufficiency in growth signals*), Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen (*insensitivity to anti-growth signals*), Umgehen des programmierten Zelltodes (*evading Apoptosis*), unbegrenztes replikatives Potential (*limitless replicative potential*), fortwährende Angiogenese (*sustained angiogenesis*) sowie Gewebeinvasion und Metastasierung (*tissue invasion and metastasis*). Aus (23)

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit stellen Negrini et al. die Bedeutung der genomischen Instabilität für die Tumorigenese heraus und schlagen vor, das Konzept der *Hallmarks of Cancer* um die genomische Instabilität zu ergänzen. Genomische Instabilität ist ein Charakteristikum der meisten Tumoren und treibende Kraft für die zunehmende Malignität von Zellen während der Krebsentstehung. Bei hereditären Tumoren tritt die genomische Instabilität infolge von Mutationen in DNA-

Reparaturgenen auf und bei sporadischen Tumoren wird ein kausaler Zusammenhang der genomischen Instabilität mit Onkogen-induzierten DNA-Schäden angenommen (24). Ein Überblick über die Spezifika der molekularen Karzinogenese des HNSCCs folgt in den nächsten Abschnitten.

2.1.1.1 Störungen in mitogenen Signalkaskaden

Mitogene Signalkaskaden regulieren Wachstums- und Proliferationsprozesse. Sie werden üblicherweise durch eine Ligandenbindung an Rezeptoren der Zelloberfläche initiiert und lösen eine Sequenz von miteinander verbundenen intrazellulären Reaktionen aus, die eine Amplifikation des ursprünglichen Signals ermöglicht. Veränderungen solcher Kaskaden, die zur Verstärkung von Wachstums- und Proliferationsprozessen ohne adäquate Auslöser führen, findet man in den meisten Tumoren (25).

Abweichungen in den Biomolekülen, die die EGFR-Signalkaskade bilden, wurden zuletzt viel Aufmerksamkeit zuteil, da es sich bei diesem Mitglied der Rezeptor Tyrosinkinase Familie sowohl um einen prognostischen Faktor (26), (27) als auch um ein therapeutisches Zielmolekül (28) des HNSCCs handelt. Die Aktivierung des Rezeptors bedingt seine Autophosphorylierung und führt zur Aktivierung des Proto-Onkoproteins Ras (*rat sarcoma protein*), welches via Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) zur Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren führt. Sowohl der EGFR als auch einer seiner Liganden, der transformierende Wachstumsfaktor-alpha (*transforming growth factor-alpha*, TGF- α), sind beim HNSCC im Sinne eines autokrinen Stimulationskreislaufs hochreguliert (29). Die TGF- α - und EGFR-Überexpression werden sogar in histologisch normaler Mukosa, die aus der Umgebung eines HNSCCs stammt, gefunden (30). Nicht zuletzt aufgrund dieses Befundes ist anzunehmen, dass die EGFR- und TGF- α -Überexpression bereits sehr früh im karzinogenen Prozess auftreten. Voneinander verschiedene Pathomechanismen der Hochregulierung sind jedoch wahrscheinlich: In der Progression von einer milden Dysplasie hin zum invasiven Karzinom ändert sich die TGF- α Expression nämlich kaum, die EGFR Expression hingegen zeigt einen kontinuierlichen Anstieg während der Progression von der milden zur schweren Dysplasie und zum invasiven Karzinom (29). Amplifikationen des EGFR Gens und

die Überexpression des Genprodukts sind sehr häufig beim HNSCC (31). Die erhöhte Anzahl von Genkopien korreliert dabei mit einer schlechten Prognose der Erkrankung (32). Der Einsatz von gegen den EGFR gerichteten monoklonalen Antikörpern (*monoclonal antibodies*, mAbs), bspw. Cetuximab, als systemische Therapeutika erzielte gewisse Erfolge in der Kombination mit einer Radiotherapie bei lokal fortgeschrittenen Erkrankungen (33) sowie in der Kombination mit einer platinbasierten Chemotherapie bei metastasierten Karzinomen oder Karzinomrezidiven (34). Die Studienergebnisse eines verlängerten medianen Überlebens von 49 vs. 29 Monaten in der Cetuximab plus Radiotherapie Studie sowie von 10 vs. 7,5 Monaten in der Cetuximab plus Chemotherapie Studie sind zwar signifikant, an das Ziel des propagierten Durchbruchs in der Therapie der HNSCCs konnten jedoch bisher weder die o.a. monoklonalen Antikörper noch die niedermolekularen Tyrosinkinaseinhibitoren (*small molecule tyrosinkinase inhibitors*) wie beispielsweise Gefitinib (35) heranreichen.

2.1.1.2 Störungen der Zellzyklus-Kontrolle

Störungen an den Kontrollpunkten des Zellzyklus, die durch Begünstigung der ungehinderten Proliferation von Zellen zur Invasivität von Tumorzellen beitragen, sind ein bekanntes Kennzeichen maligner Tumoren. Einige Faktoren, denen eine essentielle Funktion bei der Zellzykluskontrolle beigemessen wird, sind in HNSCC-Zellen fehlreguliert. Beschrieben sind die Überexpression von Cyclin D1; die Inaktivierung des Genlocus, der das Tumorsuppressorprotein p16 encodiert; die Inaktivierung und Mutationen des „Wächters des Genoms“ p53 (36) sowie Amplifikation und Überexpression des Proto-Onkogens c-myc (*myelocytomatosis cellular oncogene*).

Das für Cyclin D1 codierende Gen CCND1 ist lokalisiert in der q13 Region auf Chromosom 11, die beim HNSCC häufig Veränderungen aufweist (31). Cyclin D1 hat eine wichtige regulatorische Funktion beim Übergang einer Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus: In einem Komplex mit der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (*cyclin-dependent kinase 4*, CDK-4) wird der Tumorsuppressor Retinoblastomprotein (pRB) durch Phosphorylierung inaktiviert und der Transkriptionsfaktor E2F wird freigegeben. Dadurch steigt die Expression von Enzymen, die für die S-Phase benötigt werden – beispielsweise für die DNA-Synthese (37), (25). Die Überexpression von

Cyclin D1 versetzt eine Zelle in die Lage, auch mit einer nur geringen Stimulation durch Mitogene zu proliferieren (31). Cyclin D1 Gen-Amplifikationen werden in 26-39 % (38) und eine Überexpression des Proteins in 39-64 % (39), (40) der HNSCCs beobachtet. Die Überexpression geht dabei mit einer signifikant höheren Rezidivrate, einem verkürzten rezidivfreien Zeitraum und einem reduzierten Gesamtüberleben einher (40). Durch einen Polymorphismus im CCND1 Gen, bei dem an Position 870 Guanin durch Adenin ausgetauscht wird, entsteht eine Splice-Variante des Cyclin D1 Proteins (41), die eine Zellzyklus-Progression von der G1- in die S-Phase trotz eines DNA-Schadens zu erleichtern scheint (42). Der Einfluss des Polymorphismus auf die Entwicklung und den Verlauf der Erkrankung ist kontrovers: Zum einen haben homozygote Träger des varianten Proteins (CCND1-AA Genotyp) gegenüber Trägern des Wildtypallels (CCDN1-GG und -GA Genotypen) ein signifikant erhöhtes Risiko an einem HNSCC zu erkranken (43), (44), zum anderen führt die homozygote Variante aber auch zu einem signifikant längeren rezidivfreien Zeitraum (45) nach einer Operation mit kurativer Intention und einem besseren Gesamtüberleben im Krankheitsfall (46), (44).

Der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A, auch als p16 bezeichnet, ist ein auf Chromosom 9p21 lokalisierter Tumorsuppressor. In normalen Zellen führt aktives p16 zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase, wenn die Zelle Stress ausgesetzt ist. Durch Bindung an die die CDK-4 verhindert es die Bildung eines aktiven Komplexes aus Cyclin D1 und der CDK-4 und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F (25). Das Fehlen von aktivem p16 – hauptsächlich durch homozygote Deletion des Genlocus und Promotor-Hypermethylierung ausgelöst – kann in 83 % der HNSCCs nachgewiesen werden (47), (48). Es ist anzunehmen, dass die Veränderungen der 9p21-Region bereits in den frühen Stadien der Erkrankung auftreten (49). Ergebnisse klinischer Studien weisen darauf hin, dass sich die p16-Inaktivierung verschlechternd auf die Prognose von Patienten mit HNSCC auswirkt (50) und dass außerdem eine hohe intrazelluläre p16-Konzentrationen ein gutes Ansprechen auf Chemo- sowie kombinierte Radio- und Chemotherapie vorhersagt (51).

Bei nahezu allen malignen Tumorentitäten bestehen Veränderungen im p53-Signalweg. Dieses Tumorsuppressor-Protein spielt eine so große Rolle, da es auf mehreren Wegen maßgeblich an Schutzmechanismen gegen die Entwicklung von Tumoren beteiligt ist. Es kann, z.B. wenn DNA-Schäden vorliegen oder die Zelle

zuviel hyperproliferative Signale erhält, die Zellproliferation stoppen, indem es den Übertritt von der G1- in die S-Phase verhindert und bei ausgedehnten Schäden den programmierten Zelltod induziert. Der Zellzyklusarrest durch p53 wird indirekt reguliert. Durch beschädigte DNA wird eine Signalkaskade aktiviert, an deren Ende die Phosphorylierung von p53 steht, welche die Bindung an seinen Inhibitor Mdm2 (*murine double minute 2 oncogene*) verhindert. Das somit aktivierte p53 treibt die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p21 an, der Cyclin-CDK-Komplexe inaktiviert, die für die Zellzyklusprogression in der G1- und S-Phase notwendig sind. Somit wird verhindert, dass eine beschädigte Zelle die S-Phase durchläuft und ihre DNA replizieren kann. Ist der Zellschaden ausgedehnter, wird die Apoptose induziert: Dabei stimuliert p53 die Expression pro-apoptotischer Gene (z.B. Bax) und inaktiviert anti-apoptotische Proteine (z.B. Bcl-2) (25), (37). Mutationen, die p53 betreffen, treten in etwa 50 % der HNSCCs auf; in der Studie mit der bislang größten Fallzahl waren es 53,3 % (52). Am ehesten handelt es sich bei den p53 Mutationen um Ereignisse, die der Progression vom dysplastischen Epithel zum invasiven Karzinom vorangehen (53). Die wesentlichen Karzinogene für das HNSCC – Rauchen und das Trinken alkoholischer Getränke – üben ihre pro-tumorigenen Wirkungen wohl zumindest teilweise über p53 aus. Studien bestätigen eine Assoziation des Auftretens von p53 Mutationen mit einer positiven Anamnese für diese beiden Risikofaktoren (54), (55). Die Mutationen beeinflussen auch die Prognose von Patienten und den Erfolg von Therapien: Sie gehen mit einem erhöhten Risiko für Lokalrezidive nach primärer oder adjuvanter Radiotherapie einher (56) und molekulargenetische Untersuchungen zeigen, dass das Risiko für das Auftreten eines Lokalrezidivs erhöht ist, wenn die histopathologisch tumorfreien Ränder eines Resektats die klonale p53 Mutation aufweisen (57). Außerdem ist die Überlebensrate von HNSCC-Patienten, die mit kurativer Intention operiert wurden, geringer, wenn eine eine Mutation im p53 Gen besteht (52).

Amplifikationen und die Überexpression von Mitgliedern der Myc-Genfamilie (c-myc u.a.) sind keine Seltenheit beim HNSCC. Die Häufigkeit der c-myc Amplifikation wird mit 11 % (58) und diejenige der c-myc Überexpression mit 22 % (59) angegeben. C-myc ist ein Transkriptionsfaktor, der auf die zelluläre Stimulation mit Mitogenen hin gebildet wird und die Expression von D-Cyclinen steigert, die – wie o.a. – für den Eintritt einer Zelle in die S-Phase des Zellzyklus essentiell sind. Auch andere Mechanismen zur Steigerung der Zellproliferation gehören zum Repertoire

von c-myc. Liegen große Mengen des Onkogens vor, kann dies eine Zelle dazu befähigen, sich auch noch unter Bedingungen zu vermehren, die im Normalfall zum Zellzyklusarrest führen würden (25). Die Überexpression und Amplifikation verschlechtern die Prognose und reduzieren die Überlebenszeit bei einer HNSCC-Erkrankung (60), (59).

2.1.1.3 Störungen der Zelldifferenzierung und des Zell-Zell-Kontakts

Das Wachstum und die Differenzierung von Zellen sind essentiell abhängig von Retinoiden (Vitamin-A, all-trans Retinsäure u.a.) (37). Störungen der Wechselwirkungen von Retinoiden mit ihren intranukleären Rezeptoren treten früh in der Karzinogenese auf, sodass vermutet wird, dass die Reduktion des Retinoid-Stoffwechsels absolut notwendig für die Entwicklung von malignen Tumoren ist (61). Die Retinoidrezeptoren sind Liganden-gesteuerte intranukleäre Rezeptoren, die als Homo- oder Heterodimere die Transkription von über 500 Genen aktivieren. Zwei Formen, die jeweils noch in verschiedenen Isoformen vorliegen und unterschiedliche bevorzugte Liganden haben, werden unterschieden: Der Retinsäurerezeptor (*retinoic acid receptor*, RAR) und der Retinoid X Rezeptor (*retinoic x receptor*, RXR) (37). Die histologische Progression prämaligener Läsionen hin zum invasiven Karzinom des Kopf- und Halsbereichs ist korreliert mit einem Verlust der RAR- β Expression (62), die durch die Hypermethylierung des Promotors des entsprechenden Gens zustande kommt (63). Eine Behandlung solcher Läsionen mit 13-cis Retinsäure kann die normale RAR- β Expression wiederherstellen und sogar zur Restitution eines normalen epithelialen Differenzierungsprogramms führen (64), (65). Ebendiese Befunde waren ausschlaggebend für die intensive Erforschung der natürlichen und synthetischen Retinoide, insbesondere ihres Potentials zur Chemoprävention von HNSCCs und anderer epithelialer Karzinome. Die Ergebnisse klinischer Studien, die den Einfluss der Retinoide auf Vorstufen des Mundhöhlenkarzinoms und auf postoperativ auftretende Zweittumoren untersuchten, zeigten jedoch widersprüchliche Ergebnisse und die klinische Wirksamkeit einer Retinoidbehandlung konnte nicht nachgewiesen werden (66). Außerdem waren positive Auswirkungen nicht von Dauer, ließen nach Beendigung der Behandlung nach und in bereits bestehenden Karzinomen konnten keine Wirksamkeit nachgewiesen werden (66). Hinzu kommt noch, dass Zellen Resistenzmechanismen gegen die Retinoide entwickeln und dass

die Substanzen in höherer Dosierung toxisch sind. Zusammengenommen erscheint ein erfolgreicher klinischer Einsatz von Retinoiden in der Chemoprävention und Behandlung von Tumoren eher unwahrscheinlich (61).

E-Cadherin ist ein Transmembranprotein, das an den interzellulären Verbindungen in epithelialen Zellverbänden beteiligt ist und deren Integrität sichert. Solche Zell-Zell-Verbindungen werden unter anderem über die extrazellulären Segmente der Proteine benachbarter Zellen hergestellt und über ein Zusammenspiel der zytoplasmatischen E-Cadherin Segmente mit β -Catenin und anderen Proteinen wird eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett gebildet (37). Mechanismen, die Zellen eines Epithels zusammenhalten, müssen notwendigerweise außer Kraft gesetzt werden, um eine Tumorzelle zu invasivem Wachstum zu befähigen (25). Die Dysfunktion der E-Cadherin/Catenin-Komplexe gilt dabei als zentraler Ankerpunkt dieses Kennzeichens der Karzinogenese (67). Der durchaus häufige Verlust der Expression von E-Cadherin bei HNSCC ist korreliert mit der Entdifferenzierung von Tumorzellen, mit dem Vorkommen von Metastasen in Lymphknoten und mit einem höheren Mortalitätsrisiko (68), (69), (70). Die Hypermethylierung des Promotors des E-Cadherin codierenden Gens CDH1 scheint einer der Mechanismen für den Verlust der Expression des Proteins in HNSCC-Zellen zu sein (71), jedoch konnte nicht gezeigt werden, dass sie ein Prädiktor der Mortalität oder für Zweittumore ist (72). Gegenätzlich wird sogar postuliert, dass die Hypermethylierung mit einem signifikant besseren Überleben einhergeht (73).

Die Basalmembran ist eine Matrix aus Kollagen, Glykoproteinen und Proteoglykanen. Sie trennt das epitheliale Gewebe vom darunter liegenden interstitiellen Stroma, das die Blut- und Lymphgefäße enthält – diejenigen Straßen also, entlang derer Tumorzellen Metastasen streuen können. Überschreitet das maligne Wachstum die Basalmembran, wird der Tumor vom *Carcinoma in situ* zum invasiven Karzinom und wächst destruierend über die natürlichen Kompartiment- und Organgrenzen hinweg. Die Tumorzellen müssen für diesen Prozess unter anderem fähig sein, die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix aufzulösen, was z.B. durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Matrixabbau und dessen Inhibition zugunsten des Abbaus geschieht. Die wichtigsten Enzyme des Abbaus stellen die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) dar (37), deren Aktivität über verschiedene Mechanismen, z.B. die örtlich begrenzte Aktivierung, kontrolliert wird. Dabei kann einerseits die inaktive Vorstufen der MMPs sezerniert werden, die nur in

einem begrenzten Bereich und bei Bedarf proteolytisch aktiviert werden kann oder andererseits kann das Matrix abbauende Enzym durch spezifische Rezeptoren an die Zelloberfläche gebunden sein. Außerdem wird die Wirkung der MMPs durch die Sekretion von Inhibitoren, die als TIMPs (*tissue inhibitors of metallo-proteinases*) bezeichnet werden beschränkt (25). Beim HNSCC wurde die Expression von MMPs (Subtypen -2, -9, -13, u.a.) mit einem invasiveren Phänotyp, dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie als Index für verkürztes Überleben in Verbindung gebracht (74), (75), (76). Die Rolle der TIMPs in der Karzinogenese des HNSCCs stellt sich kontrovers dar: Ihre nomenklatorische Bezeichnung als Inhibitoren der MMPs suggeriert zunächst eine tumorsuppressive Funktion, die auch in verschiedenen Studien für TIMP-1 und TIMP-2 bestätigt wurde (77), (76), (78). Jedoch legt eine wachsende Menge experimenteller Befunde nahe, dass die Expression von TIMPs auch bzw. vor allem das invasive Tumorwachstum sowie die Metastasierung forciert und dass sich ihre Expression verschlechternd auf die Prognose der Patienten auswirkt (79), (80), (81), (82). Erklärbar ist dies, da die verschiedenen TIMPs noch etliche andere, teils gegensätzliche Funktionen ausüben, wie z.B. Hemmung, aber auch Beschleunigung der proteolytischen MMP-Aktivierung aus ihren Vorstufen, Repression der Angiogenese, wachstumsfaktorähnliche Stimulierung von Zellen und Induktion sowie Reduktion der Apoptose (83), (84). Klinische Studien, in denen MMP-inhibierende Substanzen additiv zum *treatment-as-usual* bei verschiedenen Tumoren eingesetzt wurden, lieferten bislang keine Evidenz für einen signifikanten Überlebensvorteil (85).

2.1.1.4 Dysregulierte Kontrolle des programmierten Zelltodes

Die Resistenz gegenüber Apoptose ist ein Kennzeichen der meisten, wenn nicht aller malignen Tumoren. Zu den vielen bekannten Regulatoren der Apoptose gehört die Familie der Bcl-2-Proteine, die den intrinsischen Weg der Apoptose reguliert: Sie steuert die Freisetzung von Cytochrom c, das die apoptotische Caspase-Kaskade aktiviert, sowie diverser anderer Proteine aus dem Intermembranenraum der Mitochondrien. Manche Bcl-2-Proteine sind pro-apoptotisch, sie fördern die Cytochrom c Freisetzung. Andere hingegen hemmen die Freisetzung und sind daher anti-apoptotisch. Löst ein Stimulus den intrinsischen Apoptoseweg aus, werden die pro-apoptotischen Familienmitglieder Bax und Bak aktiviert, woraufhin sie

sich innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran zu Oligomeren verbinden und Cytochrom c freisetzen. Die anti-apoptotischen Familienmitglieder, z.B. Bcl-2 selbst und Bcl-X_L, binden und hemmen Bax und Bak und verhindern somit, dass sie Oligomere bilden können. Eine zweite Gruppe pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine, zu denen beispielsweise Bad, Bim, Bid, Puma und Noxa gehören, kann die anti-apoptotischen Familienmitglieder hemmen, auf einen Apoptosestimulus hin Bax und Bak aktivieren und auch den extrinsischen Weg der Apoptose verstärken (25). Etwa 70 % der HNSCCs weisen eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Bcl-2- oder Bcl-X_L-Proteins auf (86), inwieweit sich dies auf die Prognose der Erkrankung auswirkt, ist jedoch unklar: Einige Studien fanden eine Assoziation der Hochregulierung mit besseren klinischen Ergebnissen hinsichtlich des Ansprechens auf Radio- und Chemotherapie, der lokalen Tumorkontrolle und des Überlebens (86), (87). Andere wiederum fanden, dass die Überexpression von Bcl-2 ein starker Prädiktor für das Auftreten eines Rezidives und ein verkürztes Überleben ist (88), (89). Noch andere Studien ergaben keinerlei Evidenz für einen Zusammenhang der Bcl-2-Überexpression mit dem klinischen Ergebnis (90), (91).

2.1.2 Therapie

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels sollen die Grundzüge des therapeutischen Vorgehens bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs erläutert werden. Die darauf folgenden Abschnitte befassen sich, aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit, eingehender mit der Radiotherapie, deren molekularen Auswirkungen und der Entwicklung von Radioresistenz bei dieser Tumorentität. Im letzten Abschnitt dieses Unterkapitels wird das Problem der Resistenzentwicklung gegenüber den EGFR-Inhibitoren beleuchtet.

2.1.2.1 Grundzüge des klinischen Vorgehens

Die wesentlichen Therapieoptionen stellen die operative Tumorentfernung, die Radiotherapie und die Chemotherapie dar. Das konkrete Vorgehen im Einzelfall hängt vom klinischen Stadium der Erkrankung, der Lokalisation des Tumors und von individuellen Patientenvariablen (Allgemeinzustand, Präferenzen des Patienten u.a.) ab (17).

Bei Patienten in einem frühen Stadium der Erkrankung – Stadium 0, I und II nach AJCC (*American Joint Committee on Cancer*); d.h. *Carcinoma in situ* oder kleine Tumoren, kein Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen (92), (93), (94), (95) – wird entweder eine operative Entfernung oder eine Bestrahlungstherapie mit ionisierenden Strahlen (Radiotherapie, RT) empfohlen. Beide Modalitäten erreichen ähnliche Erfolgsquoten, jedoch wird die Tumoroperation aus klinischen Gründen üblicherweise vorgezogen, da bei RT immer das Risiko toxischer Spätfolgen der Bestrahlung – Xerostomie, Osteonekrose der Kieferknochen, Strikturen des pharyngoösophagealen Übergangs u.a. (96) – besteht und bei der therapeutischen Entscheidungsfindung bedacht werden muss. Natürlich spielt auch die operative Zugänglichkeit des Tumor eine entscheidende Rolle bei der Wahl einer Therapiemethode (17). Demzufolge werden Karzinome im Bereich der Mundhöhle eher operativ und die anderen Lokalisationen eher durch Bestrahlung angegangen (17), (97). Eine postoperative Radiotherapie oder eine simultane Chemo-Radiotherapie, auch als CERT (*chemotherapy-enhanced radiation therapy*) (98) bezeichnet, verbessert das klinische Ergebnis, wenn die Ränder des Tumorsektats positiv sind oder einen unzureichenden Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe aufweisen bzw. wenn eine perineurale oder Lymphgefäß-Invasion festgestellt wurde (99).

In den fortgeschrittenen Stadien III und IV des HNSCC nach AJCC– d.h. bei großen Tumoren, bei Tumoren, die destruierend in Nachbarstrukturen hineinwachsen oder bei Vorliegen von Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen (92), (93), (94), (95) – ist eine alleinige operative Tumorentfernung oder Radiotherapie nicht ausreichend, um die Erkrankung zu kontrollieren. Es kommt zu einer hohen Rate an Lokalrezidiven und die Einschränkung der Lebensqualität der Patienten kann durch Verlust der Sprech- und Schluckfunktion erheblich eingeschränkt sein. Es haben sich daher Therapieansätze durchgesetzt, die eine systemische Chemotherapie in lokale Behandlungskonzepte integrieren (17). Eine große Meta-Analyse, die Daten von 16.485 Patienten einschloss, bestätigte, dass von den vielen existierenden Ansätzen, wie eine lokale Therapie mit einer Chemotherapie kombiniert werden kann, die simultane Chemo-Radiotherapie (CERT) für die meisten Patienten am effektivsten ist und gegenüber anderen Vorgehensweisen einen Überlebensvorteil von 6,5 % nach 5 Jahren aufweist (100). Auch postoperativ, im Anschluss also an eine möglichst organerhaltende operative Tumorentfernung, ist die CERT einer alleinigen Bestrah-

lung überlegen, da sie die regionale Tumorkontrolle verbessert. Die Rate schwerer akuter Komplikationen in den Patientengruppen, die eine simultane Chemo-Radiotherapie erhalten hatten, war in diesen Studien allerdings erhöht (bis 41 %) und außerdem konnte ein positiver Effekt der Therapie nur für das krankheitsfreie Überleben und nicht für das Gesamtüberleben gezeigt werden (101), (102), (103).

Patienten, bei denen das Karzinom Metastasen in regionale Lymphknoten gestreut hat (N1 nach TNM Klassifikation oder höher), haben eine signifikant schlechtere Prognose als Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0). Zurecht gilt der Lymphknotenstatus daher als einer der wichtigsten prognostischen Parameter (104). Die Entfernung verdächtiger Lymphknoten, zumeist als *neck dissection* bezeichnet, ist entweder Teil der operativen Tumorentfernung oder wird im Anschluss an eine Chemo-Radiotherapie empfohlen, wenn eine Lymphknotenbeteiligung anzunehmen ist. Werden in der klinischen Untersuchung und mittels bildgebender Methoden (z.B. Computertomographie) keine verdächtigen Lymphknoten gefunden, liegen in rund einem Drittel der Fälle trotzdem Mikrometastasen vor (105), sodass wegen dieser okkulten Lymphknotenbeteiligung auch bei einer N0-Erkrankung eine elektive *neck dissection* sinnvoll erscheint. Jedoch birgt eine solche Operation ein beachtliches Morbiditätsrisiko (96) und Untersuchungen zeigen, dass sich durch genauere Diagnostik die Rate okkulten Lymphknotenbeteiligungen auf 4 % senken lässt (104). Über die klinische Effektivität der elektiven *neck dissection* wird deshalb nach wie vor kontrovers diskutiert (106).

Im Sinne des translationalen Ansatzes der onkologischen Forschung ist zu erwarten, dass sich die weitreichenden Erkenntnisse über die Pathogenese des HNSCC bald auch in der Entwicklung neuer und in der Verbesserung etablierter Therapien widerspiegeln werden. Zweifellos besteht daneben der Bedarf, toxische Therapieeffekte zu minimieren und Biomarker für die klinische Entscheidungsfindung im konkreten Einzelfall zu etablieren (17).

2.1.2.2 Bestrahlungstherapie bei HNSCC-Erkrankungen

Im Vorfeld einer Bestrahlungstherapie steht heute die genaue Abgrenzung des zu bestrahlenden Tumorfelds zum gesunden Gewebe mittels bildgebender Verfahren. Informationen aus computertomographischen Schnittbildern können in

der Therapieplanung mit Datensätzen aus diagnostischen MRT- und PET-Aufnahmen kombiniert werden, um den Tumor in drei Dimensionen darzustellen. Diese computergestützte virtuelle Simulation ermöglicht die Anpassung des Behandlungsvolumens an das Planungszielvolumen und erreicht eine verbesserte Schonung von bestrahlungsempfindlichen Risikoorganen (107).

Das Ausmaß des bestrahlungsinduzierten Zelltodes ist eine Funktion der Dosis. Je größer also das Tumolvolumen ist, desto größer muss auch die anzustrebende Gesamtdosis gewählt werden. Bei größeren Tumoren des HNSCC-Bereichs (T3 und T4 nach TNM-Klassifikation) wird die Bestrahlung typischerweise an fünf Tagen der Woche mit Fraktionen zu je 2,0 Gy durchgeführt, sodass innerhalb von sieben Wochen eine Gesamtdosis von 70 Gy erreicht wird (108). Dieses Fraktionierungsschema kann variiert werden, um Unterschiede in den Reparaturmechanismen zwischen gesunden und Tumorzellen auszunutzen: Getestet wurde einerseits die Hyperfraktionierung, bei der zwei oder drei Fraktionen à 1,10 bis 1,25 Gy pro Tag appliziert werden, wobei eine höhere Gesamtdosis bei verringerten chronisch-toxischen Effekten erzielt werden soll. Und andererseits die akzelerierte Fraktionierung, bei der – mit dem Ziel die Repopulation von Tumorzellen zu verhindern – bei gleichbleibender Gesamtdosis die Gesamtdauer der Bestrahlungstherapie reduziert wird. Erreicht wird dies beispielsweise, wenn die Fraktionsgröße einer konventionellen Radiotherapie mehr als einmal täglich appliziert wird (109). Die veränderten Fraktionierungsschemata verbessern die regionale Tumorkontrolle und es kann ein Trend zu einem verlängerten krankheitsfreien Überleben nachgewiesen werden. Allerdings besteht ein lediglich marginaler Benefit für das Überleben insgesamt im Vergleich zur konventionellen Fraktionierung. Akute Nebenwirkungen der Behandlung traten in klinischen Studien bei den veränderten Fraktionierungsschemata häufiger auf, kein Unterschied bestand aber hinsichtlich der untersuchten Spätfolgen (110). Eine Phase-III Studie, die die veränderte Fraktionierung mit der konventionellen Fraktionierung in der simultanen Chemo-Radiotherapie vergleicht, wurde initiiert. In vorab-Ergebnissen zeigt sich kein Unterschied in der 3-Jahres Überlebensrate (111).

2.1.2.3 Molekularbiologische Folgen der Bestrahlung

Bei der Interaktion mit lebender Materie geben die in der Strahlentherapie üblicherweise genutzten hochenergetischen Photonenstrahlen Energie an das bestrahlte Gewebe ab. Bei diesem als Ionisierung bezeichneten Prozess werden durch die Reaktion der Strahlen mit dem wässrigen Milieu der Zelle freie Radikale, wie beispielsweise $\text{OH}\cdot$ generiert, die Schäden an DNA, RNA und Proteinmolekülen induzieren. Zellen enthalten natürlicherweise Verbindungen, die freie Radikale unschädlich machen. Es handelt sich dabei um Thiole, wie z.B. Gluthation, deren Sulfhydrylgruppen mit den Radikalen reagieren (112).

Nahezu alle radiogenen Gewebsveränderungen sind abhängig von der applizierten Gesamtdosis, dem bestrahlten Volumen und der Fraktionierung (107). Schäden an der Erbsubstanz infolge Bestrahlung treten dabei weniger als Folge der direkten Strahleneinwirkung auf das Erbgut, sondern vielmehr als indirekte Folgeerscheinungen der Reaktion freier Radikale mit der DNA ein (sog. indirekte Ionisierung). Es resultieren Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenmodifikationen, Insertionen, Deletionen, Intra- und Interstrang DNA-DNA-Verbindungen sowie DNA-Protein-Crosslinks (113). Im Normalfall halten Zellen den Zellzyklus an, wenn ein Schaden an der DNA vorliegt, sodass dieser durch Reparaturenzyme beseitigt werden kann. Gelingt die Reparatur nicht oder ist der Schaden am Erbgut sehr groß, wird entweder die Apoptose induziert oder es kommt während einer der nächsten Zellteilungen zum sog. mitotischen Zelltod (s.u.) (107). Wie empfindlich ein Tumor und das umliegende mitbestrahlte gesunde Gewebe auf die ionisierenden Strahlen reagieren, hängt neben der Gesamtdosis und der Fraktionierung von verschiedenen weiteren Faktoren ab: So reduziert die in Tumoren herrschende Hypoxie das Ansprechen auf die Radiotherapie, die fortgesetzte Proliferation von Tumorzellen während der Behandlung führt je nach Wachstumsgeschwindigkeit zu einer unterschiedlich großen Verminderung des quantitativen Bestrahlungseffekts und es ist zudem von großer Bedeutung in welcher Phase des Zellzyklus Zellen ionisierenden Strahlen ausgesetzt sind, da die Empfindlichkeit in der M-Phase am größten und in der S-Phase am geringsten ist (107), (113).

Der strahleninduzierte Zellzyklusarrest kommt durch eine Signalkaskade zustande, bei der es infolge der DNA-Schäden zu einer Aktivierung der ATM Kinase (*ataxia teleangiectasia mutated*) kommt. Infolgedessen werden unter anderem die

Proteinkinasen Chk1 und Chk2 durch Phosphorylierung aktiviert, die ihrerseits eine Aktivierung von p53 auslösen. Wie bereits im Abschnitt 2.1.1.2 genannt, führt die p53 Aktivierung via Steigerung der Expression des CDK-Inhibitors p21 zu einem Zellzyklusarrest beim Übergang von der G1- in die S-Phase. Außerdem können die aktivierten Proteinkinasen Chk1 und Chk2 den Eintritt in die Mitosephase hemmen, indem sie eine inaktivierende Phosphorylierung einer dafür essentiellen Proteinphosphatase aus der Cdc25-Familie katalysieren (25), (114). Inhibitoren der ATM-Kinase sensibilisieren Zellen gegenüber den tödlichen Effekten ionisierender Bestrahlung, da durch den ausbleibenden Zellzyklusarrest DNA-Schäden nicht mehr angemessen repariert werden können. Koffein und andere Methylxanthine inhibieren die ATM-Kinase – allerdings erst bei sehr hohen Konzentrationen, welche in humanem Gewebe *in vivo* nicht erreicht werden können. Substanzen mit höherer Spezifität befinden sich in der Entwicklungsphase (114).

Die strahleninduzierten potentiell tödlichen DNA-Doppelstrangbrüche werden abhängig von der Phase des Zellzyklus entweder durch homologe oder nicht-homologe Rekombination repariert. Die Inhibition des Reparaturvorgangs resultiert in einer gesteigerten Sensibilität gegenüber ionisierender Bestrahlung, die in der Strahlentherapie genutzt werden kann, wenn die DNA-Reparatur selektiv in Tumorzellen gehemmt wird (115). Die Radiosensibilisierung durch das Chemotherapeutikum Cisplatin, das auch in der simultanen Chemo-Radiotherapie bei HNSCC-Erkrankungen genutzt wird, scheint zumindest in Teilen auch auf seiner DNA-Reparatur inhibierenden Wirkung zu beruhen (116).

Zum großen Teil erfolgt der Zelltod durch ionisierende Strahlen infolge einer sog. mitotischen Katastrophe als mitotischer Zelltod (114). Ein mitotischer Zelltod tritt ein, wenn eine Zelle trotz weitreichenden DNA-Schadens von der G2-Phase des Zellzyklus in die Mitose eintritt. Die Induktion des programmierten Zelltodes tritt dann entweder in der Metaphase ein, wenn der Spindelapparat nicht korrekt aufgebaut werden kann oder aber in der frühen G1-Phase, nachdem die Segregation der Chromosomen in die Tochterzellen nicht korrekt verlaufen ist. Wie genau es beim mitotischen Zelltod zur Induktion der Apoptose kommt ist noch weitgehend unklar. Wird er aber nicht induziert, resultieren aneuploide Zellen mit möglicherweise onkogenem Potential (117). Neben dem mitotischen Zelltod ist wohl auch die strahleninduzierte Apoptose ein grundlegender Mechanismus der Strahlenwirkung (107), (118).

2.1.2.4 Mechanismen der Radioresistenz

Bislang existiert keine einheitliche Definition der Radioresistenz von Tumoren. Vorgeschlagen wurde jedoch mit diesem Terminus solche Tumorrezidive zu bezeichnen, die innerhalb eines Jahres nach einer radikalen Radiotherapie an identischer Stelle auftreten und die gleichen histologischen Eigenschaften wie der Primärtumor besitzen (119). Welche Faktoren auf molekularer Ebene zu einer solchen Therapieresistenz von HNSCCs beitragen, ist Gegenstand intensiver Forschung. Es ist wahrscheinlich, dass für die Radio- wie für die Chemoresistenz ein komplexes Muster an Veränderungen grundlegend ist (120). Bisher bekannte Mechanismen, die Radioresistenz vermitteln, lassen sich in drei Gruppen einteilen: (a) Intrinsische Faktoren, also natürlicherweise vorkommende Faktoren, die die Radiosensibilität beeinflussen; (b) induzierte Faktoren, die Merkmale der Malignität von Tumorzellen sind und durch ionisierende Strahlen verstärkt werden sowie (c) Faktoren, die in Zusammenhang mit der im Tumorgewebe vorliegenden Hypoxie stehen (121).

Die Fähigkeit von Zellen strahleninduzierte DNA-Schäden wie die potentiell letalen Doppelstrangbrüche zu reparieren, ist Teil der intrinsischen Radioresistenz. Ergebnisse von Experimenten, in denen die Genexpression bzw. die Proteinfunktion inhibiert wurden, lassen vermuten, dass an der intrinsischen Radioresistenz außerdem beteiligt sind: der IGF-1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) (122), der Erhalt der strukturellen Konformität Radioresistenz-vermittelnder Proteine durch das Hsp90 (*heat shock protein 90*) (123) und der Histon-Acetylierungsstatus (124), (125).

Die veränderten Expressionsmuster von Protoonko- und Tumorsuppressorgenen in Tumorzellen sind häufig verantwortlich für ihre verminderte Sensibilität gegenüber ionisierender Bestrahlung. Zusätzlich belegen viele Studien, dass die Bestrahlung neben ihren erwünschten tumorreduzierenden Effekten auch induzierend auf onkogene Signalkaskaden wirken kann, sodass es unter einer Radiotherapie zu einer akzelerierten Tumorzellrepopulation kommt (126). Zu den durch Bestrahlung aktivierten Onkogenen gehört der EGFR und auch die typischerweise in einer Radiotherapie verwendeten Fraktionen von 1-2 Gy sind in der Lage via EGFR die Mitglieder MAP-Kinase Superfamilie (ERK, JNK, p38 MAPK) zu aktivieren (127), (128), (129), die – wie bereits dargestellt – die Karzinogenese fördern. Experimentelle Befunde weisen darauf hin, dass diese Aktivierung durch

eine bestrahlungsinduzierte Ausschüttung des TGF α (*transforming growth factor α*) zustande kommt, der in autokriner Funktionsweise als Ligand den EGFR stimuliert (130), (131). Der EGFR ist ein Vertreter der ErbB Tyrosinkinase Rezeptoren der Plasmamembran und auch andere Mitglieder dieser Familie werden infolge einer Bestrahlung aktiviert (132). So kommt es infolge der Kinaseaktivität von ErbB-3 zu einer Aktivierung der PI3K/AKT-Signalkaskade (121), die über die Stimulation von Zellwachstum, Proliferation, Überleben und Motilität die Progression eines Tumors antreibt (133). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ionisierende Bestrahlung die Freisetzung des VEGF (*vascular endothelial growth factor*) verstärkt, wodurch die Radioresistenz von Endothelzellen gesteigert wird (134). Außerdem bedingen die bei der Bestrahlung entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies die Expression des HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) (135), von dem im folgenden Abschnitt noch die Rede sein wird.

Eine substantielle Datenmenge belegt, dass in nahezu allen soliden Tumoren unregelmäßig verteilte Populationen hypoxischer Zellen vorkommen, die bei lokal fortgeschrittenen Erkrankungen einen Anteil von 50-60 % der Tumormasse ausmachen können (136). Diese Hypoxie resultiert aus (a) Perfusionsdefiziten, die aufgrund der strukturellen Abnormität von Tumorgefäßen entstehen, aus (b) vergrößerten Diffusionsdistanzen, sodass Zellen in der Peripherie eines versorgenden Blutgefäßes weniger Sauerstoff erhalten, als sie benötigen und aus (c) einer tumor- und / oder therapieinduzierten Anämie (136). Unter hypoxischen Bedingungen reduzieren gesunde, wie auch Tumorzellen ihren Proteinstoffwechsel, halten ihren Zellzyklus an, induzieren den programmierten Zelltod und unter anoxischen Bedingungen kommt es zu Zellnekrosen (136). In Tumorzellen werden durch Hypoxie allerdings auch genetische und epigenetische Veränderungen induziert, welche zu einer Anpassung an die Minderversorgung führen, eine fortgesetzte Proliferation ermöglichen und in Konsequenz einen aggressiveren Phänotyp hervorbringen (137). Für das HNSCC ist die Tumorphypoxie Prädiktor einer negativen Prognose hinsichtlich des Gesamt- und rezidivfreien Überlebens sowie hinsichtlich des Erfolgs einer Radiotherapie (138). Zu Beginn der Erforschung der Tumorphypoxie stand zunächst die Beobachtung, dass hypoxische Zellen wesentlich weniger empfindlich auf ionisierende Bestrahlung reagieren. Folgerichtig gehört Sauerstoff zu den wichtigsten radiosensibilisierenden Substanzen überhaupt. Über den zugrundeliegenden Prozess wird spekuliert, dass es durch die vermehrte Bildung aggress-

siverer Peroxyradikale unter normoxischen Bedingungen zu einem ausgedehnten DNA-Schaden kommt (113). Ein Schlüsselmolekül der Anpassung von Zellen an Hypoxie ist der bereits im vorangegangenen Abschnitt angeführte Transkriptionsfaktor HIF1 α , der die Produktion wesentlicher Mediatoren der Neoangiogenese (VEGF, NO-Synthase) und der Stoffwechsellanpassung (Glucose-Transporter, Laktat-Dehydrogenase) induziert (137). Die Aktivität von HIF1 α wird nicht allein durch den intrazellulären Sauerstoffgehalt, sondern auch durch die Aktivität intrazellulärer Signalkaskaden reguliert. So wird die HIF1 α -Expression durch die Ligandenbindung an Tyrosinkinase Rezeptoren (EGF, IGF1, u.a.) gesteigert und eine Blockade der HIF1 α -abhängigen Gene kann durch Inhibitoren der PI3K/AKT-Signalkaskade ausgelöst werden (139). Therapeutika, die selektiv die Tumorphoxie reduzieren und das Ansprechen von Tumoren auf Radiotherapie verbessern können, befinden sich noch in der Entwicklungsphase (140). Die bereits etablierten Inhibitoren des EGFR (kleinmolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonale Antikörper) entfalten ihre Wirkung zumindest teilweise auch über die Verbesserung der Tumoroxygenierung, insbesondere in Kombination mit einer Radiotherapie (141). Dabei vermindert der EGFR-Inhibitor die Ausschüttung von VEGF und verhindert die Neubildung abnormaler Tumorgefäße. Dies kann zu einer Normalisierung der Tumorvaskularisation und somit dessen Perfusion beitragen (142).

Ein weiterer Faktor, der zur Radioresistenz von Tumoren beitragen kann, ist die übermäßige Expression von Prostaglandinen, die die strahleninduzierte Apoptose zu verhindern und zelluläre Reparaturmechanismen zu begünstigen scheinen. Eine Inhibition der Prostaglandinsynthese durch Cyclooxygenase-Inhibitoren führt indes zu einer gesteigerten Radiosensitivität von Tumorzellen (143). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Steigerung sind jedoch nur teilweise bekannt. Postuliert werden die Inhibition der Tumorangio-genese durch eine verminderte VEGF-Expression (144), eine Inhibition der DNA-Reparatur (145) und der PI3K/AKTSignalkaskade (146), die Verschiebung des Gleichgewichts pro- und anti-apoptotischer Proteine zugunsten der pro-apoptotischen (146), sowie eine Hemmung des bestrahlungsinduzierten G2-/M-Zellzyklusarrests, welcher die Wahrscheinlichkeit des bestrahlungstypischen Zelltodes in der Mitose-Phase erhöht (147). Bspw. ist die Zugabe von Flurbiprofen zum Zellkulturmedium in der Lage, die durch ionisierende Strahlung induzierte Ausschüttung von VEGF und bFGF zu reduzieren. Ein Effekt i.S. der reduzierten Entwicklung von Strahlenresistenz der untersuchten HNSCC-

Zelllinien ist anzunehmen (148). Eine erst kürzlich veröffentlichte klinische Phase I/II Studie, bei der Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom zusätzlich zu einer Radiotherapie mit dem COX-2 Inhibitor Celecoxib behandelt wurden, zeigte eine gute Verträglichkeit der Therapie – um Rückschlüsse auf die Effizienz einer solchen Ko-Medikation zu ziehen, war die Fallzahl jedoch zu gering (149).

2.1.2.5 Inhibitoren des EGFR

Wie bereits unter 2.1.1.1 dargestellt werden EGFR-Inhibitoren in Form von monoklonalen Antikörpern oder niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren heute mit gewissem Erfolg in die gängigen Therapieregime integriert, ohne jedoch einen echten Durchbruch mit diesen neuen Tumormedikamenten erzielt zu haben.

Es wird angenommen, dass die Entwicklung von Resistenzmechanismen, die die Wirksamkeit der Antikörper aufheben, ursächlich für den nicht dauerhaften Therapieerfolg sind (150). Das Gastrin-freisetzende Peptid (*gastrin-releasing peptide*, GRP) und sein Rezeptor GRPR sind Teil einer autokrinen Signalkaskade und ihre Integration in die EGFR-Kaskade prädisponiert sie als Zielmolekül zur Überwindung der Resistenz gegenüber den EGFR-Antagonisten: GRP stimuliert die c-src-abhängige Spaltung von EGFR-Proliganden (s. nächster Abschnitt) und somit die EGFR-Phosphorylierung sowie die MAPK-Aktivierung. Die Aktivierung der GRP/GRPR-Kaskade ist ein früh in der HNSCC-Karzinogenese auftretendes Ereignis (151). Zellkulturexperimente konnten zeigen, dass die Blockade von GRPR die anti-tumorigenen Effekte der EGFR-Rezeptoren verstärkt (152).

Ein anderes Zielmolekül für den Zweck der Überwindung der Resistenz gegenüber den EGFR-Antagonisten ist die Blockade der Tyrosinkinase c-src (ein Akronym aus *cellular* und *sarcoma*), die ein integraler Bestandteil der GRP-induzierten EGFR-Aktivierung ist (153). Dabei sind c-src-blockierende Substanzen in der Lage diese Aktivierung und die konsekutive MAPK-Aktivierung einzuschränken (154) und Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten lassen darauf schließen, dass der kleinmolekulare c-src-Inhibitor Dasatinib in der Lage sein könnte, die Effekte einer Kombinationstherapie mit Bestrahlung und dem monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab zu potenzieren (155). Eine Phase II Studie mit Dasatinib als alleinigem Therapeutikum zeigte keine signifikante Aktivität bei Patienten mit lokal fortge-

schrittenem oder metastasiertem HNSCC, die sich zuvor einer platinbasierten Chemotherapie unterzogen hatten (156). Klinische Studien in Kombination mit EGFR-Antagonisten stehen noch aus.

2.2 Die Rolle der Cyclooxygenasen und ihrer Inhibitoren in der Karzinogenese

1982 wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin an Sune Bergström, Bengt Ingemar Samuelsson und John Robert Vane für ihre „bahnbrechenden Arbeiten über Prostaglandine und nahe verwandter biologisch aktiver Substanzen“ verliehen (157). Sie entdeckten den Prostaglandin-Syntheseweg (158), (159), (160) und fanden, dass die Cyclooxygenase (COX) das pharmakodynamische Zielmolekül der Nichtsteroidalen Antirheumatika (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) ist (161). Es sind zwei Gene bekannt, die für zwei verschiedene Isoformen der COX, COX-1 und COX-2, codieren. Über die Existenz einer dritten Isoform des Enzyms, COX-3, die für die Wirkung von Paracetamol verantwortlich sein soll, wird diskutiert (162), (163), (164). Es handelt sich aber am wahrscheinlichsten um eine Variante der COX-1, die durch alternatives Splicen der COX-1 mRNA entsteht und deren Existenz in humanem Gewebe als gesichert gilt (164).

Zwar unterscheiden sich die Isoformen COX-1 und COX-2 hinsichtlich des Expressionsmusters und ihrer Regulierung (165), bei der Verallgemeinerung, dass COX-1 konstitutiv exprimiert werde und COX-2 die induzierbare Form des Enzyms darstelle, handelt es sich jedoch um eine Simplifizierung (166), (167). In den Nieren sowie in Teilen des ZNS kommt konstitutiv exprimierte COX-2 vor (168), (169) und die Expression von COX-1 lässt sich beispielsweise durch Phorbolster (polyzyklische Alkoholderivate, die die Wirkung von kanzerogenen Stoffen erhöhen) und Dexamethason (ein Corticosteroid-Derivat) induzieren (165). Die Cyclooxygenasen vermitteln die enzymatische Umwandlung von Arachidonsäure in zyklische Endoperoxide, die die Vorstufen für Prostacyclin (PGI₂), Prostaglandine (PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂) und Thromboxane (TXA₂, TXB₂) darstellen (170). Diese bioaktiven Derivate der Arachidonsäure werden zusammengenommen auch als Prostanoiden bezeichnet und spielen wichtige Rollen in der Regulation von Inflammation, Schmerz, Vaso- und

Bronchotonus, renaler Funktionen, der Angiogenese sowie beim Schutz der gastralen Mukosa gegen die Magensäure (171). Die beiden COX-Isoformen sind sich auf molekularer Ebene sehr ähnlich; ein Unterschied mit Folgen für die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Enzyme liegt jedoch in ihren jeweiligen katalytischen Zentren: Durch den Austausch einer Aminosäure, öffnet sich bei der COX-2 eine hydrophobe Seitentasche und die sog. spezifischen COX-2 Inhibitoren binden – im Gegensatz zu den klassischen NSAID – nur an dieser alternativen Stelle (171). Durch die selektive Hemmung kann die gastrointestinale Toxizität der COX-Inhibitoren, gegenüber den konventionellen NSAID um 50 % gesenkt werden (172). Studien mit den COX-2 Inhibitoren ergaben jedoch eine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos durch diese Wirkstoffklasse. In weiteren Untersuchungen konnte jedoch auch für die konventionellen NSAIDs eine Erhöhung der Rate kardiovaskulärer Ereignisse durch die Pharmakotherapie nachgewiesen werden (172). Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass die Langzeiteinnahme von NSAIDs das Risiko reduziert, an einem Karzinom von Kolon und Rectum, Ösophagus, Magen, Brust, Lunge, Prostata, Blase oder Ovar zu erkranken oder zu versterben (173), (174), (175). Aussagekräftige klinische Phase III Studien an großen Patientenkollektiven existieren für die Untersuchung der Auswirkung einer Einnahme von COX-Inhibitoren im Hinblick auf die Entstehung und Therapie kolorektaler Karzinome. Sie kommen zu heterogenen Ergebnissen. Einerseits fand sich bei Patienten, die nach einer Adenomabtragung mit COX-2 Inhibitoren behandelt wurden ein signifikanter Effekt im Sinne einer Chemoprävention der Neuentstehung von Adenomen (176), (177). Andererseits konnte diese präventive Wirkung in einer Studie, die Patienten mit Stadium II und III kolorektalen Karzinomen einschloss, nicht bestätigt werden (178): Nach einer Tumoroperation mit kurativer Intention und adjuvanter Therapie erhielten die Patienten 20 mg des COX-2 Inhibitors Rofecoxib pro Tag oder ein Placebo. Die Autoren rechneten in Ihrer Fallzahlplanung mit dem Einschluss von 7000 Probanden, die entweder das Medikament oder das Placebo für 3 bis 5 Jahre einnehmen sollten. Allerdings wurde die Studie wegen der internationalen Rücknahme von Rofecoxib vom Markt – seiner kardiovaskulären Nebenwirkungen wegen – abgebrochen, sodass die Therapiedauer der 2434 Patienten, die bis dahin eingeschlossen worden waren, im Median nur 7,4 Monate für das Medikament und 8,2 Monate für das Placebo betragen hatte. Die Autoren fanden keinen Unterschied zwischen der Placebo- und der Medikamentengruppe hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Häufigkeit von Tumorrezidiven (178). Einschränkung

wird jedoch argumentiert, dass das Kollektiv der Probanden für die reduzierte Fallzahl zu heterogen und dass die Exposition gegenüber dem Medikament möglicherweise zu kurz gewesen sei (179). Um weiterführende Studien zur Evaluation der COX-Inhibitoren in der Chemoprävention und in der adjuvanten Tumorthherapie durchführen zu können sollten zukünftig Probanden mit atherosklerotisch-bedingten kardiovaskulären Erkrankung ausgeschlossen werden (179).

Erste Hinweise, dass die Cyclooxygenasen eine Rolle in der malignen Zelltransformation und Karzinogenese spielen, ergaben sich aus einem Mausmodell für die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP): Diejenigen Tiere, die sowohl die für die FAP verantwortliche Mutation im Gen des APC-Tumorsuppressors trugen, als auch ein inaktiviertes Gen für die Cyclooxygenase-2 aufwiesen, hatten weniger und kleinere Dünn- und Dickdarmpolypen – einhergehend mit einem geringeren Karzinomrisiko – als diejenigen mit dem Cyclooxygenase-2 Wildtyp-Gen (180). Der Fokus des wissenschaftlichen Interesses lag letztthin vornehmlich auf der Erforschung der COX-2, jedoch haben auch Substanzen, die im wesentlichen die COX-1 hemmen, protektive Effekte gegen die Entwicklung von Tumoren gezeigt und man fand außerdem, dass FAP-Mäuse mit inaktivem COX-1 Gen die gleiche Reduktion der Tumorbildung zeigen, wie ihre Artgenossen mit inaktivem COX-2 Gen (181).

Aufgrund verschiedener Beobachtungen ist anzunehmen, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂) der wesentliche Mediator einer Cyclooxygenase-abhängigen Förderung der Karzinogenese ist: Zum einen ist vor allem die PGE₂-Konzentration in Gewebeproben aus COX-2 überexprimierenden Kolonkarzinomen erhöht, zum anderen ist PGE₂ sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* in der Lage die Angiogenese zu induzieren und die Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen zu steigern. Außerdem zeigten nur PGE₂-Rezeptor *knockout* Mäuse verglichen mit Wildtypkontrollen eine reduzierte Anzahl aberranter Foci in den Krypten ihres Kolonepithels. Für *knockout* Mäuse, denen andere Typen von Prostaglandin-Rezeptoren fehlten, war dies nicht der Fall (166). Ebenso könnte PGE₂ zusätzlich zur Aktivierung des eigenen Rezeptors auch über den EGFR agieren (182).

Die Förderung der Angiogenese sowie die Erhöhung der Resistenz gegenüber Apoptose stehen im Vordergrund der das Tumorstadium fördernden Mechanismen der Cyclooxygenasen, wobei die direkte und indirekte Stimulation der Angiogenese möglich sind (183). Einerseits führt die Überexpression der COX-2 via

der dadurch erhöhten Prostaglandinspiegel indirekt zur Verstärkung der pro-angiogenetischen Prostaglandinwirkungen (184) und andererseits führt sie auch direkt zur Induktion der Produktion von Angiogenesefaktoren wie VEGF, PDGF, bFGF und TGF- β (185). Zudem sind COX-Inhibitoren in der Lage durch die Blockade der Angiogenese das Tumorwachstum zu reduzieren (186). Diese Blockade konnte sogar in – mit Endothelzellen ko-kultivierten – Tumorzellen nachgewiesen werden, die selbst gar keine COX exprimierten. Hier reduzierte die COX-1 Inhibition in den Endothelzellen mit *anti-sense* Oligonukleotiden die Gefäßneubildung, obwohl die Tumorzellen in großem Maße Angiogenesefaktoren ausschütteten (183).

Hinsichtlich eines Zusammenhangs der COX-Expression mit der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Apoptose-induzierenden Mechanismen stand zunächst die Beobachtung, dass NSAIDs in Zellkulturen Apoptose erzeugen können (187). Später wurde gefunden, dass intestinale Epithelzellen resistenter gegenüber Butyrat-induzierter Apoptose sind, wenn sie COX-2 konstitutiv exprimieren. Die erhöhte Resistenz war dabei hervorgerufen durch die Expressionssteigerung der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und TGF- β , wobei die Behandlung mit dem nicht-selektiven COX-Inhibitor Sulindac die erhöhte Resistenz wieder aufheben konnte (188). Etliche Studien an Zellkulturen und in Tiermodellen konnten seither die Erhöhung der Resistenz gegenüber Apoptose durch die COX-2 und die Apoptose-induktion durch NSAIDs bestätigen (166). Auch die Überexpression der COX-1 sowie die Zugabe von PGE₂ zum Zellkulturmedium zeigten eine Erhöhung der Apoptose-Resistenz (189), (190). Für die Apoptoseinduktion durch NSAIDs werden der Abfall der zellulären PGE₂-Spiegel und die erhöhte Arachidonsäure-Konzentration verantwortlich gemacht (191). Letztere kann zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und zudem zur Produktion von Ceramid führen. Beide Substanzen sind potente Induktoren des apoptotischen Zelltodes (192), (193).

Nicht immer ist die Induktion der Apoptose durch NSAIDs durch die Hemmung der COX-Enzyme erklärbar, sodass auch verschiedene Cyclooxygenase-unabhängige Wirkmechanismen der NSAIDs postuliert werden. In einer Übersichtsarbeit (194) werden unter den COX-2 unabhängigen Mechanismen subsumiert:

- Verminderung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B

- Veränderung des Gleichgewichts pro- und anti-apoptotischer Proteine zugunsten der pro-apoptotischen (z.B. Bax- und Bak-Hochregulierung, Aktivierung der Caspase-8/Bid- sowie der p53-Signalkaskade)
- Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Wegs der Apoptose
- Inhibition des Proteasoms
- Zellzyklusarrest und
- Aktivierung von Stresskinasen

Es ist jedoch davon auszugehen, dass COX-unabhängige Effekte, verglichen mit den COX-abhängigen Effekten, erst bei viel höheren Konzentrationen zum Tragen kommen und dass sie in den meisten Fällen spezifisch für den einzelnen Inhibitor sind und daher nicht ohne weiteres auf die gesamte Wirkstoffklasse übertragen werden können (166). Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor Flurbiprofen durchgeführt, daher werden im folgenden Abschnitt gezielt dessen bereits vorbeschriebenen Auswirkungen auf das Wachstum von Tumoren betrachtet.

2.2.1 Der Cyclooxygenase-Inhibitor Flurbiprofen

Das Propionsäurederivat Flurbiprofen (2-[2-fluoro-4-biphenyl]-propionsäure) ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der NSAIDs. Es ist eine chirale Verbindung, die als 1:1 Gemisch des R- und S-Enantiomers (Racemat) vorliegt. Flurbiprofen hemmt beide Isoformen der Cyclooxygenase, wobei die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für die COX-1 mit $0,04 \mu\text{M}$ und für die COX-2 mit $0,51 \mu\text{M}$ beschrieben ist. Die IC_{50} ist diejenige Konzentration, bei der die enzymatische Aktivität zu 50 % gehemmt ist. Das Verhältnis von COX-1 zu COX-2 Inhibition durch Flurbiprofen entspricht demnach einer etwa zehnfachen Selektivität für die COX-1 (195), (196). Das S-Enantiomer ist dabei ein wesentlich stärkerer Inhibitor der Cyclooxygenasen als das korrespondierende R-Enantiomer, das in therapeutischer Dosierung keine Reduktion der Prostaglandinsynthese verursacht (197)

In Tiermodellen konnten tumorsuppressive Wirkungen von Flurbiprofen gezeigt werden. Bei einer Flurbiprofen-Vorbehandlung von Mäusen, denen zu einem späteren Zeitpunkt Tumorzellen injiziert wurden, war das Tumorstadium reduziert (198), (199). Und eine Behandlung mit der Substanz, wenn die Tiere bereits Tumoren

exprimierten oder die Tumorzellinjektion bereits erfolgt war, erbrachte eine substantielle Wachstumsverzögerung des Tumors durch eine additional Flurbiprofenbehandlung im Vergleich zur alleinigen Chemo- und Radiotherapie (198), eine reduzierte Tumorinzidenz (200) und eine geringere Rate spontaner Tumormetastasen (201).

Wie für die anderen Substanzen aus der Gruppe der NSAID gelten hinsichtlich der tumorsuppressiven Wirkungen auch für Flurbiprofen die o.g. COX-abhängigen Mechanismen. Es existiert zudem noch eine vergleichsweise große Datenmenge, die COX-unabhängige und weitestgehend flurbiprofenspezifische Mechanismen nahelegt. Erste dahingehende Hinweise lieferten Experimente mit den aufgereinigten Enantiomeren: Obwohl nur das S-Enantiomer die Cyclooxygenase inhibiert, sind sowohl das S- als auch das R-Enantiomer in der Lage im Tiermodell die Proliferation von Kolonzellen zu reduzieren (202).

Außerdem konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die in Flurbiprofen enthaltene Carboxylgruppe eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung bedingt (203), was zum Absinken des ATP-Gehalts der Zelle und somit zur Reduktion ihrer Proliferationsgeschwindigkeit führt. Zudem entsteht durch diese Entkopplung Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches das pro-apoptotische Protein Bax induziert. Bax seinerseits hemmt das anti-apoptotische Protein Bcl-2 und führt zum verstärkten Ausstrom von Cytochrom c aus dem Zwischenraum der mitochondrialen Membranen, was schließlich den programmierten Zelltod induziert (204).

Flurbiprofenbedingte Veränderungen hinsichtlich der Progression von gesunden und von Tumor-Zellen durch den Zellzyklus sind beschrieben. In Medullo- und Glioblastomzellen bewirkt Flurbiprofen ein Verharren in der S-Phase und zusätzlich fällt die Konzentration von Cyclin-B ab, das sonst zusammen mit der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK-1) frühe Mitose-Vorgänge, wie beispielsweise die Chromatin-Kondensierung, vorantreibt (205). Das Abfallen des Cyclin-B Levels weist auf eine Blockierung des Übergangs von der S- in die G2- und M-Phase durch Flurbiprofen hin. In Kolonkarzinomzellen lösen R- und S-Flurbiprofen einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase aus, der u.a. assoziiert ist mit der Aktivierung der pro-apoptotischen c-Jun N-terminalen Kinase JNK und einer Verminderung der Expression des für den G1/S-Übergang essentiellen Cyclin D1 (206).

Die Ergebnisse von Experimenten mehrerer Arbeitsgruppen legen zudem nahe, dass Flurbiprofen die Expression des Tumorsuppressors p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR) steigert. Der p75 Neurotrophin-Rezeptor ist ein Glykoprotein, das als Suppressor des Tumorwachstums und der Metastasenbildung identifiziert wurde (207), (208). Er besitzt eine sog. intrazelluläre Todesdomäne, die Apoptose initiieren und das Zellwachstum inhibieren kann (209). R-Flurbiprofen erhöht die Konzentration von p75NTR (210). Da das R-Enantiomer wie o.a. nicht in der Lage ist die COX-Enzyme zu hemmen, handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um eine COX-unabhängige Wirkweise von Flurbiprofen. Die erhöhte p75NTR-Expression kommt durch eine Stabilisierung seiner mRNA zustande (211). Diese ist abhängig von der durch R-Flurbiprofen verstärkten Expression der p38 Mitogen aktivierten Protein Kinase (p38 MAPK) und der von ihr abhängigen Kinasen MK-2 und MK-3 (211). Möglicherweise ist die Translokation des mRNA-stabilisierenden Proteins HuR vom Zellkern in das Zytoplasma, die durch die p38 MAPK-Signalkaskade aktiviert wird, für die Stabilisierung der p75NTR-mRNA durch R-Flurbiprofen verantwortlich (211). Die Bedeutung von p75NTR für die tumorsuppressiven Wirkungen von Flurbiprofen werden durch Experimente unterstrichen, in denen die Blockade der p75NTR-Expression durch siRNA die tumorsuppressiven Wirkungen von Flurbiprofen minimierte (212).

Unabhängig von der Cyclooxygenase-Inhibition ist auch die Steigerung der intrazellulären Konzentration der tumorsuppressiven 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (15-PGDH) durch Flurbiprofen. Diese Konzentrationserhöhung scheint sowohl durch eine gesteigerte Expression als auch durch eine verminderte Degradation des Enzyms bedingt zu sein (213). Die 15-PGDH ist am katalytischen Abbau der Prostaglandine wesentlich beteiligt und ihre tumorsuppressiven Wirkungen konnten bereits gezeigt werden (214), (215), (216). Es ist anzunehmen, dass die verminderte Degradation der 15-PGDH durch eine flurbiprofenbedingte reduzierte Expression der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9), die 15-PGDH abbaut und inaktiviert, zustande kommt (213). Zusätzlich konnte von den Autoren auch eine Induktion des MMP-9 inhibierenden Gewebeinhibitors der Metalloproteasen 1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*, TIMP-1) durch Flurbiprofen gezeigt werden (213). Die verstärkte MMP-9 Inhibition könnte also zusätzlich zur verminderten MMP-9 Expression zur Stabilisierung des Tumorsuppressors PGDH-15 durch Flurbiprofen beitragen.

2.3 Proteomik und Phosphoproteomik

Das Proteom beschreibt die Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus in ihrer Zahl und Konzentration, zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen. Diese Definition wurde in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts vom Pionier der Proteomforschung Marc Wilkins geprägt. Seither hat sich der Wissenschaftszweig der Proteomforschung durch die Entwicklung sensitiverer und exakterer Methoden rasant weiterentwickelt (217), (218). Die Möglichkeit sich direkt mit den Proteinen als den Produkten von Genen sowie ihren Funktionen und Interaktionen auseinander zu setzen, erlaubt zusammen mit den Erkenntnissen der genomischen Forschung einen tieferen Einblick in das hochdynamische biologische System der Zelle. Dies rührt vor allem daher, dass die quantitative Expression eines Gens, gemessen an der Konzentration der entsprechenden mRNA, weniger gut mit der tatsächlichen Konzentration (und Aktivität) des zugehörigen Proteins korreliert. Außerdem können Isoformen von Proteinen, die durch posttranslationale Modifikationen entstanden sind sowie alternative Splicevarianten – die durch die alleinige Genanalyse nicht erfasst werden können – eine differentielle Lokalisation und Funktion zur Folge haben (219), (220). Die Proteine sind also die eigentlichen Effektoren einer Zelle. Dies ist der entscheidende Aspekt, der die Notwendigkeit der Proteomanalyse für die molekulare systembiologische Forschung belegt.

Die Proteinphosphorylierung gehört zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen, da sie die Aktivität, Struktur und den Aufenthaltsort von Proteinen innerhalb der Zelle kontrollieren und regulieren kann. Das Anfügen und Entfernen von Phosphatgruppen an die Proteine, die intrazelluläre Signalkaskaden bilden – gewissermaßen ein An-/Ausschalter – trägt wesentlich zur Regulierung der Signaltransduktion in Prozessen von Zellteilung, -wachstum und -differenzierung sowie der Apoptose bei (25), (221). Es ist anzunehmen, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt etwa ein Drittel bis die Hälfte der Proteine einer humanen Zelle phosphoryliert vorliegen (25), (222), (223). Bei der Regulation der Proteinaktivität durch Phosphorylierung handelt es sich um einen hochkomplexen, dynamischen Prozess. Tatsächlich wird die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Hunderten Kinasen bzw. Phosphatasen unterschiedlicher Spezifität bewerkstelligt (25) und oftmals besitzt ein Protein mehrere Phosphorylierungsstellen (sog.

phosphosites), die zudem Ziele unterschiedlicher Kinasen und Phosphatasen sein können und auch voneinander verschiedene biologische Funktion haben können (224). Krebserkrankungen können – betrachtet man die molekulare Ebene – als Erkrankungen der intrazellulären Signalkaskaden charakterisiert werden (225), in denen abnormale Prozesse der Proteinphosphorylierung sowohl als Folge als auch als Ursache der Erkrankungen von größter Relevanz sind (223). Die Dysregulation von Proteinkinasen in Krebszellen leistet indes einen entscheidenden Beitrag zu den abnormalen Phosphorylierungsmustern und auch als Zielmoleküle für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente eignen sich die Kinasen besonders gut (223).

Ziel der Phosphoproteomik ist nicht nur die Identifizierung von Phosphoproteinen, sondern auch die Bestimmung der Position von Phosphorylierungsstellen innerhalb eines betrachteten Proteins, die Identität der jeweils phosphorylierenden Kinase sowie die Quantifizierung der Phosphorylierung unter definierten unterschiedlichen Bedingungen. Dabei wird eine Antwort auf die Frage nach der biologischen Relevanz dieser oder jener Phosphorylierung gesucht (225).

2.3.1 Auftrennung von Proteingemischen durch zweidimensionale Elektrophorese

Üblicherweise liegen die Proteine der zu analysierenden Proben als heterogenes Gemisch und in erheblich unterschiedlichen Konzentrationen (bis zu zehn Größenordnungen) vor (226). Zu Beginn eines Experiments im Bereich der Proteomik mit solch komplexen Proben wie einem Zelllysate steht daher häufig eine Auftrennung des Gemischs. Eine gängige Methode ist die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D PAGE, kurz auch 2DE), bei der die Proteine des Gemischs in einem ersten Schritt ihrem isoelektrischen Punkt entsprechend (1. Dimension) vorfraktioniert und in einem zweiten Schritt nach ihrem Molekulargewicht (2. Dimension) durch eine Gelelektrophorese separiert werden. Wird das Gel im Anschluss mit einem geeigneten Farbstoff behandelt, entsteht ein zweidimensionales Bild des Proteoms, in dem die Proteine und ihre Isoformen als Punkte – im Fachjargon als Spots bezeichnet – zu erkennen sind. Eine Quantifizierung der Spots und auch der Vergleich unterschiedlich behandelter Proben einer Versuchsanordnung ist durch die Verwendung spezialisierter Software möglich (227). Der

Vergleich von Proteinmustern verschiedener Proben ist aber auch in einem einzelnen Gel möglich. Bei dieser als zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D DIGE) bezeichneten Methode werden die zu vergleichenden Proben vor der Trennung mit jeweils verschiedenen fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen markiert und dann zu einer Probe vereinigt. In der nachfolgenden Proteinauftrennung durch 2D PAGE kommen korrespondierende Proteine aus den verschiedenen Proben an gleicher Stelle zum Liegen und durch die unterschiedlichen Farbstoffe sind Intensitätsunterschiede dann entsprechend detektierbar. Die 2D DIGE minimiert Gel-zu-Gel-Varianzen, allerdings ist die Methode sehr teuer.

2.3.2 Chromatographische Trennung von Proteingemischen

Komplexe Proteingemische, wie sie in einem Zelllysate vorliegen, können auch durch ein als Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) bezeichnetes Verfahren getrennt werden. Dabei wird die proteolytisch behandelte Probe zusammen mit einem Laufmittel – der sog. mobilen Phase – mit Hochdruck über eine Trennsäule gepumpt, die die sog. stationäre Phase enthält. Je nach Stärke der Wechselwirkungen der Bestandteile der mobilen Phase – den Eluenten – mit der stationären Phase, verbleiben diese länger oder kürzer in der Säule und erscheinen nach unterschiedlicher Zeit am Detektor. Das Erscheinen löst jeweils einen Peak am Detektor aus, sodass über die Zeit ein Chromatogramm entsteht (226). Die HPLC trennt Peptide anhand des Ausmaßes ihrer Hydrophobizität (228). Für die Analyse der auf diese Weise getrennten Peptidmoleküle einer Probe kann direkt an die HPLC eine Massenspektrometrie angeschlossen werden. Eine Weiterentwicklung des Verfahrens stellt die nanoUPLC dar, mit der die Peptide aus kleinsten Mengen komplexer Proben analysiert und quantifiziert werden können.

2.3.3 Massenspektrometrie in der Proteomik

Mit den o.g. Software-gestützten Methoden ist es möglich, die relative Intensität von korrespondierenden Spots auf unterschiedlichen 2D PAGE-Gelen zu vergleichen und so Spots zu detektieren, die auf ein differentielles Expressions-

muster der zugrunde liegenden Proteine hinweisen. Solche Spots werden aus dem Gel extrahiert und durch Trypsinierung in Peptide gespalten. Ein Massenspektrometer (MS) detektiert das Molekulargewicht (MG) der entstandenen Peptide mittels derer sich das Protein durch einen Abgleich mit entsprechenden Datenbanken identifizieren lässt. Bereits die Molekulargewichte dreier Peptidsequenzen charakterisieren ein Protein annähernd so genau, wie seine Aminosäuresequenz (226). Man spricht bei dieser Methode zur Proteinidentifikation auch vom Peptidmassen Fingerabdruck (PMF).

Es gibt verschiedene Arten von Massenspektrometern. Im Prinzip werden aber alle massenspektrometrischen Messungen in der Gasphase an ionisierten Analyten durchgeführt und alle Massenspektrometer bestehen *per definitionem* aus einer Ionenquelle, die Analytmoleküle ionisiert, einem (oder mehreren) Analysatoren, der die Ionen nach dem Verhältnis Masse-zu-Ladung (m/z) auftrennt und einem Detektor, der die Anzahl der Ionen zu jedem m/z -Wert registriert (229).

Die typischerweise in der Proteomanalytik verwendeten Ionenquellen sind MALDI (*Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization*) und ESI (*Electrospray Ionization*). Bei der MALDI werden die zu analysierenden Peptidmoleküle in eine kristalline Matrix eingebettet. Die explosionsartige Freisetzung und Photoionisation der Analytionen erfolgt durch eine Bestrahlung der Matrix mit einem UV-Laser-Impuls. Es entsteht eine Gaswolke positiv geladener Analytionen, die durch ein elektrisches Feld auf den Massenanalysator hin beschleunigt werden (226). Die Abb. 2.3 zeigt den MALDI-Prozess. MALDI eignet sich besonders für die Peptidanalyse aus 2D PAGE-Experimenten und zeichnet sich durch einfache Handhabung, exzellente Genauigkeit der Massenbestimmung sowie durch hohe Auflösung und Sensitivität aus (229).

Bei der ESI liegen die Peptidmoleküle gelöst in einer Flüssigkeit vor, die beim Austritt am Ende einer Kapillare zu Tröpfchen zerstäubt wird. Durch das Anlegen einer Spannung zwischen Kapillare und Massenspektrometer entstehen dabei Ionen. Die Tröpfchen verlieren durch Verdampfen Flüssigkeit, werden deshalb kleiner und ihre Ladung verdichtet sich. Wird die Ladungsdichte dabei zu groß, stoßen sich die Ladungen gegenseitig ab und das Tröpfchen zerplatzt (Coulomb-Explosion). Die dabei entstehenden einzelnen Peptidionen werden in das Vakuum des Massenspektrometers eingespeist und analysiert. Die Abb. 2.4 veranschaulicht den ESI-

Prozess. Die ESI-MS Methode wird häufig direkt an eine Flüssigkeitschromatographie (*Liquid Chromatography, LC*) angeschlossen, die – beispielsweise in ihrer Form als Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC, *reversed-phase high performance liquid chromatography*) – auch die Analyse komplexerer Proben erlaubt (229).

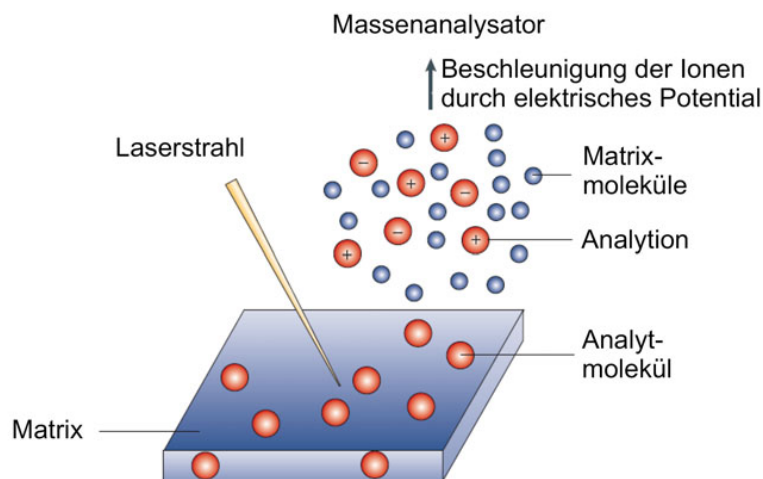


Abb. 2.3 Der MALDI-Prozess. Die in einer kristallinen Matrix eingebetteten Analytmoleküle werden durch die Bestrahlung mit einem Laserimpuls ionisiert und durch ein elektrisches Feld in Richtung des Massenanalysators beschleunigt. Aus (368), nach (228)

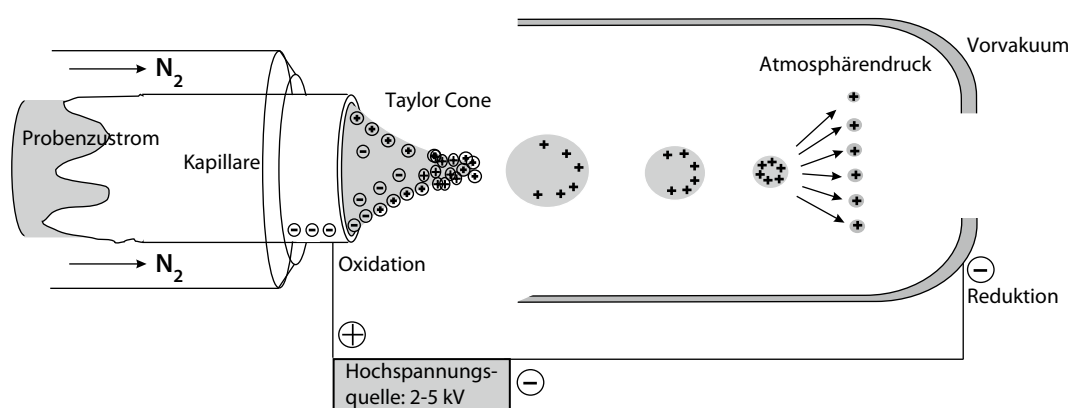


Abb. 2.4 Der ESI-Prozess. Zwischen dem Ende der Kapillare, aus der die Peptide der Probe ausströmen, und dem Massenanalysator wird ein elektrisches Feld aufgebaut. Die aus der Kapillare austretenden Tropfen verlieren durch Verdampfen Flüssigkeit, wodurch sich die Ladung verdichtet und es im Anschluss zur Coulomb-Explosion kommt. Die entstehenden Analytionen werden in den Massenanalysator eingespeist. Aus (226)

Nach der Ionisation der Peptide erfolgt ihre Einspeisung in den Analysator – das eigentliche Herzstück des Massenspektrometers. Hier werden die Peptidionen anhand ihrer m/z -Ratio aufgetrennt. Vier Arten von Massenanalysatoren haben sich für die Proteomanalyse durchgesetzt: Flugzeitanalysatoren (TOF, *time-of-flight*), Quadrupol-Analysatoren, Ionenfallen (ITD, *ion trap detector*) und *Fourier transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR) Analysatoren. Neuerdings findet auch die *Orbitrap* immer mehr Anklang (230).

In TOF-Geräten werden Ionen vor dem Eintritt in den Analysator durch ein elektrisches Potential zwischen zwei Elektroden auf eine Geschwindigkeit, die von ihrer m/z -Ratio abhängt, beschleunigt. In dem Analysator selbst herrscht ein Vakuum, außerdem ist er feldfrei. Die Ionen werden also weder beschleunigt, noch abgebremst und fliegen mit der erreichten Geschwindigkeit auf den Detektor zu. Alle Ionen passieren die gleiche Strecke – die Länge des Flugrohrs – und treffen aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten nach einer unterschiedlichen Zeit auf den Detektor. Der Aufbau eines TOF-Flugrohrs ist in Abb. 2.5 gezeigt. Diese Flugzeiten werden gemessen und das m/z -Verhältnis berechnet. Eingebaute Reflektoren tragen zur Verbesserung der Auflösung bei (230), (226). Die Ionisation durch MALDI wird zumeist an TOF-Analysatoren gekoppelt (229).

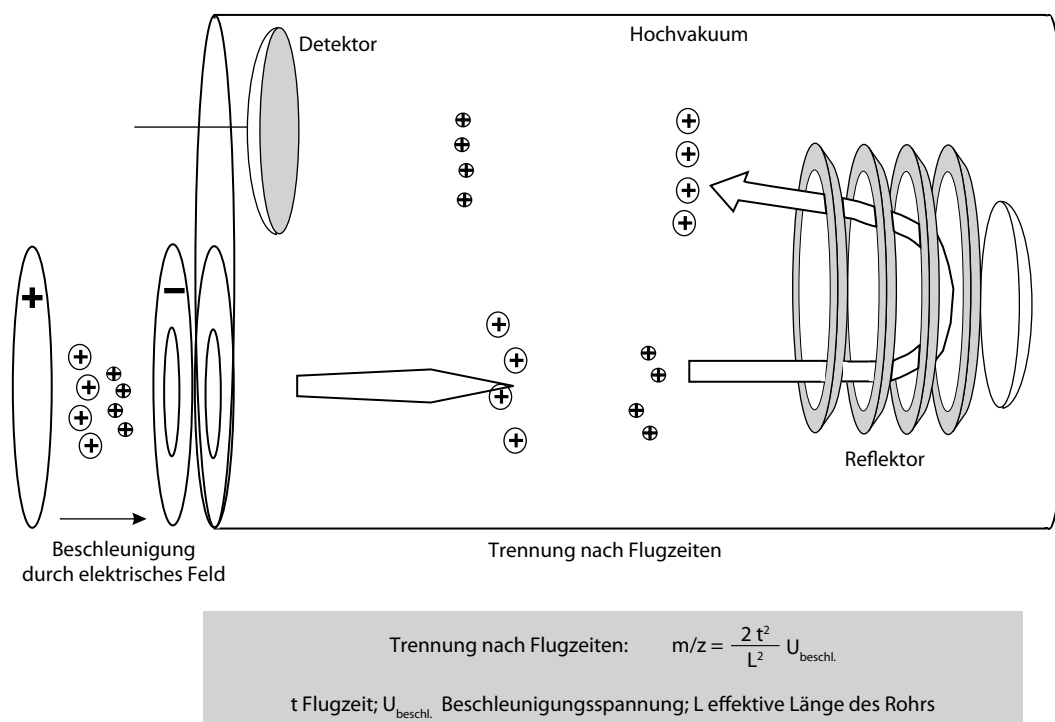


Abb. 2.5 Aufbau eines TOF-Flugrohrs mit Reflektor. Erläuterung siehe Text im vorangegangenen Abschnitt. Aus (226)

Der Quadrupol Analysator funktioniert nach dem Prinzip eines Massenfilters, d.h. nur Ionen eines definierten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis können ein elektrisches Feld passieren, das zwischen vier Stabelektroden aufgebaut wird, wie die Abb. 2.6 veranschaulicht (230). Quadrupol Analysatoren sind häufig Teil von Hybrid-Geräten (Kombinationen unterschiedlicher Analysatoren, s.u.).

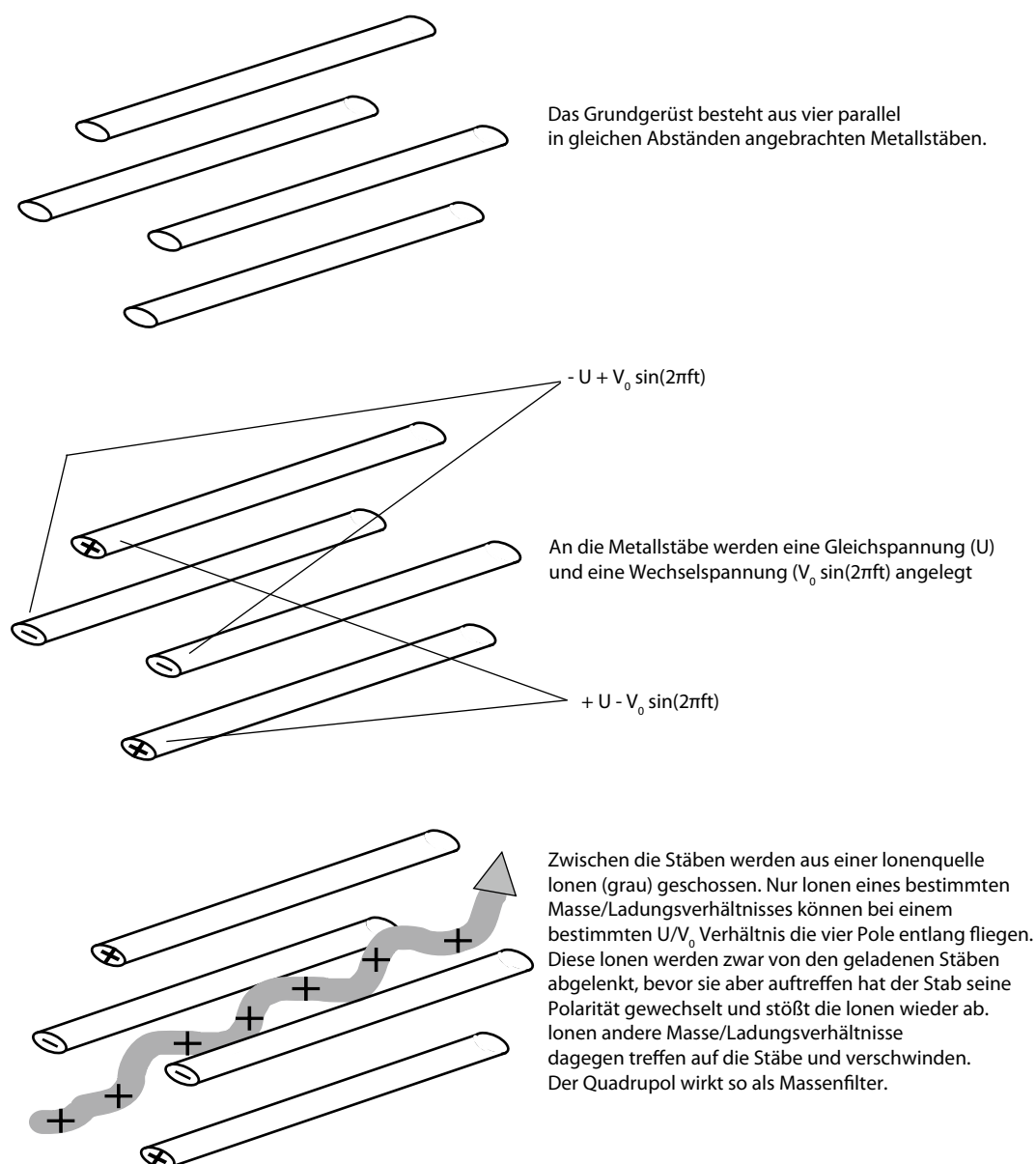


Abb. 2.6 Aufbau und Funktionsweise eines Quadrupol Analysators. Erläuterung siehe Abbildungslegende. Aus (226)

Ionenfallen speichern Ionen und lassen sie durch den Aufbau eines dreidimensionalen elektrischen Felds in ihrem Inneren auf Kreisbahnen rotieren. Die Veränderung der Amplitude der Wechselspannung des Feldes bewirkt bei einem von der m/z -Ratio des Ions abhängigen Wert, dass die Flugbahn des entsprechenden Ions instabil wird und dass es aus der Falle hinaus zum Detektor fliegt (226). Das „Fangen“ der Ionen in der Falle ermöglicht auch ihre Zugänglichkeit für die Fragmentation, die zur Analyse der Aminosäuresequenz des Peptids notwendig wird. Die Fragmentation ist auch in Quadrupol Analysatoren möglich. Die FT-ICR und die Orbitrap sind spezielle Ionenfallen mit sehr guter Auflösung und Massengenauigkeit. Sie werden zunehmend populärer für die Beantwortung von Fragestellungen aus dem Bereich der Proteomik (230).

Die Detektoren in Massenspektrometern funktionieren nach dem Prinzip von Photoelektronenvervielfachern: Ein auftreffendes Ion erzeugt in einer Kapillare, die innen mit einem elektronenabgebenden Material beschichtet ist, eine Kaskade von Elektronen, die messbar ist und somit das Auftreffen eines Ions signalisiert (226).

Die Kopplung eines einfachen Analysators an ESI oder MALDI erlaubt bei bekannter Ladung die Bestimmung des Molekulargewichts eines Peptidions. Durch den bereits o.g. Peptidmassen Fingerabdruck gelingt damit die Identifizierung des Proteins durch einen Abgleich mit entsprechenden Datenbanken. Doch auch Strukturanalysen, z.B. die Analyse der Aminosäuresequenz, ist mit massenspektrometrischen Methoden möglich. Dazu werden mehrere Analysatoren miteinander kombiniert (raumabhängige Tandem-Massenspektrometrie, MS/MS) oder eine spezielle Ionenfallen-Technik (zeitabhängige Tandem-Massenspektrometrie, MS^n) angewandt. Bei der MS/MS wird im ersten Analysator nach der Massenfiltration ein Peptidion ausgewählt, im zweiten Schritt in einer Stoßkammer z.B. durch Kollision mit Helium- oder Argon-Atomen fragmentiert und schließlich Fragment-Ionen in einem zweiten Analysator das Massenspektrum der entstandenen Fragment-Ionen bestimmt. Das Prinzip der hintereinander geschalteten Analysatoren bei der MS/MS zeigt Abb. 2.7 Gängige Analysatorkombinationen sind der Tripel-Quadrupol-Analysator, der Doppel-Quadrupol-TOF-Analysator und der TOF-Quadrupol-TOF-Analysator, bei denen jeweils der mittlere Quadrupol als Stoßkammer eingesetzt wird. Die Kollision mit Helium- oder Argon-Atomen ist nicht die einzige Möglichkeit der Fragmentation. Weitere Verfahren sind die ETD (*electron transfer dissociation*)

und die ECD (*electron capture dissociation*), die insbesondere für die Analyse posttranslationaler Proteinmodifikationen geeignet sind (231).

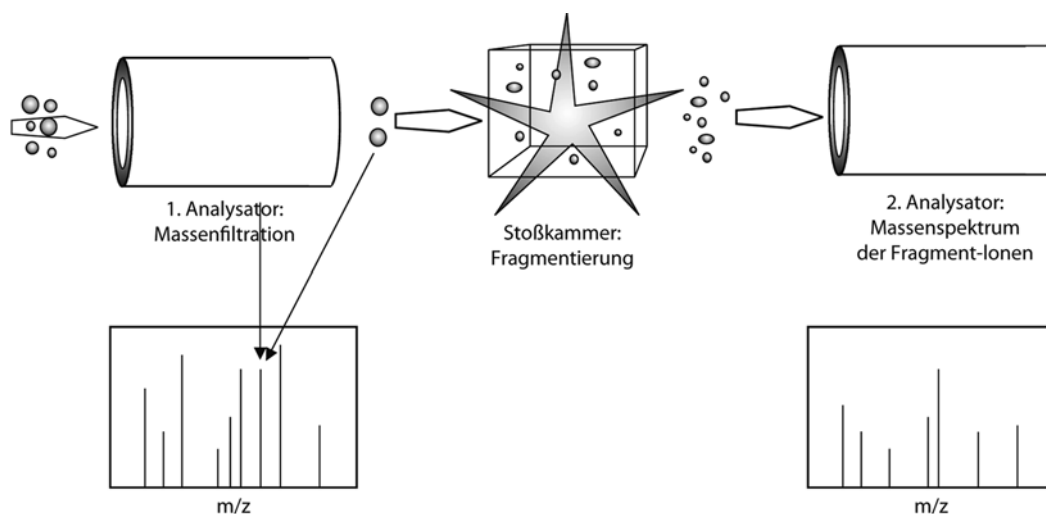


Abb. 2.7 Das Prinzip der MS/MS Tandem-Massenspektrometrie. Nach der Massenfiltration in einem ersten Analysator wird ein Peptidion ausgewählt und fragmentiert. Die m/z -Ratios der entstandenen Fragment-Ionen wiederum werden in einem zweiten Analysator bestimmt. Aus (226).

2.3.4 Die Analyse von Phosphoproteinen

Verglichen mit der Analyse von Proben, die das Gesamt-Proteom enthalten, steht die Phosphoproteomanalytik speziellen Herausforderungen gegenüber. So sind phosphorylierte Proteine chemisch gesehen zwar recht stabil, jedoch sehr empfänglich für enzymatische Modifikationen, die auch noch nach der Aufarbeitung der Proteine auftreten können. Das Risiko eines Bias durch Veränderungen des Phosphorylierungsmusters ist also groß, kann aber durch schnelle Probenverarbeitung, Arbeiten auf Eis und Zugabe von Kinase- und Phosphataseinhibitoren zur Probe gemieden werden (223). Außerdem handelt es sich bei Proteinphosphorylierungen um substöchiometrische Prozesse. Das bedeutet, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt nicht alle Proteine eines Typus im phosphorylierten Status vorliegen, bzw. alle möglichen Phosphorylierungsstellen tatsächlich phosphoryliert sind. Erschwerend kommt hinzu, dass die relevanten Proteine aus intrazellulären Signalkaskaden häufig ohnehin nur in einer geringen Konzentration vorliegen (232). Aus diesen Gründen sind hochsensitive Methoden für die Isolation, Detektion und

Quantifizierung von Phosphoproteinen notwendig (231). Auch die Massenspektrometrie mit Phosphoproteinen ist nicht trivial: Phosphopeptide sind in einer komplexen Peptidprobe vor dem Hintergrund der großen Menge nicht-phosphorylierter Peptide deutlich unterrepräsentiert. Daher ist eine vorangehende Anreicherung der phosphorylierten Proteine bzw. Peptide notwendig, für die mittlerweile annähernd ein Dutzend verschiedener Methoden zur Verfügung steht. Außerdem sind Phosphopeptide schwerer zu ionisieren. Beides kann zur Suppression der Phosphopeptidionen während der MS führen (231). Posttranslationale Modifikationen beeinträchtigen außerdem die Spezifität der proteolytischen Spaltung von Proteinen und die Esterverbindung, die die Phosphatgruppe an die phosphorylierbaren Aminosäuren – in eukaryotischen Zellen v.a. Serin, Threonin und Tyrosin – bindet, kann bei der Fragmentation durch Kollision mit Helium- oder Argon-Atomen in der Tandem-MS leicht zerfallen (231). Fortschritte MS-basierter Technologien und der Methoden zur Anreicherung von Phosphoproteinen und -peptiden aus komplexen Proben haben in den letzten fünf Jahren die Generierung einer immensen Datenmenge über Phosphorylierungen ermöglicht, die in Datenbanken wie PhosphoSite plus zugänglich sind (verfügbar unter www.phosphosite.org). In der Tat können an die zehntausend Phosphorylierungsstellen in nur einem Experiment identifiziert werden, die Frage nach deren biologischer Relevanz wird dadurch jedoch nicht beantwortet, was ein bisher ungelöstes Problem darstellt (225).

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Tumorzelllinien und Zellkultur

Bei der verwendeten Tumorzelllinie HNCCUM-02T handelt es sich um eine aus Operationsmaterial etablierte Plattenepithelkarzinom-Zelllinie des Kopf-Halsbereichs (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC). Sie entstammt einem Primärtumor des Zungengrundes. (233), (234)

3.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in pA-Qualität von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.1.3 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Komplettmedium für Zellkulturen

- DMEM F12 mit L-Glutamin
- 5 % v/v FCS (fetales Kälberserum)
- 2 % v/v Penicillin / Streptomycin

Serumfreies Medium für Zellkulturen

- DMEM F-12 mit L-Glutamin
- 2 % v/v Penicillin / Streptomycin

Lysispuffer für die Zellpellets

- Lysispuffer aus dem Phosphoprotein Purification Kit (s. 3.1.10)
- 0,25 % CHAPS (3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat)
- 1 Tbl. Protease-Inhibitor pro 5 ml Lysispuffer

0,2 % Benzonase

Puffer zur Vorbereitung der Chromatographiesäulen

Lysispuffer aus dem Phosphoprotein Purification Kit (s. 3.1.10)

0,25 % CHAPS

Elutionspuffer zur Elution der an der Chromatographiesäule gebundenen Phosphoproteine

Elutionspuffer aus dem Phosphoprotein Purification Kit (s. 3.1.10)

0,25 % CHAPS

Fokussierungspuffer zur Zugabe zu den aufkonzentrierten Phosphoprotein-Proben

8 M Urea (Harnstoff)

2 % CHAPS

0,001 % Bromphenolblau

1/82 Volumen HED (Hydroxyethylidisulfid)

H₂O_{dest.}

Äquilibrierungspuffer

50 mM TRIS (Trishydroxymethyl-aminomethan)

6 M Urea (Harnstoff)

2 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

30 % Glycerol (87 %)

0,003 % Bromphenolblau (5 %)

H₂O_{dest.}

pH bei Raumtemperatur auf 8,8 einstellen mit Acidum hydrochloricum (Salzsäure)

Elektrophoresepuffer

25 mM TRIS

192 mM Glycin

0,1 % SDS

H₂O_{dest.}

Fixierpuffer für die Polyacrylamid-Gele

35 % Ethanol

5 % Acidum aceticum (Essigsäure)

0,001 % SDS

Färbepuffer für die Polyacrylamid-Gele

2 % Acidum aceticum (Essigsäure)

0,001 % SDS

1/4000 Vol. SYPRO Orange, protein gel stain, Invitrogen, Molecular Probes Inc. (Oregon, USA)

Waschpuffer für die Polyacrylamid-Gele

2 % Acidum aceticum

0,001 % SDS

Trenngelpuffer (TGP)

1,5 M TRIS

H₂O dest.

Matrix für MALDI-TOF Massenspektrometrie (für 10 ml)

20 mg α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure-Butylaminsalz gelöst in

50 % H₂O (HPLC grade); 5 ml; JT Baker

50 % Acetonitril; 5 ml

0,01 % Trifluoressigsäure (TFA); 10 μ l

Probenlösemittel zur Peptidresolubilisierung

99,9 % H₂O (HPLC grade); JT Baker

0,1 % TFA

3.1.4 Cyclooxygenase-Inhibitor Flurbiprofen

Der Cyclooxygenase-Inhibitor Flurbiprofen wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

3.1.5 Strips zur Isoelektrischen Fokussierung

Zur Isoelektrischen Fokussierung wurden jeweils 18 cm lange Immobiline Dry Strips, pH 4-7 bzw. pH 3-10 von GE Healthcare Bio-Sciences AB (München) verwendet.

3.1.6 Polyacrylamid-Gele

Die 14 %-Polyacrylamid-Gele wurden aus folgenden Chemikalien hergestellt:

27,1 ml H₂O_{dest}

17,5 ml Trenngelbuffer (TGP), 4-fach

25,4 ml Acrylamid / Bisacrylamid (AA/BisAA)

350 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)

35 µl Tetramethyldiamin (TEMED)

3.1.7 Immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie-Säulen

Es wurden die IMAC-Säulen aus dem Phosphoprotein-Purification-Kit (Katalognummer 37101) von Qiagen (Hilden) benutzt.

3.1.8 Geräte und Software

Biofuge fresco	Hereaus sepatech (Osterode)
Dark Reader transilluminator	Clare Chemical Research (Dolores, USA)
Delta2D, Version 3.6	Decodon GmbH (Greifswald)
Etlan IPGphor II	Labcrew, Amersham Biosciences (Sunnyvale, USA)
Fluoreszenzscanner Storm 840	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Costar Stripette, Corning, Incorporated (New York, USA)
Gefrierschrank -20°C	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Gelkammer	Biometra (Göttingen)

Hera Freeze -80°C	Kendro Laboratory products (Hanau)
Hereaus HeraCell	Hereaus sepatech (Osterode)
Hereaus HeraSafe	Hereaus sepatech (Osterode)
Kühlpumpe, Multitemp II	Pharmacia LKB (Freiburg)
Kühlschrank Cooler	Bosch (Wien, Österreich)
Mikroskop	Nikon TSM, Nikon (Düsseldorf)
Minizentrifuge RF	Hereaus sepatech (Osterode)
Multiskan Ascent	Thermo Electron Corporation (Dreieich)
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Power supply Modell 1000/500	BioRad (München)
Reinraumwerkbank für Arbeiten an Zellkulturen Hera Safe, HS12, Klasse II	Hereaus sepatech (Osterode)
Schwenktisch, WS-10	Edmund Bühler (Hechingen)
Stickstofftank	CRYO-4000, Chart Ind. (Burnsville, USA)
StripHolder	Amersham Biosciences (Sunnyvale, USA)
Ultraschallbad, Sonorex super RK510 H	Bandelin (Berlin)
Ultraschallstab, Labsonic M	B. Braun Biotech International (Melsungen)

Universal 16R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Vortex Top-Mix Fisherbrand	Fisher Scientific (Schwerte)
Waage, ABT 120-5DM	Kern+Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Waage Precision Advanced	OHAUS (Gießen)
Wärmeplatte, MR 3001	Heidolph (Kelkheim)
Wasserbad	Infans AG (Bottmingen, Schweiz)

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen 10 ml, 50 ml	Falcon Becton Dickinson Labware (Heidelberg)
Eppendorf Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf AG (Hamburg)
Glaspasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Gewebekulturschalen 175 cm² 75 cm² 25 cm²	Cellstar, Greiner (Frickenhausen)
Parafilm, Pechiney Packaging Plastic	Chicago, USA
Pipettenspitzen epT.I.P.S.; 10 µl	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipettenspitzen 0,5-20 µl	G. Kisker (Steinfurt)
200 µl	Sarstedt (Nümbrecht)
300 µl	Finntip 300, Thermo Labsystem, (Vantaa, Finnland)
1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht)

Protein LoBind Tubes	0,5ml	Eppendorf AG (Hamburg)
	1,5 ml	
Skalpelle Feather		PFM (Köln)
Tissue culture plate 96-well; glatter Boden		Thermo Fisher Scientific Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold)
Quali-PCR-Tube-Streifen		G. Kisker (Steinfurt)
Zellschaber		Greiner (Frickenhausen)

3.1.10 Kits

Zur Aufarbeitung des Phosphoproteoms aus den Zellkulturen wurde das PhosphoProtein Purification Kit (Katalognummer 37101) der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Es enthält:

- ▶ Immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographiesäulen
- ▶ Lysispuffer
- ▶ Elutionspuffer
- ▶ CHAPS Stammlösung (10 %)
- ▶ Benzonase® Endonuklease (DNase / RNase, Reinheitsgrad >99 %)
- ▶ Protease-Inhibitor Tabletten
- ▶ Nanosep® Ultrafiltration Säulen (grenzwertiges Molekulargewicht: 10 kDa)

3.2 Methoden

3.2.1 Kultur der Tumorzelllinien

Die Kulturen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

Zur Vermeidung einer mikrobiellen Kontamination in der Zellkultur wurde besonderen Wert auf steriles Arbeiten gelegt. Alle Arbeiten an Zellkulturen wurden an einer Reinraumwerkbank durchgeführt, die vor Beginn der Arbeiten mit 70 % Ethanol gereinigt und während der Ruhezeiten mit UV-Licht bestrahlt wurde. Dem Zellkulturmedium wurden 2 % antimikrobielle Substanzen in Form von Penicillin und Streptomycin zugesetzt. Zum Mediumwechsel sowie zu allen weiteren Arbeiten mit den Zellen wurden ausschließlich steril verpackte Einmalpipetten verwendet.

Es wurde mit DMEM-F12-Medium, das 5 % FCS enthielt gearbeitet, lediglich die Kultivierung von frisch aufgetauten Zellen der Stammkultur fand für 48 Stunden in Medium mit 10 % FCS statt. Die Zellen wurden alle 24 Stunden mikroskopisch begutachtet. Ein Mediumwechsel wurde 48-stündlich durchgeführt.

Bei 80%iger Konfluenz in 75 cm² großen Kulturflaschen wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Verdau passagiert und in 150 cm² große Kulturflaschen ausgesät. Für die Durchführung einer Versuchsreihe mit Flurbiprofen-Inkubation und Bestrahlung wurden in der Regel vier 150 cm² messende Kulturflaschen benötigt, in denen die Zellen zu etwa 80 % konfluiert waren. Die Zellen aus diesen Flaschen wurden aus technischen Gründen in 36 (4 x 9) kleine (25 cm²) Kulturflaschen für die Experimente sowie in 2 große (150 cm²) Kulturflaschen zu weiteren Kultivierung passagiert.

Das Auszählen vitaler Zellen erfolgte lichtmikroskopisch. Hierfür wurden abgelöste Zellen in Suspension mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung verdünnt und auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Die Zellzahl wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Großquadrat}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000$$

In vierwöchigem Rhythmus wurden Kulturüberstände der Tumorzelllinien mittels PCR auf eine Kontamination mit Mycoplasmen untersucht. Dazu wurden die Linien zuvor für die Dauer einer Woche in antibiotikafreiem Medium kultiviert. Es wurden sodann 500 µl des Mediums abgenommen und bis zur PCR bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Flurbiprofeninkubation und Bestrahlung der Tumorzelllinien

Für die Durchführung der Experimente mit einer Versuchsreihe, bestehend aus den vier Versuchsgruppen – *Nullkontrolle*, *Radiatio allein*, *Flurbiprofen allein*, *Radiatio plus Flurbiprofen* – waren die Hälfte der Zellen (zwei von vier Versuchsgruppen) mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor zu behandeln. Das in Ethanol gelöste Flurbiprofen wurde in einer entsprechenden Menge des Zellkulturmediums verdünnt um die gewünschte Konzentration von 200 µM zu erhalten. 60 Minuten nach Aufgabe des flurbiprofenhaltigen Mediums wurde die Probe aus der Gruppe *Radiatio plus Flurbiprofen* mit einer Dosis von acht Gray bestrahlt. Die anderen mit Flurbiprofen inkubierten Zellen wurden parallel behandelt, aber nicht bestrahlt.

Jeweils 30 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Gruppen *Radiatio allein* und *Radiatio plus Flurbiprofen* geerntet. Eine nicht bestrahlte und nicht in flurbiprofenhaltigem Medium inkubierte *Nullkontrolle* wurde parallel behandelt.

3.2.3 Ernte der Zellen

Die bestrahlten Tumorzelllinien (*Radiatio allein* und *Radiatio plus Flurbiprofen*) wurden jeweils 30 Minuten nach der Bestrahlung geerntet. Die *Nullkontrolle* sowie die mit Flurbiprofen inkubierten Tumorzellen wurden jeweils 90 Minuten nach dem Mediumwechsel geerntet.

Die Tab. 3.1 verdeutlicht die Expositionsdauer gegenüber dem COX-Inhibitor und die Reaktionszeit nach Bestrahlung bis zur Zellernte in der jeweiligen Versuchsgruppe.

Tab. 3.1: Behandlung der Tumorzelllinien in den vier Versuchsgruppen			
	Flurbiprofeninkubation	Radiatio	Zellernte
Nullkontrolle	nur Mediumwechsel	parallel behandelt	90 min nach Mediumwechsel
Radiatio allein	nur Mediumwechsel	mit 8 Gy	30 min nach Radiatio
Flurbiprofen allein	Inkubation mit flurbiprofenhaltigem Medium	parallel behandelt	90 min nach Beginn der Flurbiprofen-Inkubation
Radiatio plus Flurbiprofen	Inkubation mit flurbiprofenhaltigem Medium	mit 8 Gy; 60 min nach Beginn der Flurbiprofen-Inkubation	30 min nach Radiatio

Die zu erntenden Zellen wurden zur Entfernung aller Mediumreste zunächst mehrfach in ihrer Kulturschale mit kaltem PBS gewaschen. Zum Abstoppen aller Zellreaktionen wurden die Kulturflaschen im Folgenden aufrecht stehend auf Eis gelagert. Mit Zellschabern wurden die Tumorzellen gelöst und zusammen mit dem – vor dem Schaben aufgegebenen PBS (5 ml) – in Falcontubes pipettiert. Bei 1400 g wurde das PBS abzentrifugiert und verworfen, die Zellen wurden in 1 ml resuspendiert und in 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit Verwerfen des PBS-Überstands, bevor die Zellpellets bei -80 °C kryokonserviert werden konnten.

3.2.4 Die Aufreinigung des Phosphoproteoms – ein Überblick

Die Abb. 3.1 zeigt einen Überblick über die Schritte des Experiments, die nötig waren um das Phosphoproteom der Tumorzelllinien zu isolieren.

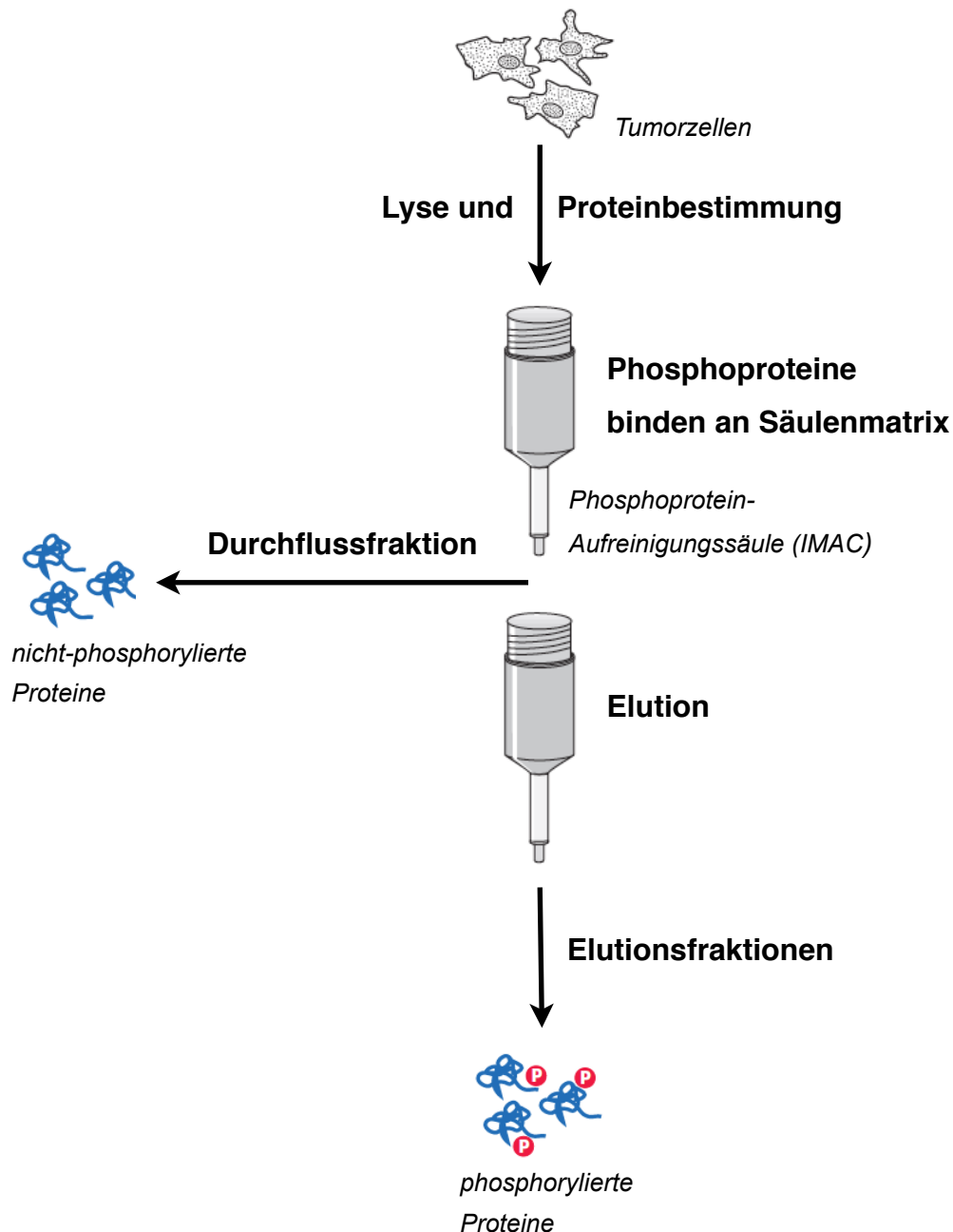


Abb. 3.1 Die Isolierung des Phosphoproteoms aus den Tumorzelllinien. Die Zellen werden zunächst lysiert. Eine Proteinbestimmung wird durchgeführt. Im nächsten Schritt wird das Lysat auf die Phosphoprotein-Aufreinigungssäulen gegeben. In der Durchflussfraktion befinden sich die nicht-phosphorylierten Proteine. Die Phosphoproteine sind an der Matrix im Inneren der Chromatographiesäulen gebunden und werden nach einem Waschschrift (nicht gezeigt) durch Elution gelöst und in mehreren Fraktionen aufgefangen. Verändert nach dem PhosphoProtein Handbook, Qiagen.

3.2.5 Lyse der Zellen und Proteomisolierung

Die gefrorenen Zellpellets wurden durch Auf- und Abpipettieren in 1 ml Lysispuffer solubilisiert. Die Lyse erfolgte durch 4 Zyklen à 30 Pulse mit einem

Ultraschallstab. Zwischen jedem Zyklus lagen 10 Minuten. Jeweils vor der Ultraschallbehandlung wurde die Suspension gevortext. Während der gesamten Lyse verblieb die Probe auf Eis, um Proteindenaturierung und Proteolyse zu verhindern.

Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 4 °C mit 10000 g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen, das verbliebene Pellet enthielt Zelldetritus und wurde verworfen.

3.2.6 Durchführung von Proteinbestimmungen

Zur Bestimmung des Proteingehalts im Überstand wurden von jeder Probe einer Versuchsreihe 30 µl entnommen und eine photometrische Proteinbestimmung nach Lowry (235) durchgeführt. Hierzu wurden 30 µl des Lysats mit dem Lysispuffer des Kits (ohne Protease, Benzonase) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Aus dieser 1:1-Verdünnung wurden noch eine 1:4- sowie eine 1:8-Verdünnung hergestellt. Die Proben wurden als Triplikate à 5 µl auf 96-well Platten aufgetragen. Als Vergleich diente eine BSA- (Bovines Serum Albumin) Eichgerade (0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml BSA). Die Verdünnung der BSA-Lösung in einer Konzentration von 3 mg/ml erfolgte zunächst ebenfalls 1:1 mit dem Lysispuffer des verwendeten Kits. Wie oben geschildert wurden dann die weiteren Verdünnungen aus dieser Lösung unter Verwendung von Lysispuffer hergestellt und ebenfalls als Triplikate auf die 96-well Platte aufgebracht. Die weitere Vorbereitung der Proben wurde nach den Herstellerangaben (Bio-Rad DC Protein-Assay, Bio Rad, München) durchgeführt. Die Messung der Extinktionen erfolgte mittels Bio Rad DC Protein-Assay bei einer Wellenlänge von 750 nm. Die Extinktionswerte der BSA-Reihe dienten der Erstellung einer Eichgeraden. Mit Hilfe der Geradensteigung, dem y-Achsenabschnitt und dem Extinktionswert der jeweiligen Probe konnte die Proteinkonzentration unter Berücksichtigung der vorherigen Verdünnung errechnet werden. Der Hersteller bezeichnet dieses Verfahren als high-concentration assay, bei dem Proteinkonzentrationen im Bereich 0,2-1,5 mg/ml sicher detektiert werden.

Der geschilderte Versuchsaufbau wurde für die erwarteten hohen Konzentrationen in den Zelllysaten und in den durch Ultrazentrifugation aufkonzentrierten Phosphoproteom-Proben angewandt. Bei letztgenannten erfolgte die Verdünnung und die Herstellung der Lösungen für die BSA-Eichgerade in TRIS/HCl (10 mM, pH 8,5).

Für die erwarteten niedrigen Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen der IMAC (s.u.) wurde zusätzlich noch ein sog. low-concentration assay durchgeführt. Das Verfahren ist hierbei leicht abgewandelt, sodass Proteinkonzentrationen von 5-250 µg/ml detektiert werden können. Die Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen lagen zwischen 0 und 250 µg/ml. Die höheren Konzentrationen lagen damit also jeweils im Grenzbereich beider Versuchsanordnungen. Durch Kombination der Verfahren (Durchführung von high- und low-concentration assay) konnte dabei eine höhere Ergebnissicherheit erzielt werden. Die Eichgerade mit BSA für die Proteinbestimmung in den Elutionsfraktionen wurde in Eluierungspuffer erstellt.

3.2.7 Isolierung des Phosphoproteoms

Für die vorliegende Arbeit wurde zur Anreicherung von Phosphoproteinen die Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (*immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC) genutzt. Es handelt sich um eine Methode, die sich der Ladung von Metallionen bedient, um die negativgeladenen phosphorylierten Peptide oder Proteine aus komplexen Proben abzufangen und anzureichern. Die Proben werden dabei in saurer Lösung gelöst, um elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Proteinen – also vor allem den Phosphoproteinen – und den Metallionen zu ermöglichen (223). Auch ein Vorversuch zur Anfärbung phosphorylierter Proteine innerhalb eines Gesamtproteoms durch phosphospezifische Farbstoffe wurde durchgeführt (s. 3.2.10.1).

3.2.7.1 Durchführung der Immobilisierten Metallaffinitätschromatographie

Die IMAC-Säulen wurden zunächst mit Lysispuffer äquilibriert. Für die Durchführung der Chromatographie mussten die Proteine im Lysat in einer Konzentration von 0,1 mg/ml vorliegen. Der durchschnittliche Proteingehalt der Lysate lag bei 2 mg/ml, sodass nach der Verdünnung mit Lysispuffer ein Volumen von etwa 20 ml vorlag, das in zwei Schritten aufgegeben wurde (Fassungsvolumen der Säulen 12,5 ml). Die Durchflussfraktion enthielt die nicht-phosphorylierten Proteine. Nach der Durchführung einer Proteinbestimmung wurde sie verworfen. Auch das Durchflussvolumen eines Waschschriffs mit 6 ml Lysispuffer vor der eigentlichen Elution wurde regelmäßig einer Bestimmung des Proteingehalts

unterzogen. Zur Elution der an der Säulenmatrix gebundenen Phosphoproteine wurden 6 x 500 µl Eluierungspuffer auf die Säulen gegeben und die Fraktionen in sechs getrennten Gefäßen aufgefangen. Der Proteingehalt jeder Fraktion wurde wie unter 3.2.6 erläutert mit der Versuchsanordnung sowohl für hohe als auch für niedrige Proteinkonzentrationen durchgeführt. Die Fraktionen, die Protein enthielten, wurden gepoolt und durch Ultrazentrifugation weiter aufkonzentriert.

3.2.7.2 Aufkonzentrierung der Elutionsfraktionen durch Ultrazentrifugation

Aus Gründen der praktikableren Handhabung wurde die Aufkonzentrierung nicht mit den vom Hersteller mitgelieferten *Nanosep ultrafiltration*[®] Gefäßen vorgenommen. Ihr Reservoir konnte nur mit maximal 1 ml beladen werden, das Volumen der gepoolten phosphoproteinhaltigen Fraktionen betrug aber zwischen 2 und 2,5 ml, sodass mit den *Nanosep* Gefäßen mehrere Zentrifugationsdurchläufe für die gleiche Probe notwendig gewesen waren. Dabei war auffällig, dass immer weniger des zugegebenen Volumens per Zentrifugation ausgeschlossen wurde, vermutlich bedingt durch Verstopfen des Filters mit Proteinen oder Bestandteilen des Elutionspuffers. Die *Nanosep* Gefäße boten außerdem keine Möglichkeit zur invertierten Zentrifugation um die Konzentratwiedergewinnung zu optimieren. Es wurden daher die *Roti*[®]-*Spin MIDI 10* Gefäße der Firma Roth mit größerem Reservoir verwendet, mit denen auch die invertierte Zentrifugation möglich war. Bei der invertierten Zentrifugation wird das den Filter enthaltende Reaktionsgefäß umgedreht zentrifugiert, sodass auch im Filter zurückgebliebene Proteine zurück in die aufkonzentrierte Probe gelangen können.

Zur Vorbereitung der Zentrifugationsgefäße wurde die Membran über Nacht mit einer 10%igen Glycerinlösung bei Raumtemperatur inkubiert, vor der Zentrifugation mit vollentsalztem Wasser zunächst gespült und dann zwei Mal 15 Minuten lang mit je 3,5 ml vollentsalztem Wasser bei 1000 g zentrifugiert. Die gepoolten proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden anschließend dreimal für 30 Minuten bei 4480 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem ersten und dem zweiten Zentrifugations-schritt wurden je 0,5 ml 10 mM TRIS (pH = 7,0) zum Umpuffern zugegeben. Das Spülen mit TRIS ermöglichte die Elimination des Elutionspuffers, der die isoelektrische Fokussierung zu stören schien und zudem eine erhebliche Salzkonzentration aufwies, die bei der zweidimensionalen Elektrophorese zum Verschmieren der Spots

im Gel führte. Abschließend erfolgte die invertierte Zentrifugation mit umgedrehtem Filter für 15 Minuten bei o.g. Kraft und Temperatur zum Herauslösen möglicherweise im Filter zurückgehaltener Proteinmoleküle.

Für die isoelektrische Fokussierung war es nötig, dass das Gesamtvolumen der Probe 360 µl betrug und eine hohe Harnstoffkonzentration, im optimalen Falle 8 M, erreicht wurde. Außerdem mussten auf einen 18 cm langen Strip mit immobilisiertem pH-Gradienten mindestens 120 µg Protein aufgegeben werden (zur Begründung siehe 3.2.8). Den vorgestellten Limitierungen gegenüber war die Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation nicht ausreichend, da die Proteinkonzentration in den Konzentraten noch zu gering war um eine adäquate Menge an harnstoffhaltigem Puffer zuzugeben. Es wurde daher versucht statt in TRIS in 8 M Harnstoffpuffer umzupuffern, jedoch schien der Harnstoff die Membran der Zentrifugationsgefäße zu verstopfen. Also wurde eine weitere Ultrazentrifugation, diesmal mit den *Vivaspin® 2 Zentrifugalkonzentratoren* der Firma sartorius stedim, durchgeführt. Bei 4 °C wurden die Proben 15 Minuten lang bei 4000 g zentrifugiert. Dadurch wurde eine Proteinkonzentration erreicht, die die Zugabe von harnstoffhaltigem Puffer – unter der Prämisse, dass 360 µl Gesamtvolumen 120 µg Protein enthielten – ermöglichte. Bei den letzten für diese Arbeit durchgeführten Aufreinigungen von Phosphoproteinen wurden ausschließlich die *Vivaspin® Zentrifugalkonzentratoren* eingesetzt. Bei viermaliger Zentrifugation für jeweils 15 Minuten bei 4000 g und dreimaligem Spülen mit je 500 µl TRIS (10mM, pH 7,0) konnte ohne zweite Ultrazentrifugation eine entsprechend hohe Proteinkonzentration erreicht werden.

Während eines Durchgangs der Aufarbeitung des Phosphoproteoms wurde Material für die Durchführung einer nanoUPLC-MS abgenommen. Dazu wurden jeweils wenige µl von den Gesamtproteom-Proben sowie den aufgereinigten, aufkonzentrierten Phosphoproteom-Proben aller vier Versuchsgruppen abgenommen und in separate zuvor beschriftete Reaktionsgefäße überführt. Die nanoUPLC-MS wurde im Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Mit der angewandten Methode ist auch eine Quantifizierung der Proteinmengen möglich. Die auf diese Weise identifizierten Proteine konnten durch eine Recherche auf der Protein Knowledgebase (UniProtKB) auf ihre posttranslationalen Modifikationen hin untersucht werden. Auf diese Weise war es möglich, den Anteil theoretisch phosphorylierbarer Proteine unter den per nanoUPLC-MS identifizierten Proteinen zu bestimmen und eine Aussage über den Erfolg der Phosphoproteinanreicherung

durch IMAC zu machen. Außerdem konnten die Ergebnisse dieser Methode mit denjenigen aus den 2D PAGE Experimenten verglichen werden.

3.2.8 Erste Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese: Isoelektrische Fokussierung

Bei der Isoelektrischen Fokussierung – dem erstem Schritt der zweidimensionalen Elektrophorese – wurden die Phosphoproteine entsprechend ihres isoelektrischen Punkts aufgetrennt. Die Separation erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (sog. IPG-Strips), in den zuvor die Phosphoproteine eingebracht wurden.

In den Vorversuchen zu den Experimenten der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass es ausreichte je 120 µg der aufgereinigten Phosphoproteine auf einen Strip mit immobilisiertem pH-Gradienten aufzugeben, um später auf den Elektrophorese-Gelen Proteinspots ausreichender Intensität detektieren zu können. Auch unter ökonomischen Gesichtspunkten, hinsichtlich des Materialverbrauchs, erschien es nicht sinnvoll eine größere Proteinmenge aufzugeben. Wie unter 3.2.7.2 bereits angedeutet, musste für den Fokussierungsschritt zum Aufbruch der Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine Harnstoff in einer mindestens 4- besser 8-molaren Konzentration im Probenpuffer enthalten sein. Wegen des Aufreinigungsschritts über die IMAC-Säulen und da der Harnstoff die Membranen der Zentrifugationsgefäße zu verstopfen schien, konnte der entsprechende harnstoffhaltige Fokussierungspuffer erst nach der Ultrazentrifugation zu den Proteinproben gegeben werden.

Um das für die IEF benötigte Gesamtvolumen von 360 µl zu erzielen, wurden zu einer Menge des Phosphoproteinkonzentrats, das 120 µg Protein enthielt (meist etwa 160 µl) ein entsprechendes Volumen des Fokussierungspuffers hinzugegeben. Hinzu kamen 1,8 µl eines ampholythaltigen IPG-Puffers (GE Healthcare Bio-Sciences AB, München) (IPG = Immobilisierter pH Gradient), um die Spotauflösung noch zu verbessern. Das entsprechende Probenvolumen wurde in einen Stripholder pipettiert und zunächst mit einem IPG-Strip für vier Stunden inkubiert. Bei dieser ersten vierstündigen Rehydrierung, die das Quellen des auf dem IPG-Strip aufgetragenen Gels erlaubt, wurde kein Cover-Fluid verwendet. Zur Vermeidung der

Probenverdunstung und des Auskristallisierens von Harnstoff wurden die Deckel der Stripholder unterdessen mit Parafilm abgedichtet. Angeschlossen wurde eine weitere Rehydrierung mit 2 ml Cover-Fluid bei einer Stromstärke von 30 V, die nach 12 Stunden in die Fokussierung mit folgendem Programm übergang:

- ▶ Gradient auf 200 V innerhalb zwei Stunden
- ▶ Halten der 200 V für eine Stunde
- ▶ Gradient auf 1000 V innerhalb zwei Stunden
- ▶ Halten der 1000 V für eine Stunde
- ▶ Gradient auf 8000 V innerhalb drei Stunden
- ▶ Halten der 8000 V bis 60000 Voltstunden erreicht waren

Bei den Vorversuchen zur Isoelektrischen Fokussierung mit Phosphoproteinproben wurde festgestellt, dass diese beim Aufbau der Stromstärke besonders sanft behandelt werden mussten, da sonst die Spannung pro Strip mit $> 200 \mu\text{A}$ zu hoch stieg oder die IPG-Strips gar einschmolzen. Den Graduierungsschritten zur Erhöhung der Stromstärke wurden daher statt der üblichen einen Stunde jeweils zwei bzw. drei Stunden beigemessen.

Nach dem Anhalten der Fokussierung wurden die IPG-Strips mit einer Pinzette aus dem Stripholder genommen und senkrecht gehalten, sodass das Cover-Fluid abtropfen konnte. Die Strips wurden nicht mit Wasser gewaschen, da hierunter die fokussierten Banden wieder auseinander diffundieren hätten können und die Auflösung in der zweiten Dimension unschärfer geworden wäre. Jeweils 2 Strips wurden bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Äquilibrierungsröhrchen gelagert.

3.2.9 Zweite Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Der Isoelektrischen Fokussierung folgte im nächsten Schritt eine Gelelektrophorese, die als zweite Dimension der 2D PAGE bezeichnet wird. Hierbei werden die in der Probe enthaltenen Proteine senkrecht zu ihrer Lage im Gelfilm des IPG-Strips ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Das Ziel des Verfahrens ist es, das in den Proben enthaltene Phosphoproteom zweidimensional nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht darzustellen.

3.2.9.1 Äquilibration

Vor der eigentlichen Elektrophorese mussten in einem als Äquilibration bezeichneten Prozess die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine reduziert und die Proteine linearisiert werden. Hierfür wurden die IPG-Strips zunächst aufgetaut und für 15 Minuten unter leichtem Schwenken in 10 ml eines Äquilibrationpuffers, der 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie 1 % Dithiotreitol (DTT) enthielt, inkubiert. DTT war dabei in der Lage, die Disulfidbrücken zu reduzieren und SDS bewirkte durch Anfügen vieler sich gegenseitig abstoßender negativer Ladungen die Linearisierung der Proteinmoleküle. Zur Verhinderung der Reoxidation der SH-Gruppen zu Disulfidbrücken wurden diese mit Iodacetaldehyd (IAA) alkyliert. Hierfür wurden die IPG-Strips in ein zweites Äquilibrationröhrchen überführt und für 15 Minuten unter leichtem Schwenken in 10 ml eines 2,5 % IAA-haltigen Äquilibrationpuffers inkubiert. Der Äquilibrationpuffer enthielt außerdem 0,003 % Bromphenolblau. Der Farbstoff zeigte während der Elektrophorese die Lauffront an.

3.2.9.2 Gelelektrophorese

Die Lösung für die 14,5%igen Polyacrylamid-Gele wurde unter einem Abzug nach der unter 3.1.7 genannten Rezeptur hergestellt und davon jeweils 35 ml in staubfreie Gelkammern pipettiert. Zur Vermeidung der Austrocknung des Oberrands wurde während des Auspolymerisierens mit 1 ml des Lösungsmittels Isobutanol überschichtet. Vor dem Aufbringen der äquilibrierten IPG-Strips wurde das Isobutanol entfernt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ sowie 1-fachem Trenngelpuffer gespült und der obere Gelrand zur Erleichterung der IPG-Strip Platzierung mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Es folgte nach vorsichtigem Abgießen des Elektrophoresepuffers die Fixierung der Strips mit 1 ml Agarose (0,5 % in Elektrophoresepuffer) und die Montage der Gelkammern in der Elektrophoresekammer. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 °C, zunächst für 45 Minuten bei 20 mA pro Gel, danach für etwa drei Stunden bei 40 mA pro Gel. Um die Vergleichbarkeit der Gelläufe zu gewährleisten, wurde der Vorgang jeweils gestoppt, wenn das erste Bromphenolblau der Lauffront in den Puffer unterhalb der Gele schlierte. Die Überführung der Gele in die Fixierlösung erfolgte zur Vermeidung von Keratinverunreinigungen mit gewaschenen, puderfreien Handschuhen. Die Fixierung erfolgte über Nacht in 250 ml einer Fixierlösung mit 35

% Ethanol, 5 % Acidum aceticum und 0,001 % SDS in einer Polycarbonat-Färbeschale.

3.2.10 Anfärben der Gele

Die Proteinspots in den Gelen wurden mit dem Farbstoff SYPRO-Orange der Firma Invitrogen Molecular Probes, Oregon (USA) angefärbt.

Unter Einhaltung der o.g. Vorsichtsmaßnahmen gegen Keratinverunreinigungen wurde die Fixierlösung abgegossen und zweimal für je 20 Minuten unter Schwenken in 200 ml einer Lösung aus 2 % *Acidum aceticum* und 0,001 % SDS in *Aqua dest.* gewaschen. In einer zweiten Polycarbonat-Färbeschale erfolgte über Nacht die Inkubation in 150 ml Färbelösung aus dem unter 3.1.3 beschriebenen Waschpuffer mit einem 1/4000 Volumen SYPRO-Orange.

Der Erfolg der Anfärbung von Proteinen wurde auf dem *Dark Reader transilluminator* kontrolliert. Der *Dark Reader* ist ein Leuchttisch, dessen blaues Licht den fluoreszierenden Farbstoff sichtbar macht.

3.2.10.1 Anfärben der Gele mit speziellem Phosphoproteinfarbstoff

Mit dem Farbstoff *Phos-tag*[®] 300/460 der Firma PerkinElmer (Walham, USA) wurde der Versuch unternommen, gezielt die Phosphoproteine in einem das gesamte Proteom enthaltenden SDS-Gel anzufärben. Dabei entfällt der Schritt der Phosphoprotein-Anreicherung.

Der Farbstoff bindet ladungsabhängig mit einem Zink-Chelatkomplex an die Phosphomonoester-Reste von Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin. Die letztlich detektierte Spotintensität ist linear abhängig von der Proteinphosphorylierung (236). Um den allgemeinen Proteingehalt eines Spots zu quantifizieren, können die mit *Phos-tag* gefärbten Gele mit einem anderen, konventionellen Proteinfarbstoff, z. B. SYPRO-Orange, gegengefärbt werden.

Für den Färbeversuch wurde eine zweidimensionale Elektrophorese mit einem nicht-aufgereinigten Proteingemisch durchgeführt. Es wurden 250 µg Protein auf einen IPG-Strip geladen und isoelektrisch fokussiert. Die SDS-Gelelektrophorese

erfolgte nach Äquilibrierung des IPG-Strips wie üblich. Die Fixierung des Gels erfolgte mit 250 ml einer Fixierlösung bestehend aus 50 % Ethanol und 10 % *Acidum aceticum* in *Aqua_{dest.}*. Aus Gründen der Arbeitssicherheit wurde entgegen der Empfehlungen des Herstellers mit Ethanol anstelle Methanols gearbeitet. Nach der über-Nacht Fixierung wurde das Gel dreimal für je 10 Minuten mit 200 ml *Aqua_{dest.}* gewaschen bevor es mit 250 ml der nach Angaben des Herstellers präparierten *Phos-tag*-Färbelösung für 90 Minuten inkubiert wurde. Da bei diesem Vorversuch weder unter UV-Licht noch nach dem Scannen der Gele (siehe 3.2.11) mit Anregung bei 300 nm Spots zu detektieren waren, wurde durch Nachfärben mit SYPRO-Orange überprüft, ob die Fixierung erfolgreich war, wobei deutliche Spots detektiert wurden. Sich anschließende Versuche zum Anfärben mit dem *Phos-tag* Farbstoff waren nicht mehr Teil dieser Arbeit.

3.2.11 Scannen der Gele

Am Tag nach dem Anfärben der 2D PAGE-Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO-Orange wurden die Gele auf einem Fluoreszenzscanner eingelesen, was ihre Digitalisierung erlaubte. Die Anregung erfolgte mit blauem Licht (*blue fluorescence*), die PMT-Spannung betrug 1000 V und die Auflösung 100 µm. Vor dem Auflegen der Gele wurde das Vorlagenglas des Scanners gründlich zuerst mit 70 % Ethanol, dann mit *Aqua_{dest.}* und fusselfreien Tüchern gereinigt. Spuren der Färbelösung wurden durch kurzes Schwenken der Gele in Waschpuffer entfernt. Nach dem Scanvorgang lagerten die Gele bis zur weiteren Verwendung in der Färbelösung.

3.2.12 Analyse der Gelbilder

Die gescannten Gelbilder wurden mit der Software *Delta2D* in der Version 3.6 analysiert. Es wurden jeweils die drei Gele einer Versuchsgruppe mit den intensivsten Spots ausgewählt und in das Programm importiert.

Analog ihrer Zugehörigkeit zu einer Versuchsgruppe (*Nullkontrolle, Bestrahlung, Flurbiprofenbehandlung, Flurbiprofenbehandlung plus Bestrahlung*), wurden die Triplikate auch bei der softwaregestützten Auswertung zu je einer Gruppe

zusammengefasst. Im ersten Schritt der Auswertung wurden die Gele eines Triplikats untereinander gewarpt. *Warping* bezeichnet den Vorgang des übereinander Legens zweier Gele, sodass korrespondierende Spots an gleicher Stelle zu liegen kommen. Die zu warpenden Gele werden dabei in zwei verschiedenen Farben in einem Fenster – der sog. *dual view* – angezeigt und Vektoren, die Spots auf dem einen mit den korrespondierenden Spots auf dem anderen Gel verbinden werden generiert. Durch den beschriebenen Vorgang können Laufweitenunterschiede zwischen den Gelen ausgeglichen werden.

Zur Kompensation statistischer und experimenteller Schwankungen innerhalb der Replikate wurde als nächstes ein Durchschnittsbild der drei gewarpten Gele, das sog. *Average-Gel*, erstellt. In diesem rein virtuell vorhandenen *Average-Gel* sind die Spots so dargestellt, wie es dem Mittelwert ihrer Graustufen in den Einzelgelen entspricht.

Die vier so entstandenen *Average-Gele* wurden wiederum untereinander gewarpt und ein virtuelles Fusionsbild im sog. Union-Modus generiert. Auf dem entstehenden *Union-Gel* sind alle Spots des Projekts addiert. Es kann daher als Karte des Phosphoproteoms der untersuchten Kopf- und Hals-Tumorzellen bezeichnet werden. Es folgte die Identifizierung von Spots mithilfe der Software, die anhand zuvor festgelegter Parameter entsprechende Muster auf dem Gel erkennt. Das Ergebnis der automatischen Spotdetektion wurde sodann überprüft und manuell nachgebessert. Es entstand eine auf die anderen Gele übertragbare Spotmaske, die erlaubt, dass die Spots eines *Average-Gels* mit den korrespondierenden Spots eines anderen *Average-Gels* durch Analyse der relativen Spotquantität (% V) verglichen werden können. % V beschreibt die relative Quantität eines Spots unter Ausschluss des Hintergrunds. Die Stärke aller Spots eines Gels beträgt 100 %.

Die Quantifizierung der Spots zweier zu vergleichender *Average-Gele* erfolgte durch das Aufrufen der sog. *Quantitation Table* des Programms, die die relative Spotquantität der Spots auf den *Average-Gelen* anzeigt. Das Gel, auf dem differentiell exprimierte Proteinspots gefunden werden sollen, wird als *Sample-Gel* bezeichnet und das Gel, mit dem die Spots auf dem *Sample-Gel* verglichen werden sollen, das also den Bezug herstellt, wird als *Master-Gel* bezeichnet. Um korrespondierende Spots miteinander zu vergleichen, wird das Verhältnis von % V eines *Sample-Spots* zum % V des korrespondierenden *Master-Spots* gebildet.

Dieses Verhältnis wird im Folgenden als Expressionsratio bezeichnet. Bei der Analyse der Expressionsratio der detektierten Spots wurden durch das Setzen geeigneter Filter solche Spots ausgeblendet, deren Expressionsratio auf eine nur wenig unterschiedliche Proteinexpression hinwies. Auf diese Weise wurden Spots auf dem *Sample-Gel* identifiziert, die im Vergleich zum *Master-Gel* eine mindestens doppelt so hohe oder höhere bzw. eine nur halb so große oder geringere Expression aufwiesen. Bei diesen Faktoren – Expressionsratio ≥ 2 bzw. ≤ -2 – ist im Allgemeinen von einer signifikant unterschiedlichen Expression auszugehen.

3.2.13 Picken der Spots, Trypsinierung und Proteinextraktion

In der Vorbereitung für die massenspektrometrische Proteinidentifikation wurden diejenigen Spots, deren softwaregestützte Analyse eine differentielle Expression ergeben hatte, aus den Gelen ausgestochen. Üblicherweise wird dies als *spotpicking* bezeichnet. Anschließend wurden die Proteine in den Gelstückchen durch die Zugabe der Protease Trypsin in Peptide aufgespalten und diese Peptide aus den Gelstückchen extrahiert und getrocknet. Bei allen Arbeiten wurde wieder auf die Vermeidung von Keratinverunreinigungen geachtet. Es wurde mit puder- und latexfreien Handschuhen gearbeitet, die vor ihrer Verwendung gründlich mit Wasser und Seife gereinigt wurden, außerdem wurde vermieden, sich über die Reaktionsgefäße zu beugen. Zusätzlich wurden das spotpicking sowie alle Pipettierschritte in der Reinraumwerkbank durchgeführt.

Die Glasauflage des *Dark Readers* wurde gereinigt, mit fusselfreien Tüchern abgewischt und das Gel positioniert. Mit unbenutzten 3 ml Einweg-Pasteurpipetten wurden die interessierenden Spots aus dem Gel gepickt und in je ein entsprechend beschriftetes 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Etwa 20 % der interessierenden Spots waren nicht groß genug, um gepickt zu werden. Die Gelstückchen wurden sodann mit jeweils 30 μ l Acetonitril überschichtet, kurz geschüttelt und anzentrifugiert und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Acetonitril abgesaugt und das Gelstückchen für wiederum 15 min bei geöffnetem Deckel und bei RT getrocknet. Es folgte die Zugabe von je 4,5 μ l Trypsinlösung (12,5 ng/ μ l in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat [NH_4HCO_3]) und eine Inkubation bei 4 °C für 45 min, sodass die Gelstückchen wieder aufquellten und die Protease in das Gel diffundierte. Der eigentliche Proteinverdau

fand bei der sich anschließenden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank über Nacht statt. Mit dem Ziel der Peptidextraktion aus den Gelstückchen wurden in jedes Reaktionsgefäß 30 µl 25 mM NH₄HCO₃ zugegeben, für 20 min im Ultraschallbad inkubiert und der Überstand danach in ein 0,5 ml LoBind® Reaktionsgefäß überführt. Zwei Extraktionsschritte mit Zugabe von je 30 µl eines Gemischs aus Ameisensäure und Acetonitril in Wasser (5 % / 50 % / v/v) und Inkubation im Ultraschallbad folgten. Die Überstände wurden jeweils mit demjenigen aus der ersten Extraktion vereinigt. Anschließend wurden die Überstände eingetrocknet. Dazu wurden die drei vereinigten Überstände zum Durchmischen zunächst geschüttelt und die Deckel der Reaktionsgefäße perforiert. Das Trocknen fand für 10 h in der Speedvac statt. Nach Abkleben der Perforation im Deckel mit Folie konnten die getrockneten Peptide bei -20 °C bis zur Aufbereitung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie gelagert werden.

3.2.14 Proben-Aufbereitung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie

Für die Proteinidentifizierung durch Peptidmassen Fingerabdruck mussten die Peptidproben zunächst aufbereitet werden und in einer kristallinen Matrix auf die Probenteller des *MALDI-targets* aufgetragen werden. Das hier verwendete *MALDI-target* (AnchorChip™ 600/384 T F, Bruker Daltronic GmbH, Bremen) wurde in *double-layer* Technik präpariert, d.h. die Peptide wurden zwischen zwei Matrix-Schichten aufgetragen. Alle Arbeiten wurden mit puder- und latexfreien Handschuhen durchgeführt, da sie keine Weichmacher enthalten, die das Auskristallisieren der Proben stören können. Zur Vermeidung von Verunreinigungen auf dem target wurde es vor dem Auftragen der Proben in drei Schritten – mit heißem Leitungswasser, Methanol (HPLC grade) und H₂O (HPLC grade) – gereinigt. Das Auftragen der Proben erfolgte in der Reinraumwerkbank.

Die getrockneten Peptidproben wurden nach dem Vorbereiten der Matrix (siehe 3.1.3) in einem Probenlösemittel aus 99,9 % H₂O (HPLC grade) und 0,1 % TFA resolubilisiert. Dazu wurden die getrockneten Proben für 5 min bei 14 000 g an den Boden der Reaktionsgefäße zentrifugiert und dann mit je 5 µl des Probenlösemittels versetzt, gevortext und nochmals 1 min bei 14 000 g zentrifugiert. Die Zugabe des Probenlösemittels erfolgte jeweils mit einer neuen Pipettenspitze. Im Anschluss wurden Matrix und Proben auf das *target* aufgetragen: Die erste Schicht

bestand aus 0,5 µl der gelösten Matrix pro Probensteller. Nachdem diese Schicht getrocknet war, wurden je 1 µl gelöste Peptide aufgetragen. Um Doppelbestimmungen durchführen zu können, wurde jeweils hintereinander ein Paar der gleichen Probe aufgetragen. Zur Vermeidung von Verunreinigungen, wurde für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwendet. Waren auch die Peptidlösungen auf der ersten Schicht Matrix getrocknet, wurde die zweite Schicht Matrix, wiederum mit 0,5 µl pro Probenauftragungspunkt aufgegeben. Die Verteilung der Proben auf die Probensteller wurde unterdessen protokolliert.

Die massenspektrometrischen Messungen erfolgten am MALDI-TOF Gerät in den Labors der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde an der Universitätsmedizin Mainz. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch Peptidmassen Fingerabdruck. Hierbei werden die gemessenen Spektren mit den theoretischen Spektren eines Proteinverdau *in silico* auf zwei verschiedenen Datenbanken (NCBI und swissprot) verglichen. Nur eindeutig identifizierte Proteine wurden in die Analyse der Ergebnisse aufgenommen. Zusätzlich wurde anhand der Lage im Gel und den theoretischen Angaben des Molekulargewichts sowie des isoelektrischen Punkts auf der Protein Knowledgebase (UniProtKB) eine Kontrolle der Plausibilität der Identifizierungen angeschlossen.

3.2.15 Recherche nach der biologischen Relevanz der Ergebnisse

Im Anschluss an die Identifikation der regulierten Proteine stellte sich die Frage nach der biologischen Bedeutung der Ergebnisse. Von besonderer Wertigkeit waren dabei zwei Fragestellungen:

- (1) Wie kann die Hoch- resp. Herabregulierung gerade dieses oder jenes Proteins bei gerade dieser oder jener Behandlung interpretiert werden?
- (2) Ist die gleichgerichtete Regulation mehrerer Proteine durch ein und dieselbe Behandlung Folge einer funktionellen Interaktion dieser Proteine bzw. Folge eines übergeordneten Prozesses im Sinne einer Regulation durch einen *global player*?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde auf verschiedenen Datenbanken recherchiert.

Die *Protein Knowledgebase (UniProtKB)* ermöglichte durch die dort verzeichneten *Gene Ontology-* (GO-) Annotationen einen Überblick über Funktion, subzelluläre Lokalisation, posttranslationale Modifikationen und die biologischen Prozesse, in die das Protein involviert ist. Mit Hilfe des bioinformatischen Systems *WEBGestalt (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit)* konnten die GO-Annotationen der differentiell exprimierten Proteine analysiert werden. *WEBGestalt* vergleicht eine vom Benutzer hochgeladene Liste von Genen in vordefinierten funktionellen Kategorien, um Kategorien zu identifizieren, in denen eine Häufung der vom Benutzer hochgeladenen Gene vorkommt. Die vordefinierten funktionellen Kategorien sind im Falle der vorliegenden Arbeit die GO-Annotationen. Ein ausführlicher Einblick in die zelluläre Funktion des Proteins konnte durch die aufwendige Recherche seiner *GeneRIFs (Gene References into Function)* auf der *NCBIGene* Datenbank gewonnen werden. *GeneRIFs* vereinfachen den Zugang zu Experimenten, die zum Verständnis eines Gens und der Funktion des zugehörigen Proteins beitragen. Besonderes Augenmerk wurde bei der Recherche auf solche Publikationen gelegt, die die Funktion des Proteins in der zellulären Stressantwort und in der Karzinogenese zeigen und die eine Relevanz für die Beantwortung der Fragestellungen des Experiments hatten. Zusätzlich zur Analyse der *GeneRIFs* wurde auf der Meta-Datenbank *PubMed* gezielt nach für die Fragestellungen relevanten Publikationen gesucht. Die Eingabe eines Proteins in die *STRING* Datenbank (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) lieferte Hinweise auf bekannte und mögliche Protein-Protein-Interaktionen. Auch nach Interaktionen innerhalb einer ganzen Gruppe von Proteinen konnte gesucht werden. Die beiden *Pathway* Datenbanken *KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)* und *Reactome* lieferten wertvolle ergänzende Informationen, in welche intrazellulären Signalkaskaden ein Protein involviert ist. Die Lokalisation von Proteinphosphorylierungen und die Identität der bewerkstelligenden Kinase wurden auf *PhosphoSitePlus* recherchiert.

4. Ergebnisse

4.1 Validierung der Phosphoprotein-Aufreinigung

4.1.1 NanoUPLC-MS: Anteil der Phosphoproteine in Gesamt- und Phosphoproteomproben

Zur Validierung der Anreicherung von Phosphoproteinen durch die IMAC wurden Proben einer kompletten Experimentalgruppe (alle Versuchsgruppen und Nullkontrolle) vor und nach dem Chromatographie-Schritt mit der nanoUPLC-MS-Methode untersucht. Dabei handelt es sich um ein Gel- und labelfreies Verfahren zur Identifikation und Quantifizierung von Proteinen in kleinsten Mengen komplexer Proben (solche Proben also, die eine große Menge an unterschiedlichen Proteinen enthalten). Wie unter 3.2.7.2 beschrieben wurden die Ergebnisse dazu genutzt den Anteil phosphorylierbarer Proteine in den jeweiligen Proben abzuschätzen. Die Recherchen in der UniProt-Datenbank ergeben dabei nicht, ob die Proteine zum Zeitpunkt der Untersuchung tatsächlich im phosphorylierten Zustand vorlagen, sie können aber zeigen, ob es sich bei dem jeweils betrachteten Protein um ein phosphorylierbares Protein handelt. Konsequenterweise war dabei zu erwarten, dass der relative Anteil an Phosphoproteinen nach der Aufreinigung höher ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse der nanoUPLC-MS hinsichtlich der Validierung der Anreicherung von Phosphoproteinen in den Proben durch IMAC gezeigt. Ergebnisse dieses Versuchs, die die Quantifizierung einzelner Proteine in verschiedenen Experimentalgruppen betreffen sowie ein Vergleich mit den Ergebnissen des 2D-Experiments werden später in diesem Kapitel und im Anhang präsentiert.

4.1.1.1 Versuchsgruppe Nullkontrolle

In der ursprünglichen Gesamtproteomprobe vor Aufreinigung, i.F. als Nativprobe bezeichnet, wurden 321 Proteine identifiziert. Hiervon sind in der Uniprot-Datenbank 242 als phosphorylierbar beschrieben. Dies entspricht einem theoretischen Phosphoprotein-Anteil von 75,4 % in dieser Probe. In der Phosphoproteomprobe, i.F. als aufgereinigte Probe bezeichnet, wurden 160 Proteine

identifiziert, darunter 133 phosphorylierbare Proteine, deren Anteil damit 83,1 % entspricht. Von den 321 Proteinen in der Nativprobe konnten 97 in der aufgereinigten Probe wiederidentifiziert werden. Der Anteil phosphorylierbarer Proteine beträgt hier 79,4 % (77 phosphorylierbare Proteine). Die Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse im Überblick. Die Identitäten der bestimmten Proteine in der Nativprobe und in der korrespondierenden aufgereinigten Probe waren nicht deckungsgleich; dies in dem Sinne, dass in der aufgereinigten Probe Proteine identifiziert wurden, die zuvor nicht in der Nativprobe identifiziert wurden. Da es sich aber um korrespondierende Proben aus demselben Versuchsaufbau handelte, mussten theoretisch alle Proteine, die in der aufgereinigten Probe identifiziert wurden, zuvor auch in der Nativprobe enthalten gewesen sein. Sie wurden in der letztgenannten nur nicht identifiziert – vermutlich wegen der geringeren relativen Abundanz in der Nativprobe verglichen mit der aufgereinigten Probe. Um darzustellen, dass auch unter denjenigen Proteinen, die in beiden zusammenhängenden Proben – Nativprobe und aufgereinigte Probe – identifiziert wurden, nach der Aufreinigung relativ mehr Phosphoproteine enthalten sind als vor der Aufreinigung über die IMAC-Säulen wird in den Tabellen 4.1 bis 4.4 jeweils angegeben, wie hoch der Phosphoproteinanteil unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen ist.

Tab. 4.1: Anteil phosphorylierbarer Proteine in der *Nullkontrolle* von Nativprobe und aufgereinigter Probe nach IMAC sowie Anteil phosphorylierbarer Proteine in der aufgereinigten Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen

	Anzahl identifizierter Proteine insgesamt	Darunter als phosphorylierbar beschrieben (Anzahl)	phosphorylierbarer Anteil in Prozent
Nativprobe	321	242	75,4 %
aufgereinigte Probe nach IMAC	160	133	83,1 %
In Nativprobe und aufgereinigter Probe enthalten	97	77	79,4 %

4.1.1.2 Versuchsgruppe 8 Gy Bestrahlung

In der Nativprobe wurden 347 Proteine identifiziert, darunter 256 Phosphoproteine (73,8 %). In der aufgereinigten Probe konnten 173 Proteine identifiziert werden, bei einem Phosphoproteinanteil von 83,3 % (145 Phosphoproteine absolut). 97 der 173 Proteine in der aufgereinigten Probe wurden auch bereits in der Nativprobe identifiziert, hierunter sind 83 Phosphoproteine, deren Anteil somit 85,6 % beträgt. Die folgende Tabelle 4.3 liefert eine Übersicht über die Anzahl der Proteine und den Phosphoproteinanteil.

Tab. 4.2: Anteil phosphorylierbarer Proteine der Versuchsgruppe 8 Gy Bestrahlung von Nativprobe und aufgereinigter Probe nach IMAC sowie Anteil phosphorylierbarer Proteine in der aufgereinigten Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen

	Anzahl identifizierter Proteine insgesamt	Darunter als phosphorylierbar beschrieben (Anzahl)	phosphorylierbarer Anteil in Prozent
Nativprobe	347	256	73,8 %
aufgereinigte Probe nach IMAC	173	145	83,8 %
In Nativprobe und aufgereinigter Probe enthalten	97	83	85,6 %

4.1.1.3 Versuchsgruppe 200 µM Flurbiprofenapplikation

In der Nativprobe wurden 337 Proteine identifiziert, 251 Vertreter sind als mögliche Phosphoproteine beschrieben (74,5 %). Nach Elution der Probe durch das IMAC-Verfahren befinden sich 194 identifizierte Proteine in der Probe, hiervon sind 166 phosphorylierbar (85,6 %). 108 Proteine aus der Nativprobe werden in der aufgereinigten Probe wiedergefundenen, hierunter 87 mögliche Phosphoproteine (82,1 %). Eine Übersicht der Ergebnisse kann der Tabelle 4.5 entnommen werden.

Tab. 4.3: Anteil phosphorylierbarer Proteine in der Versuchsgruppe 200 μM Flurbiprofenapplikation von Nativprobe und aufgereinigter Probe nach IMAC sowie Anteil phosphorylierbarer Proteine in der aufgereinigten Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen			
	Anzahl identifizierter Proteine insgesamt	Darunter als phosphorylierbar beschrieben (Anzahl)	phosphorylierbarer Anteil in Prozent
Nativprobe	337	251	74,5 %
aufgereinigte Probe nach IMAC	194	166	85,6 %
In Nativprobe und aufgereinigter Probe enthalten	108	87	80,6 %

4.1.1.4 Versuchsgruppe 200 μ M Flurbiprofenapplikation plus 8 Gy Bestrahlung

In der Nativprobe wurden 300 Proteine identifiziert, darunter 219 mögliche Phosphoproteine (73,0 %). Nach der Metallaffinitäts-Chromatographie waren in der aufgereinigten Probe 136 Proteine enthalten, darunter 116 Phosphoproteine (85,3 %). Von 300 Proteinen aus der Nativprobe fanden sich 86 in der aufgereinigten Probe wieder, 73 von diesen sind phosphorylierbare Proteine, deren Anteil somit 79,4 % entspricht. (siehe Tabelle 4.7)

Tab. 4.4: Anteil phosphorylierbarer Proteine in der Versuchsgruppe 200 μM Flurbiprofenapplikation plus 8 Gy Bestrahlung von Nativprobe und aufgereinigter Probe nach IMAC sowie Anteil phosphorylierbarer Proteine in der aufgereinigten Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen			
	Anzahl identifizierter Proteine insgesamt	Darunter als phosphorylierbar beschrieben (Anzahl)	phosphorylierbarer Anteil in Prozent
Nativprobe	300	219	73,0 %
aufgereinigte Probe nach IMAC	136	116	85,3 %
In Nativprobe und Eluat enthalten	86	73	84,9 %

4.1.1.5 Ergebnisse der Validierung der Phosphoprotein-Anreicherung durch nanoUPLC-MS im Überblick

Die durch nanoUPLC-MS identifizierten Proteine wurden einer Recherche auf der Protein Knowledgebase (UniProt-Datenbank) unterzogen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Vorliegen posttranslationaler Modifikationen im Sinne einer Phosphorylierung gelegt. Die Abbildung 4.1 zeigt den prozentualen Anteil von Proteinen, die als phosphorylierbar gelten, in der Nativprobe, in der aufgereinigten Probe sowie unter den in Nativprobe und aufgereinigter Probe identifizierten Proteinen der jeweiligen Versuchsgruppe. Die Recherche in der Uniprot-Datenbank ergibt natürlich nicht, ob die Proteine zum Zeitpunkt der Untersuchung tatsächlich im phosphorylierten Zustand vorlagen.

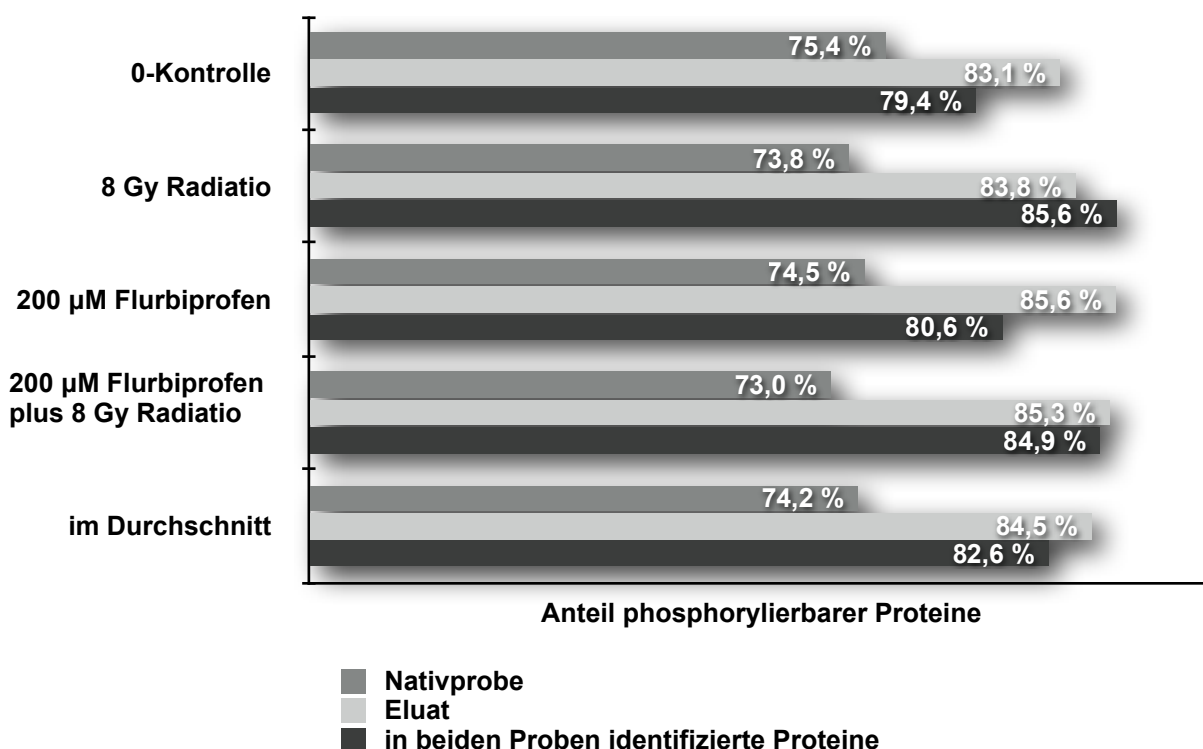


Abb. 4.1: Prozentualer Anteil phosphorylierbarer Proteine in Nativprobe, aufgereinigter Probe und unter den in beiden Proben identifizierten Proteinen mit einem mittleren Anteil theoretisch phosphorylierbarer Proteine in den nativen, nicht-aufgereinigten Proben von 74,2 % und einem entsprechend höheren durchschnittlichen Anteil von 84,5 % in den aufgereinigten Proben nach IMAC. Der Vollständigkeit halber ist auch der Anteil phosphorylierbarer Proteine unter den in jeweils beiden korrespondierenden Proben identifizierten Proteinen angegeben. Hier liegt der durchschnittliche Anteil von phosphorylierbaren Proteinen bei 82,6 %.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass nach der IMAC in allen Proben relativ mehr Phosphoproteine enthalten waren (durchschnittlich 84,5 %) als vor diesem Anreicherungsschritt (durchschnittlich 74,2 %).

4.2 Proteinidentifizierung und Effekte der Zellbehandlung

Insgesamt wurden 90 Spots aus den Gelen gepickt und für die MALDI-TOF MS aufgearbeitet. Üblicherweise werden bei 2D PAGE Experimenten in der Proteomik solche Spots gepickt, die in der softwaregestützten Analyse der Gelbilder auf eine differentielle Expression der zugrundeliegenden Proteine zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen hinweisen. So wurden hier diejenigen Spots gepickt, deren Intensität auf eine um mindestens den Faktor 2 erhöhte oder erniedrigte Expression in mindestens einem angestellten Versuchsgruppen-Vergleich hinwies. Etwa einem Drittel der gepickten Spots konnte nach der massenspektrometrischen Analyse durch den Peptidmassen Fingerabdruck ein zugrunde liegendes Protein eindeutig zugeordnet werden. Nach den Erfahrungswerten aus der eigenen Arbeitsgruppe liegt der Anteil der Identifizierungen bei 2D PAGE-Experimenten im Bereich von zwei Dritteln. Ursachen einer nicht-Identifizierung könnten einerseits in einer zu geringen Beladung der Strips für die IEF liegen, die durch hohe Proteinverluste bei der Ultrazentrifugation zustande kam. Andererseits traten Verzögerungen im Versuchsablauf auf, sodass die getrockneten Peptidproben lange konserviert werden mussten, bis die Aufarbeitung für die MALDI-TOF und deren Durchführung möglich waren.

Wie im vorangegangenen Kapitel Materialien und Methoden ausgeführt ist, wurden die Identifizierungen auf ihre Plausibilität hin geprüft und die Spots auf dem *Union-Gel* entsprechend mit den Kurzbezeichnungen der betreffenden Proteine, i.F. als *Spotlabel* bezeichnet, benannt. Abbildung 4.2 zeigt die auf diese Weise entstandene Karte des Phosphoproteoms der untersuchten HNSCC-Zelllinie, auf der die identifizierten Proteine verzeichnet sind. Spots, für die das zugrunde liegende Protein nicht ermittelt werden konnte, blieben mit der ihnen zuvor zugewiesenen ID gekennzeichnet.

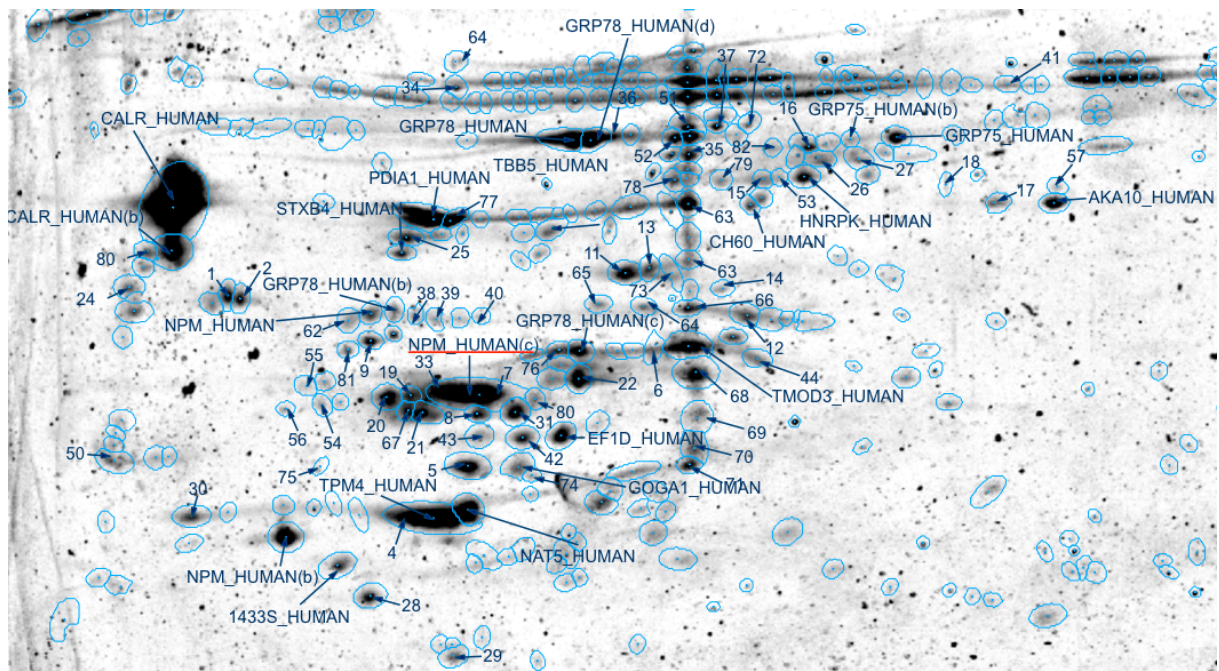


Abb. 4.2: Gepickte und identifizierte Proteine im *Uniongel*. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem *Uniongel*. Spots, für die das zugrundeliegende Protein nicht ermittelt werden konnte blieben mit der ihnen zugewiesenen ID gekennzeichnet.

Die Quantifizierung der Spots auf den *Average-Gelen* durch Vergleich der relativen Volumina korrespondierender Spots erfolgte, wie unter 3.2.12 beschrieben, im Anschluss der Übertragung der *Spotlabels* vom *Union-Gel* auf die *Average-Gele* der Versuchsgruppen. Eine deutlich verstärkte Spotintensität liegt vor, wenn $V\%$ (relative Spotquantität, Erläuterung s. 3.2.12) eines Spots auf einem interessierenden Gel (dem *Sample-Gel*) im Verhältnis zum korrespondierenden Spot auf einem Vergleichsgel (dem *Master-Gel*) um den Faktor 2 oder mehr größer ist ($V\% \text{ Samplespot} / V\% \text{ Masterspot} \geq 2$), entsprechend einer mindestens doppelt so starken relativen Spotquantität. Umgekehrt ist die deutlich verminderte Spotintensität definiert durch ein Verhältnis der relativen Spotquantitäten von *Samplespot-zu-Masterspot* gleich oder kleiner 0,5 ($V\% \text{ Samplespot} / V\% \text{ Masterspot} \leq 1$), entsprechend einer relativen Spotquantität, die nur halb so stark oder schwächer ist. Die Angabe erfolgt in reziprok negativen Werten, d.h. wenn ein Spot auf dem *Sample-Gel* beispielsweise nur halb so stark, wie auf dem *Master-Gel* ist, wird dies nicht mit dem Faktor 0,5 (1:2) angegeben, sondern mit dem Faktor -2. Es wurden also solche Spots gepickt und für die massenspektrometrischen Messungen aufbereitet, die bei mindestens einem der *Sample-zu-Master* Vergleiche auf eine um

mindestens den Faktor 2 resp. -2 veränderte Expression des zugrundeliegenden Proteins aufwiesen.

Die nächsten Kapitel stellen die Ergebnisse der Spotquantifizierung dar. In 4.2.1 werden anhand unterschiedlicher Sample/Master-Paarungen Spots mit veränderter Intensität beschrieben. In 4.2.2 wird der Versuch unternommen, Effekte der Bestrahlung, Effekte der Behandlung mit Flurbiprofen und den zusätzlichen Effekt einer Behandlung mit Flurbiprofen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zu zeigen.

4.2.1 Spots mit deutlich veränderter Intensität

4.2.1.1 8 Gy Bestrahlung verglichen mit der Nullkontrolle

Die Tabelle 4.5 listet die Proteine aus bestrahlten Zellen auf, die im Vergleich zur Nullkontrolle um mindestens den Faktor 2 stärker resp. schwächer exprimiert waren. Es ist der ausführliche Proteinname, dessen Kurzform, der Name des entsprechenden Genlocus und die Faktorenstärke der Regulation angegeben. (Berechnung siehe vorangehender Abschnitt 4.1 und 3.2.12).

Tab. 4.5: Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Bestrahlung vs. Nullkontrolle (Av 8 Gy Radiatio / Av 0-Kontrolle $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$)			
Name des Proteins	Kurzform	Genname	Faktor
60 kDa heat shock protein	CH60_HUMAN	HSPD1	-136,4
A kinase anchor protein 10	AKA10_HUMAN	AKAP10	-81,9
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	HNRNPK	-13,0
Tubulin beta chain	TBB5_HUMAN	TUBB	-10,9
Stress-70 protein	GRP75_HUMAN	HSPA9	-5,7
Calreticulin	CALR_HUMAN	CALR	-4,8
78 kDa glucose-regulated protein (a)*	GRP78_HUMAN(a)	HSPA5	-3,3
Nucleophosmin	NPM_HUMAN	NPM1	-2,7
Elongation factor 1-delta	EF1D_HUMAN	EEF1D	-2,6
Syntaxin-binding protein 4	STXB4_HUMAN	STXBP4	-2,2
78 kDa glucose-regulated protein (d)*	GRP78_HUMAN(d)	HSPA5	-2,0
Golgin subfamily A member 1	GOGA1_HUMAN	GOLGA1	4,2

Tab. 4.5: Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Bestrahlung vs. Nullkontrolle (Av 8 Gy Radiatio / Av 0-Kontrolle $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$)

Name des Proteins	Kurzform	Genname	Faktor
78 kDa glucose-regulated protein (b)*	GRP78_HUMAN(b)	HSPA5	5,0

* In den Experimenten, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, wurde GRP-78 an verschiedenen Stellen in den 2D PAGE-Gelen detektiert. Aufgrund der Lage der vier gefundenen Varianten in den Gelen ist anzunehmen, dass es sich bei den Varianten (a) und (d) um unterschiedliche Phosphorylierungsstadien des Proteins handelt, da beide nebeneinander im Gel zu liegen kommen. Werden die angenommenen Molekulargewichte der beiden anderen Varianten (b) und (c) addiert, ist die sich ergebende Summe etwa so groß wie das Molekulargewicht der beiden anderen Varianten, sodass vermutet werden kann, dass es sich bei (b) und (c) um Fragmente handelt.

4.2.1.2 Applikation von 200 μM Flurbiprofen im Vergleich zur Nullkontrolle

Die Tabelle 4.6 listet die Proteine aus Flurbiprofen-behandelten Zellen auf, die im Vergleich zur Nullkontrolle deutlich stärker resp. schwächer exprimiert waren. (Angaben wie in 4.1.1.1).

Tab. 4.6: Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Flurbiprofen vs. Nullkontrolle (Av 200 μM Flurbiprofen/ Av 0-Kontrolle $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$)

Name des Proteins	Kurzform	Genname	Faktor
A kinase anchor protein 10	AKA10_HUMAN	AKAP10	-2566,89
Syntaxin-binding protein 4	STXB4_HUMAN	STXBP4	-582,1
60 kDa heat shock protein	CH60_HUMAN	HSPD1	-180,1
Tubulin beta chain	TBB5_HUMAN	TUBB	-27,1
Calreticulin	CALR_HUMAN	CALR	-5,8
78 kDa glucose-regulated protein (a)*	GRP78_HUMAN(a)	HSPA5	-3,9
Stress-70 protein	GRP75_HUMAN(b)	HSPA9	-2,5
Stress-70 protein	GRP75_HUMAN	HSPA9	-2,1
14-3-3 protein sigma	1433S_HUMAN	SFN	-2,0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	HNRNPK	-2,0
78 kDa glucose-regulated protein (c)*	GRP78_HUMAN(c)	HSPA5	4,9
Tropomodulin-3	TMOD3_HUMAN	TMOD3	13,7

* siehe Fußnote zu den GRP78-Varianten in Tab. 4.5

4.2.1.3 Applikation von 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio im Vergleich zur Nullkontrolle

Analog der Tabellen 4.5 und 4.6 listet die Tabelle 4.7 Proteine aus den sowohl bestrahlten als auch mit Flurbiprofen inkubierten Zellen auf, die im Vergleich zur Nullkontrolle deutlich stärker resp. vermindert exprimiert waren. (Angaben wie in 4.1.1.1).

Tab. 4.7: Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Flurbiprofen plus Bestrahlung vs. Nullkontrolle			
(Av 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio / Av 0-Kontrolle $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$)			
Name des Proteins	Kurzform	Genname	Faktor
A kinase anchor protein 10	AKA10_HUMAN	AKAP10	-33,93142
60 kDa heat shock protein	CH60_HUMAN	HSPD1	-9,00972
Calreticulin	CALR_HUMAN	CALR	-8,63279
Stress-70 protein	GRP75_HUMAN	HSPA9	-8,6292
Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	P4HB	-3,83019
N-terminal acetyltransferase B complex catalytic subunit	NAT5_HUMAN	NAT5	-3,47284
Stress-70 protein (b)	GRP75_HUMAN(b)	HSPA9	-3,27315
78 kDa glucose-regulated protein (b)*	GRP78_HUMAN(b)	HSPA5	-2,83148
78 kDa glucose-regulated protein(a)*	GRP78_HUMAN(a)	HSPA5	-2,54795
78 kDa glucose-regulated protein (d)*	GRP78_HUMAN(d)	HSPA5	-2,11873

* siehe Fußnote zu den GRP78-Varianten in Tab. 4.5

4.2.1.4 Applikation von 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung mit 8 Gy

Die Tabelle 4.8 zeigt diejenigen Proteine aus Zellen mit kombinierter Behandlung, die im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung deutlich stärker resp. deutlich schwächer exprimiert erscheinen. Angaben wie in den vorangegangenen Tabellen 4.9 - 4.11.

Tab. 4.8: Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Flurbiprofen plus Bestrahlung vs. alleinige Bestrahlung
(Av 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio / Av 8 Gy \geq 2,0 oder \leq -2,0)

Name des Proteins	Kurzform	Genname	Faktor
78 kDa glucose-regulated protein (b)*	GRP78_HUMAN(b)	HSPA5	-14,17788
Golgin subfamily A member 1	GOGA1_HUMAN	GOLGA1	-6,92586
Stress-70 protein	GRP75_HUMAN(b)	HSPA9	-4,0631
Tropomodulin-3	TMOD3_HUMAN	TMOD3	-3,54512
Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	P4HB	-3,16144
A kinase anchor protein 10	AKA10_HUMAN	AKAP10	2,41218
Nucleophosmin	NPM_HUMAN	NPM1	2,72285
Elongation factor 1-delta	EF1D_HUMAN	EEF1D	2,86235
Syntaxin-binding protein 4	STXB4_HUMAN	STXBP4	3,00148
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	HNRNPK	7,8314
Tubulin beta chain	TBB5_HUMAN	TUBB	10,11801
60 kDa heat shock protein	CH60_HUMAN	HSPD1	15,14191

* siehe Fußnote zu den GRP78-Varianten in Tab. 4.5

Die Ergebnisse des im Hinblick auf die Fragestellungen des Experiments besonders interessierenden Vergleichs zwischen der kombinierten Behandlung und der alleinigen Bestrahlung, aus denen die Gerichtetheit des Effekts einer additionalen Flurbiprofenapplikation in Bezug auf den Bestrahlungseffekt hervorgeht, werden in 4.2.2 dargestellt.

4.2.1.5 Applikation von 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio im Vergleich zur alleinigen Applikation von 200 µM Flurbiprofen

Die Ergebnisse des in der Überschrift genannten Vergleichs zeigt Tabelle 4.9. Die Angaben, die in der Tabelle gemacht werden, entsprechen denjenigen aus den Tabellen 4.5 - 4.8.

Tab. 4.9: Identifizierte Spots mit deutlich veränderter Intensität: Flurbiprofen plus Bestrahlung vs. alleinige Flurbiprofen-Applikation			
(Av 200 µM Flurbiprofen plus 8 Gy Radiatio / Av 200 µM Flurbiprofen $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$)			
Name des Proteins	Kurzform	Genname	Faktor
Tropomodulin-3	TMOD3_HUMAN	TMOD3	-27,0497
N-terminal acetyltransferase B complex catalytic subunit	NAT5_HUMAN	NAT5	-4,53516
78 kDa glucose-regulated protein (c)*	GRP78_HUMAN(c)	HSPA5	-4,3418
Stress-70 protein	GRP75_HUMAN	HSPA9	-4,18774
Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	P4HB	-3,89289
Golgin subfamily A member 1	GOGA1_HUMAN	GOLGA1	-2,8257
60 kDa heat shock protein	CH60_HUMAN	HSPD1	19,98768
Tubulin beta chain	TBB5_HUMAN	TUBB	25,1224
A kinase anchor protein 10	AKA10_HUMAN	AKAP10	75,64818
Syntaxin-binding protein 4	STXB4_HUMAN	STXBP4	794,95745
* siehe Fußnote zu den GRP78-Varianten in Tab. 4.5			

4.2.2 Zusätzliche Effekte der Flurbiprofen-Applikation im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der Fragestellung, ob durch die zusätzliche Applikation des Cyclooxygenase-Inhibitors Flurbiprofen ein positiver Effekt im Sinne der Tumorbehandlung entsteht, ob es also beispielsweise Hinweise auf Inhibition der Proliferation oder auf Mechanismen der Verminderung von Radioresistenz gibt. Daher wurde ein Vergleich der Proteine in den Zelllinien mit kombinierter Behandlung (200µM FI + 8 Gy Rad) mit denjenigen in den ausschließlich bestrahlten Zelllinien angestellt. Hervorzuheben sind zum einen solche Proteine, die durch eine kombinierte Behandlung vermehrt oder vermindert vorhanden sind, was als Hinweis auf eine Expressionssteigerung bzw. -drosselung durch die additionalen Flurbiprofenapplikation gewertet werden kann. Zum anderen interessieren in den kombinationsbehandelten Zelllinien solche Proteine, die im Vergleich zu den nur bestrahlten ein gegensinniges Verhalten zeigen – als Indiz für die Umkehr eines Bestrahlungseffekts. Diese letztgenannte Betrachtungsweise ist gerade vor dem Hintergrund kontraproduktiver Bestrahlungseffekte (Strahlenresistenz u.ä.) aufschlussreich.

Fünf quantitativ deutlich verändert exprimierte Proteine werden sowohl in der Vergleichsgruppe *Bestrahlung vs. Nullkontrolle* als auch in der Vergleichsgruppe *kombinierte Behandlung vs. Nullkontrolle* gefunden. Sie werden in Tabelle 4.10 genannt. In der Tabelle werden außerdem Hinweise auf die Richtung des Effekts einer zusätzlichen Flurbiprofenapplikation gegeben.

Tab. 4.10: Proteine, die sowohl im Vergleich *Bestrahlung vs. Nullkontrolle* als auch im Vergleich *Kombinationsbehandlung vs. Nullkontrolle* deutlich verändert exprimiert sind: Darstellung der Richtung des Effekts einer zusätzlichen Flurbiprofenapplikation

Name des Proteins	(A) Ratio Av 8 Gy Rad / Av 0- Kontrolle	(B) Ratio Av 200µM FI + 8Gy Rad / Av 0-Kontrolle	Verhältnis (A)/ (B)	Effekt der zusätzlichen Flurbiprofenbehandlung
A kinase anchor protein 10	-81,84857	-33,93142	2,4	verminderte Expressionsdrosselung
Calreticulin	-4,76898	-8,63279	0,6	unverändert bis vermehrte Expressionsdrosselung
60 kDa heat shock protein	-136,42431	-9,00972	15,1	verminderte Expressionsdrosselung
Stress-70 protein	-5,67526	-8,6292	0,7	unverändert bis vermehrte Expressionsdrosselung
78 kDa glucose-regulated protein, Polymorphismus a*	-3,3258	-2,54795	1,3	unverändert bis verminderte Expressionsdrosselung
78 kDa glucose-regulated protein, Polymorphismus b*	5,00724	-2,83148	-1,8	gegensinniges Verhalten => Umkehrung eines strahleninduzierten Effekts
78 kDa glucose-regulated protein, Polymorphismus d*	-2,03189	-2,11873	1,0	unverändert

* In den Experimenten, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, wurde GRP-78 an verschiedenen Stellen in den 2D PAGE-Gelen detektiert. Aufgrund der Lage der vier gefundenen Varianten in den Gelen ist anzunehmen, dass es sich bei den Varianten (a) und (d) um unterschiedliche Phosphorylierungsstadien des Proteins handelt, da beide nebeneinander im Gel zum Liegen kommen. Werden die angenommenen Molekulargewichte der beiden anderen Varianten (b) und (c) addiert, ist die sich ergebende Summe etwa so groß wie das Molekulargewicht der beiden anderen Varianten, sodass vermutet werden kann, dass es sich bei (b) und (c) um Fragmente handelt.

4.2.3 Systembiologische Aspekte und molekulare Funktionen der differentiell exprimierter Proteine

Um einen Überblick über die zellulären Funktionen der differentiell exprimierten Proteine aus den Abschnitten 4.2.1.1 bis 4.2.1.6 und 4.2.2 zu bekommen wurden ihre GO-Annotationen (*Gene Ontology*) ermittelt. Dies erfolgte wie in 3.2.13 erläutert mit Hilfe des bioinformatischen Systems WebGestalt (**WEB-based *GE*ne *SeT* *AnaL*ysis *Tool*kit**) und einer sich anschließenden Recherche auf der Datenbank *UniProtKB*. Die Tab 4.11 listet die Proteine, mit den für die Fragestellung relevantesten GO-Annotationen auf und Tab 4.12 zeigt ihre differentielle Regulation im Überblick.

Tab. 4.11 GO-Annotationen der differentiell exprimierten Proteine	
Protein	GO-Annotationen (Biologische Prozesse und Molekulare Funktionen)
14-3-3 protein sigma , Syn.: Epithelial cell marker protein 1 Gen: SFN	Antwort auf DNA-Schaden; Signaltransduktion, die zur Induktion der Apoptose führt
	Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien
	Inhibitor der Proteinkinase C
	negative Regulation der Caspase-Aktivität
	Regulation der Apoptose
60 kDa heat shock protein Gen: HSPD1	Aktivierung der Caspase-Aktivität
	Binden ungefalteter Proteine
	Binden von Einzelstrang-DNA
	Binden von p53
	Chaperon-Aktivität
	Chaperon-vermitteltes Zusammenfügen von Proteinkomplexen
	Proteinfaltung
	Regulation der Apoptose
	Regulation der Proteinestabilität
78 kDa glucose-related Protein , Syn.: BiP Gen: HSPA5	Aktivität als Caspase-Inhibitor
	Anti-Apoptose
	Binden fehlgefalteter Proteine
	Interaktion mit einem Chaperon

Tab. 4.11 GO-Annotationen der differentiell exprimierten Proteine	
Protein	GO-Annotationen (Biologische Prozesse und Molekulare Funktionen)
	Regulation der Proteinfaltung im endoplasmatischen Reticulum
Calreticulin, Gen: CALR	Binden ungefalteter Proteine
	Interaktion mit einem Chaperon
	negative Regulation der Signalkaskade von Retinoidrezeptoren
	negative Regulation der Translation
	positive Regulation der DNA-Replikation
	positive Regulation der Zellproliferation
	positive Regulation des Zellzyklus
	Proteinexport aus dem Nukleus
	Proteinfaltung
	Regulation der Apoptose
	Regulation der Proteinestabilität
	Zellzyklusarrest
Elongation factor 1-delta, Gen: EEF1D	positive Regulation der I- κ B Kinase/NF κ B induzierten Kaskade (296)
Nucleophosmin, Gen: NPM1	Binden ungefalteter Proteine
	DNA-Reparatur
	negative Regulation der Centrosomen-Duplikation
	negative Regulation der Zellproliferation
	nukleozytoplasmatischer Export
	positive Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B
	Regulation der Apoptose
Stress-70 protein, Syn.: Mortalin Gen: HSPA9	anti-Apoptose
	Binden ungefalteter Proteine
	Proteinexport aus dem Nukleus
	Proteinfaltung
Tubulin beta chain Gen: TUBB	G2-zu-M Transition des Zellzyklus
	Mikrotubulus-basierte Bewegung intrazellulärer Partikel oder Zellorganellen
	Regulation der Apoptose

Tab. 4.12: Überblick über die Regulation der differentiell exprimierten, systembiologisch relevanten Proteine					
Protein	Gen	Regulation in 8 Gy vs. Nullkontrolle	Regulation in 200µM FI vs. Nullkontrolle	Regulation in 200µM FI + 8 Gy vs. Nullkontrolle	Effekt einer zusätzlichen FI-Applikation
14-3-3 protein sigma	SFN	•	▼	•	•
60 kDa heat shock protein	HSPD1	▼	▼	▼	▼↓
78 kDa glucose-related Protein, P (a)*	HSPA5	▼	▼	▼	↔ bis ▼↓
78 kDa glucose-related Protein, P (b)*	HSPA5	▲	•	▼	▲↓↑
78 kDa glucose-related Protein, P (c)*	HSPA5	•	▲	•	•
78 kDa glucose-related Protein, P (d)*	HSPA5	▼	•	▼	↔
Calreticulin	CALR	▼	▼	▼	↔ bis ▼↑
Elongation factor 1-delta	EEF1D	▼	•	•	•
Nucleophosmin	NPM1	▼	•	•	•
Stress-70 protein	HSPA9	▼	▼	•	↔ bis ▼↑
Stress-70 protein, P (b)	HSPA9	•	▼	▼	•

Legende: ▲: Hochreguliert, ▼: Herabreguliert, •: in diesem Vergleich nicht reguliert, ↑: Verstärkung eines Bestrahlungseffekts, ↓: Verminderung eines Bestrahlungseffekts, ↔: unveränderter Bestrahlungseffekt: Beispiele: ▼↓ bedeutet die Herabregulierung ist vermindert, ▼↓↑ bedeutet, die Herabregulierung durch Bestrahlung wird durch die zusätzliche Flurbiprofenapplikation umgekehrt; Abkürzungen: P = Polymorphismus

* In den Experimenten, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, wurde GRP-78 an verschiedenen Stellen in den 2D PAGE-Gelen detektiert. Aufgrund der Lage der vier gefundenen Varianten in den Gelen ist anzunehmen, dass es sich bei den Varianten (a) und (d) um unterschiedliche Phosphorylierungsstadien des Proteins handelt, da beide nebeneinander im Gel zum Liegen kommen. Werden die angenommenen Molekulargewichte der beiden anderen Varianten (b) und (c) addiert, ist die sich ergebende Summe etwa so groß wie das Molekulargewicht der beiden anderen Varianten, sodass vermutet werden kann, dass es sich bei (b) und (c) um Fragmente handelt.

4.2.3.1 Interaktionen und Interaktionspartner der systembiologisch relevanten Proteine

Die folgenden Abbildungen zeigen die Interaktionen der systembiologisch relevanten, in ihrer Expression veränderten Proteine. In der Abb. 4.3 werden die Assoziationen untereinander gezeigt und in Abb. 4.4 sind die Assoziationen mit den wahrscheinlichsten funktionellen Interaktionspartnern (s. Tab. 4.13) dargestellt. Die Analysen wurden mithilfe von STRING in der Version 9.0 erstellt.

Abb. 4.3 STRING-Analyse der systembiologisch relevanten, in ihrer Expression veränderten Proteine. Stärkere Assoziationen sind durch dickere Linien repräsentiert. CALR = Calreticulin; HSPA5 = 78 kDa glucose-related Protein; TUBB = Tubulin beta chain; SFN = 14-3-3 protein sigma; HSPA9 = Stress-70 protein; HSPD1 = 60 kDa heat shock protein; EEF1D = Elongation factor 1-delta; NPM1 = Nucleophosmin.

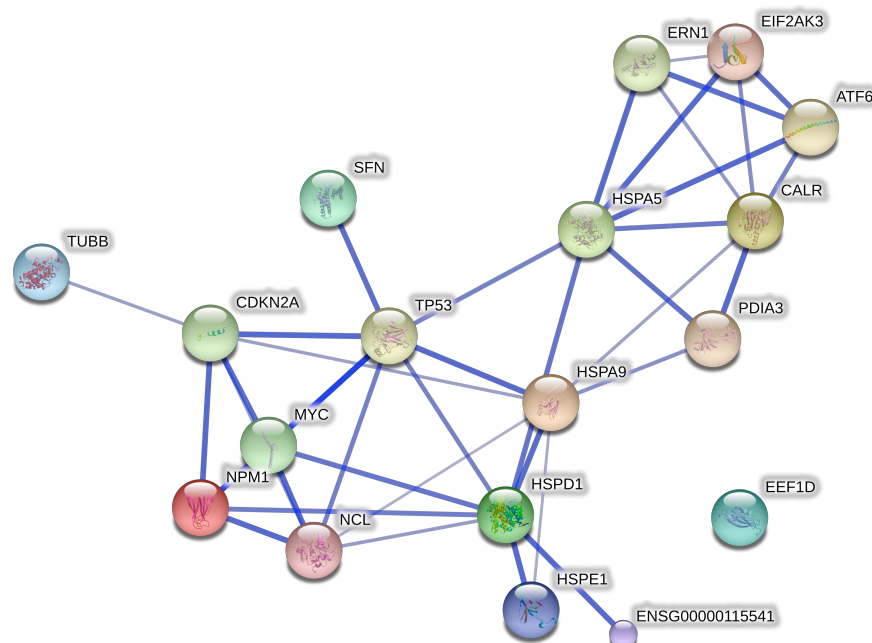
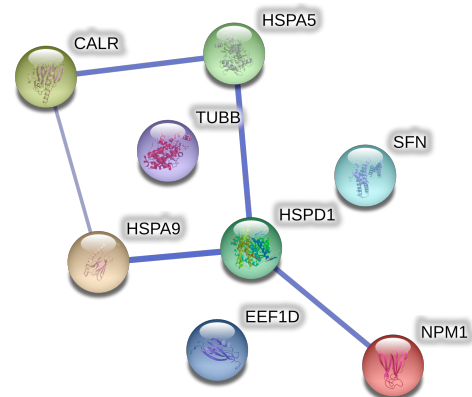


Abb. 4.4 STRING-Analyse der systembiologisch relevanten, in ihrer Expression veränderten Proteine mit ihren wahrscheinlichsten funktionellen Interaktionspartnern. Stärkere Assoziationen sind durch dickere Linien repräsentiert. CALR = Calreticulin; HSPA5 = 78 kDa glucose-related Protein; TUBB = Tubulin beta chain; SFN = 14-3-3 protein sigma; HSPA9 = Stress-70 protein; HSPD1 = 60 kDa heat shock protein; EEF1D = Elongation factor 1-delta; NPM1 = Nucleophosmin. Auflösung der Abk. der Interaktionspartner in Tab. 4.13.

Tab. 4.13: Durch STRING-Analyse vorhergesagte funktionelle Interaktionspartner der aus systembiologischer Sicht relevanten, in ihrer Expression veränderten Proteine

Gen	Protein	Funktion
HSPE1	10 kDa heat shock protein	<ul style="list-style-type: none"> essentiell für die Biogenese mitochondrialer Proteine Molekulare Funktionen: Bindung von ATP, Bindung ungefalteter Proteine, Chaperon
ENSG00000115541	-	HSPE1-Fragment
NCL	Nucleolin	<ul style="list-style-type: none"> bedeutendes nukleoläres Protein wachsender eukaryotischer Zellen induziert die Chromatin-Kondensation durch Assoziation mit dem Histon H1 spielt vermutlich eine Rolle beim Aufbau der Ribosomen und der Elongation während der Transkription
EIF2AK3	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 (Syn.: PERK)	<ul style="list-style-type: none"> Phosphoryliert den eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 2 (EIF2) <ul style="list-style-type: none"> - führt somit zu dessen Inaktivierung und zur globalen Repression der Proteinbiosynthese Effektor des UPR (<i>unfolded protein response</i>)-induzierten Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch Cyclin D1-Verlust
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	<ul style="list-style-type: none"> Katalysiert Re-Arrangements von Disulfid-Brücken in Proteinen Biologischer Prozess: zelluläre Redox-Homöostase
ATF6	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha	<ul style="list-style-type: none"> Transkriptionsfaktor, der bei ER-Stress UPR-Zielgene aktiviert Bindet an die DNA an sog. ERSEs (<i>ER-Stress Response Elements</i>)
TP53	Cellular tumor antigen p53	<ul style="list-style-type: none"> agiert als Tumorsuppressor in vielen Tumoren: induziert abhängig vom Zustand der Zelle den Zellzyklusarrest oder den programmierten Zelltod
ERN1	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	<ul style="list-style-type: none"> Endoribonuklease, die auf ungefaltete Proteine im Lumen des endoplasmatischen Reticulum mit Autoaktivierung reagiert aktiviertes Enzym wird für das Splicing der XBP1-mRNA benötigt <ul style="list-style-type: none"> - Splicing führt zu einem neuen C-Terminus dieses Proteins und macht es zu einem potenten Aktivator der Transkription als Bestandteil der UPR - mögliche Folgen: Wachstumsarrest und Apoptose

Tab. 4.13: Durch STRING-Analyse vorhergesagte funktionelle Interaktionspartner der aus systembiologischer Sicht relevanten, in ihrer Expression veränderten Proteine

Gen	Protein	Funktion
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4	<ul style="list-style-type: none"> • Tumorsuppressor • kann Zellzyklusarrest in der G1- und G2-Phase induzieren • Bindet den p53-Inhibitor MDM2 und führt zu dessen Sequestration im Nukleolus <ul style="list-style-type: none"> - Folge: Verstärkung der tumorsuppressiven p53-Funktionen • induziert G2-Zellzyklusarrest und Apoptose p53-unabhängig, indem es die Aktivierung von Cyclin B1 / CDC2 Komplexen verhindert
MYC	Myc proto-oncogene protein	<ul style="list-style-type: none"> • beteiligt an der Regulation der Transkription • bindet unspezifisch an die DNA, erkennt aber auch bestimmte Nukleotid-Sequenzen • aktiviert die Transkription von Genen, deren Proteinprodukte in Wachstumsprozesse involviert sind

4.2.4 Ergebnisse der nanoUPLC-MS Versuche

Die zusätzliche Analyse der Proben aus einer Experimentalgruppe mit der nanoUPLC-MS Methode wurde primär vorgenommen, um die Anreicherung von Phosphoproteinen über die IMAC zu validieren. Sekundär wurden auch die dabei gewonnenen Ergebnisse der Proteinquantifizierung betrachtet, um diese mit den Ergebnissen der 2D PAGE Methode zu vergleichen.

Es wurden jeweils Proben aller Versuchsgruppen einer Experimentalgruppe vor und nach IMAC untersucht, d.h. flüssigkeitschromatographisch getrennt, massenspektrometrisch analysiert und durch ein label-freies Verfahren quantifiziert. Zur Feststellung von signifikanten Proteinmengenunterschieden zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wurde der Logarithmus zur Basis zwei von entsprechenden Proteinmengenverhältnissen gebildet (s. Gleichung 4.1). Ist das Ergebnis des Quotienten V in Gleichung 4.1 größer als 1 oder kleiner als -1, ist von einem deutlichen Unterschied der Proteinmenge auszugehen, was als Hinweis auf eine signifikant stärkere oder schwächere Expression des betrachteten Proteins gewertet werden kann. Die Logarithmierung wurde gewählt, um die Darstellung zu

vereinfachen: Ein zweifacher Unterschied (doppelt so starke resp. nur halb so große Expression) ist demnach dargestellt als 1 resp. -1 und nicht als 2 resp. 0,5. Ein vierfacher Unterschied der Proteinmenge ist dann 2 resp. -2 und nicht 4 resp. 0,25 usf.

$$V_{\text{sign.}} = \log_2 \frac{\text{Menge (Protein X) in Probe A}}{\text{Menge (Protein X) in Probe B}} > 1 \text{ oder } \log_2 \frac{\text{Menge (Protein X) in Probe A}}{\text{Menge (Protein X) in Probe B}} < -1$$

Gleichung 4.1: Überprüfung von Proteinmengenverhältnissen in verschiedenen Proben auf deutliche Unterschiede. Eine signifikant unterschiedliche Proteinmenge ($V_{\text{sign.}}$) liegt dann vor, wenn der Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses der Menge eines Proteins X in einer Probe A zu der Menge des gleichen Proteins in einer Probe B größer als 1 oder kleiner als -1 ist. Die Angabe von Proteinmengen erfolgt in *parts-per-million* (ppm) des insgesamt in der Probe enthaltenen Proteins.

Die Messungen mit der nanoUPLC-MS Methode wurden als Einzelmessungen an acht Proben einer Experimentalgruppe durchgeführt – je vier Proben (eine pro Versuchsgruppe) vor bzw. nach IMAC. Da weder biologische noch technische Replikate untersucht wurden, wurden die Ergebnisse aufgrund der fehlenden statistischen Aussagekraft nicht weiter aufgearbeitet.

Die bei den Untersuchungen mit der nanoUPLC-MS-Methode identifizierten Veränderungen der Phosphoproteinexpression als Effekte von Bestrahlung und Flurbiprofenapplikation sind in den Abschnitten 8.1. bis 8.3 im Anhang aufgelistet.

Daten aus der Literatur zufolge wäre zu erwarten gewesen, dass eine übereinstimmende Schnittmenge der Ergebnisse aus den 2D PAGE-MS und den nanoUPLC-MS Versuchen, identifiziert werden kann (237). Mit der Ausnahme des Stress-70 Proteins, das bei beiden Verfahren gefunden wurde, fanden sich jedoch keine übereinstimmenden Identifizierungen.

5. Diskussion

5.1 Einordnung der differentiell exprimierten Proteine in den zellulären Kontext und Bedeutung der Ergebnisse für die Fragestellungen des Experiments

5.1.1 14-3-3 Protein Sigma (Gen: SFN)

Bei dem Protein 14-3-3 sigma handelt es sich um ein Adapter-Protein, das bei der Regulation genereller und spezialisierter Signalkaskaden eine Rolle spielt. Es weist eine große Zahl an Bindungspartnern auf, die es üblicherweise anhand eines Phosphoserin- oder Phosphothreonin-Motivs erkennt. Meist resultiert eine Modulation der Aktivität des Bindungspartners. Beispielsweise kann durch die Bindung an KRT17 die Proteinsynthese und durch die Stimulation der AKT/mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*)-Signalkaskade das epitheliale Zellwachstum reguliert werden. Das Protein ist zudem ein durch p53 regulierter Inhibitor der G2-zu-M Progression während des Zellzyklus (238).

Samuel et al. zeigten, dass das Fehlen von 14-3-3 sigma in Zellen kolorektaler Karzinome zu einer hohen Sensibilität gegenüber DNA-Schäden führt. Sie exponierten Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Adriamycin und fanden, dass die Schädigung der DNA in Zellen, die kein 14-3-3 sigma exprimierten, zu einer rascheren Induktion der Apoptose führt, als dies in 14-3-3 sigma positiven Zelllinien der Fall war. Konkordant mit diesen Ergebnissen wiesen die Autoren eine Caspase-3 Aktivierung, eine Verringerung der Bax-Konzentration im Zytoplasma und eine Freisetzung von Cytochrom c als Indikatoren der Apoptose-Aktivierung nach. Des Weiteren stellten sie in den 14-3-3 sigma negativen Zellen einen fehlenden Zellzyklusarrest durch Adriamycin bei der Progression von der G2- zur M-Phase fest (239). Das Ergebnis legt nahe, dass die 14-3-3 sigma negativen Zellen in die Mitosephase eintreten, in der sie gegenüber DNA-Schäden besonders empfindlich sind und durch den mitotischen Zelltod zugrunde gehen (107), (113). Ebendieses konnte in anderen Studien bestätigt werden: In der Abwesenheit von 14-3-3 sigma führte die Bestrahlung von Zellen zu einer mitotischen Katastrophe und zum Zelltod, da die 14-3-3 sigma negativen Zellen nicht mehr in der Lage waren, den Zellzyklus in

der G2-Phase anzuhalten, um den DNA-Schaden zu reparieren (240), (241). Belege für die Hypothese, dass 14-3-3 sigma an der Entwicklung von Radioresistenz beteiligt ist, liefern auch die Ergebnisse von Li et al. und Chan et al. Erstere konnten zeigen, dass Pankreaskarzinomzellen, die 14-3-3 sigma überexprimierten, resistent gegenüber einer Behandlung mit ionisierenden Strahlen waren (242). Letztere fanden heraus, dass bei Patienten mit Karzinomen des Nasopharynx, die mit einer Radiotherapie behandelt wurden, eine niedrige 14-3-3 sigma Expression mit einer besseren Prognose korrelierte (243). Die Expression von 14-3-3 sigma wird reguliert durch das Tumorsuppressorprotein p53, das infolge eines DNA-Schadens, z.B. durch ionisierende Strahlen, zu einer Steigerung des Gens SFN führt, das 14-3-3 sigma encodiert (244). Viele Tumorentitäten weisen indes eine Stummschaltung (*silencing*) von SFN durch Hypermethylierung des Promotors auf und es wird vermutet, dass die konsekutive generelle Verminderung von 14-3-3 sigma zur genomischen Instabilität der Tumoren beitragen kann (245). Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass eine epigenetisch entstandene SFN-Quieszenz die genomische Instabilität von Tumoren erhöhen kann, dass aber eine verminderte 14-3-3 sigma Konzentration bei Auftreten eines DNA-Schadens die Wahrscheinlichkeit der Apoptoseinduktion erhöht.

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten war die 14-3-3 sigma Expression durch die Applikation von Flurbiprofen herabreguliert, was als Hinweis gewertet werden kann, dass der Cyclooxygenase-Inhibitor durch die Herabregulierung dieses Proteins eine verstärkte Radiosensibilität hervorrufen könnte. Der Effekt der Herabregulierung von 14-3-3 sigma durch Flurbiprofen ließ sich jedoch in den anderen angestellten Vergleichen (kombinierte Behandlung vs. Nullkontrolle und als Effekt einer zusätzlichen Flurbiprofenapplikation) nicht reproduzieren.

5.1.2 60 kDa Heat Shock Protein (Gen: HSPD1)

Bestrahlung sowie Flurbiprofenapplikation führen beide zu einer verminderten Konzentration des 60 kDa Heat Shock Proteins (Hsp60). Die zusätzliche Applikation von Flurbiprofen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung bewirkt in den Tumorzelllinien eine verminderte Reduktion der Expression des Proteins.

Hsp60 gehört zur Familie der Chaperone und ist essentiell für die korrekte Faltung von neu in Mitochondrien importierte Proteine. Pro- und anti-apoptotische Funktionen sind beschrieben und es gibt außerdem Hinweise auf neuroprotektive und kardioprotektive Wirkungsweisen (246), (247). Hsp60 wurde mit der Protektion kardialer Myozyten während Hypoxie in Verbindung gebracht, sodass auch eine Protektion von Tumorzellen gegenüber Hypoxie denkbar ist. Mechanistisch wird hierbei eine Komplexierung des Bax-Proteins propagiert, wodurch dessen Translokation zur äußeren Mitochondrienmembran und damit die Apoptose-induzierende Funktion verhindert wird (247).

Zusammengenommen überwiegen Studienergebnisse, die eine tumorprogressive Wirkung von Hsp60 nahelegen. Hwang et al. fanden eine Überexpression von Hsp60 in Zervixkarzinomzellen; eine korrespondierende Erhöhung der messenger RNA für Hsp60 konnte dabei jedoch nicht nachgewiesen werden (248), was eine Regulation der Expression auf einer anderen Ebene als der transkriptionellen vermuten lässt. Die Daten von Cappello et al. – eine Arbeitsgruppe, die mit Zellen von Kolonkarzinomen und korrespondierenden Lymphknoten aus Operationsmaterial arbeitete – legen nahe, dass die Überexpression von Hsp60 die Tumorprogression begünstigt: Sie fanden eine Korrelationen der Hsp60-Expression mit dem histologischen Tumorgrad und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (249). Der Zusammenhang einer erhöhten Expression von Hsp60 mit der Metastasierung maligner Zellen wird auch von anderen Autoren beschrieben. Beispielsweise rief eine überhöhte Expression von Hsp60 in den Experimenten von Tsai et al. mit einer HNSCC-Zelllinie *in vitro* und *in vivo* metastatische Phänotypen hervor. Das Phänomen wird von den Autoren auf die nachgewiesene Interaktion mit beta-Catenin zurückgeführt, dessen Spiegel und transkriptionale Aktivität in den Hsp60-überexprimierenden Zellen erhöht war (250). Beta-catenin ist ein multifunktionales Protein, das einerseits als Signalmolekül in der Wnt-Signalkaskade fungiert und andererseits an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist (251). Verschiedene Autoren fanden, dass die Aktivierung von beta-Catenin in Tumorzellen deren Metastasierung begünstigt. Dies wurde beispielsweise nachgewiesen für kolorektale Karzinome (252), (253), Prostatakarzinome (254) und Ovarialkarzinome (255). Die von Tsai et al. untersuchten Patienten mit metastasiertem HNSCC hatten bei Vorliegen einer Hsp60-Überexpression und auch bei einer Hsp60- und beta-Catenin-Koexpression eine schlechtere Prognose. Bei Blasen- und Ovarialkarzinomen ging

die Überexpression mit einer relativen Resistenz gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika einher (256), (257).

Für die tumorbegünstigenden Wirkungen werden außerdem noch weitere Mechanismen diskutiert; so demonstrierten Chun et al., dass cytosolisches Hsp60 das IKK/NF κ B-abhängige Zellüberleben durch eine direkte Interaktion mit IKKalpha/beta aktiviert (258). Auch gibt es Hinweise für eine Interaktion von Hsp60 und dem Transkriptionsfaktor c-myc: Danach aktiviert c-myc die Transkription von Hsp60, dessen Überexpression konsekutiv zur malignen Transformation führt. Die Inhibition von Hsp60 durch siRNA ist in der Lage diese Transformation zu reduzieren (259).

Neben den genannten anti-apoptischen und tumorprogressiven Wirkungen werden Hsp60 auch Funktionen zugeschrieben, die den programmierten Zelltod begünstigen sollen; so ist extrazelluläres Hsp60 in der Lage Apoptose in kardialen Myozyten (260) und in Stromazellen des humanen Knochenmarks zu induzieren. Letzteres könnte insbesondere für die Genese der postmenopausalen Osteoporose von Bedeutung sein, bei der häufig erhöhte Hsp60-Plasmaspiegel festgestellt werden können (261). Eine Interaktion des extrazellulären Hsp60 mit dem Toll-like Rezeptor 4 wird sowohl im Falle der Herzinsuffizienz als auch bei der Osteoporose vermutet. Andere Autoren konnten zeigen, dass Hsp60 die proteolytische Aktivierung von Procaspase-3 zur aktiven Caspase-3 beschleunigt (262). Untersuchungen klinischer Parameter in Verbindung mit der Hsp60-Expression in Tumorzellen ergaben, dass die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus bei Hsp60-Positivität signifikant besser ist (263) und dass der Verlust der Hsp60-Expression bei Patienten mit Urothelkarzinom der Blase mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines infiltrierenden Rezidivs nach initialer Resektion korreliert. Eine niedrige Hsp60-Expression könnte dann als Marker dienen, um im Vorhinein Patienten zu identifizieren, für die die alleinige lokale Behandlung unzureichend wäre (264).

Ob Hsp60 beim Vorgang des programmierten Zelltodes eine pro- oder anti-apoptische Rolle spielt, scheint dabei von verschiedenen Parametern, wie beispielsweise dem Gewebe, dem Zelltyp und dem Apoptose-induzierenden Agens abzuhängen (265). Für das HNSCC existieren Hinweise auf eine vor allem anti-apoptische und tumorbegünstigende Hsp60-Wirkung (250). Lin et al. identifizierten Hsp60 sowie GRP-78 (siehe Kap. 5.1.3) als Proteine, die in radioresistenten

HNSCC-Zelllinien verglichen mit radiosensiblen Parentalzellen hochreguliert sind und vermuten, dass beide Proteine eine Rolle bei der Entwicklung von Radioresistenz spielen (266). Außerdem ist Hsp60 ein COX-2 regulierendes Protein (267): Bei ihren Studien an Endothelzellen und Makrophagen fanden Billack et al., dass Hsp60 die Expression der COX-2 sowie der Stickstoffoxid Synthetase 2 (*nitric oxide synthetase 2*, NOS-2) induziert. In einem von den Autoren vorgeschlagenen Modell dieser Induktion bindet extrazelluläres Hsp60 an Rezeptoren von Nachbarzellen und löst eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, sowie von p38, ERK1/2 und JNK MAP-Kinasen aus. Es resultiert eine weitere Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von COX-2 und NOS-2 erhöhen (267). Interessanterweise sezernieren Tumorzellen vermutlich generell Hsp60 in ihr Milieu (268), sodass auch bei diesen eine COX-2 Induktion durch das Protein zu erwarten wäre.

Als Ergebnis der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente ergibt sich eine Senkung der Hsp60-Spiegel durch die Bestrahlung, durch die Applikation von Flurbiprofen und als Effekt einer kombinierten Behandlung der Zellen. Insbesondere die Auswirkungen des Cyclooxygenase-Inhibitors sind hier interessant, da er nicht nur die enzymatische Aktivität der Cyclooxygenasen (vor allem der COX-1) einschränkt, sondern auch via Verminderung des Hsp60 die Expression der COX-2 vermindern könnte. Zusammengenommen deutet dies auf einen Mechanismus der tumorsuppressiven Funktionen des COX-Inhibitors Flurbiprofen sowie der Synergie zwischen der COX-Inhibition mit den eigentlichen Tumorthérapien hin.

5.1.3 78 Da Glucose-related Protein (Gen: HSPA5)

Das Glucose-related Protein 78 (GRP-78) gehört zur Familie der Hitzeschock 70 Proteine. Es ist primär im Lumen des endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisiert und beteiligt an der Faltung von Proteinen im ER. Es interagiert mit sehr vielen Proteinen des ER und ist an der Kontrolle des zellulären Proteintransports beteiligt. Auch weitere subzelluläre Lokalisationen, zum Beispiel im Zytoplasma und in der Zellmembran werden propagiert. Die multiplen Lokalisationen des Proteins legen eine Vielfalt der Funktionen des Proteins nahe, die von Zhang und Lee im Rahmen einer Übersichtsarbeit folgendermaßen zusammengefasst wurden (269):

GRP-78 im ER: Chaperonaktivität, Proteindegradation, Bindung von Ca²⁺-Ionen, Regulierung der durch ER-Stress induzierbaren Signalkaskaden

GRP-78 an der Zelloberfläche: Rezeptor für Wachstums- und Überlebenssignale, Einbindung in Prozesse der Neoangiogenese, Rezeptor für apoptotische Signale, Rezeptor für die Virusinternalisierung

GRP-78 im Nukleus: Cross-link zur DNA, Suppression der Apoptose-Induktion durch Schäden an der DNA

GRP-78 in Mitochondrien: Regulation der mitochondrialen Energiebalance während ER-Stress

GRP-78 im Zytoplasma: Regulierung der durch ER-Stress induzierten Signalkaskaden, Suppression der ER-Stress induzierten Apoptose, Suppression der Blei-induzierten Neurotoxizität, Vereinfachung der Bildung neuer Viruspartikel

sezerniertes GRP-78: Bindung an endotheliale Zelloberflächen-Rezeptoren, Aktivierung der ERK- und AKT-Signalkaskade

Zumindest bei dem zytoplasmatischen GRP-78 handelt es sich um eine Isoform mit alternativer Aminosäuresequenz verglichen mit der kanonischen Form des Proteins. Diese alternative Form des Proteins – GRP-78va – entsteht durch alternatives Splicen. Ihm fehlt die Signalsequenz, durch die es als Protein des ER erkannt wird, weshalb es im Zytosol lokalisiert ist (270).

GRP-78 liegt in vielen Tumorentitäten überexprimiert vor. Lee et al. (271) vermuten, dass diese Überexpression zunächst aus einer Anpassung der Tumorzellen an ihre beschränkten Wachstumsbedingungen resultiert: Krebszellen haben aufgrund ihrer erhöhten metabolischen Aktivität einen Mehrbedarf an Glucose, aber da die Tumoren oft schneller wachsen als ihre Blutversorgung, ist die Tumorumgebung durch Glukosemangel, Azidose und Hypoxie gekennzeichnet. Diese Faktoren führen zu Akkumulation von nicht-glykosylierten und fehlgefalteten Proteinen innerhalb des ER und lösen die sog. Reaktion auf ungefaltete Protein (UPR, *Unfolded Protein Response*) aus, die also eine Reaktion des ERs auf „Stress“ ist (271). GRP-78 ist das Schlüsselmolekül bei der Induktion der UPR. In nicht-gestressten Zellen bindet und inaktiviert es die UPR-Effektoren PERK, IRE1 und ATF6. Reichern sich un- oder fehlgefaltete Protein im ER an, löst sich GRP-78 von

den Effektoren, um in Chaperonmanier die korrekte Faltung der Proteine wiederherzustellen. Die auf diese Weise freigewordenen Effektoren führen zu einer Reduktion der Proteinbiosynthese, zur Hochregulierung von Chaperonen wie z.B. von GRP-78 sowie zur verstärkten Degradation von fehlgefalteten Proteinen (272), (273). Abhängig vom Ausmaß des ER-Stresses, kann die UPR auch den apoptotischen Zelltod und die Autophagie der Zelle induzieren. Die Erhöhung der GRP-78 Spiegel im ER von Tumorzellen trägt also dazu bei, dass die Faltungskapazität erhöht ist und dass es daher nicht zum UPR-induzierten Zelltod durch die widrigen Umweltbedingungen der Tumorzellen kommt (272). Die Verstärkung onkogener Signalkaskaden durch GRP-78 an der Zelloberfläche und die Verstärkung des PERK-Signals durch cytosolisches GRP-78 tragen zusätzlich zu den proto-onkogenen Auswirkungen der Überexpression bei (269). Tumorentitäten, in denen eine Überexpression von GRP-78 festgestellt wurde, sind beispielsweise Tumoren des Urogenitaltrakts, des Verdauungstrakts, Mammatumoren, maligne Gliome und Tumoren des respiratorischen Systems (274). Chiu et al. fanden bei ihren Untersuchungen an Kopf- und Halskrebszelllinien eine hohe GRP-78 Expression in allen sechs von ihnen untersuchten Zelllinien und eine mögliche Assoziation der Überexpression auf die Kennzeichen des malignen Zellwachstums (275). Die Inhibition der Proteinexpression von GRP-78 durch siRNA reduzierte das Zellwachstum, die Koloniebildung, die Zellmigration sowie die invasive Potenz aller untersuchten Zelllinien. Wurde ein siRNA Plasmid in ein Tumorexograft eingebracht, kam es zu einem reduzierten Tumorwachstum *in vivo* und zu einer deutlichen Reduktion der Metastasierung (275). Die Überexpression von GRP-78 wurde häufig mit der Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht (276), (277). Es wurde jedoch auch beschrieben, dass die ionisierende Bestrahlung von Zellen die UPR aktiviert (278) und wie die Experimente von Lee et al. zeigen, ist auch eine Verstärkung der Radioresistenz durch GRP-78 anzunehmen. Die Arbeitsgruppe inhibierte die GRP-78 Expression mit siRNA und stellte eine verstärkte Radiosensibilität fest. Der umgekehrte Beweis, dass die Überexpression im Vergleich zur normalen Expression Radioresistenz vermittelt, wurde jedoch nicht erbracht (271). Es existieren bisher fast keine Daten, die den Einfluss von Cyclooxygenasen, ihren Inhibitoren oder von Prostaglandinen auf die Expression von GRP-78 bzw. auf die Aktivität der UPR beschreiben. In einem aktuellen Report wurde geschildert, dass Prostaglandin E2 (PGE2) die Adaptation von Tumorzellen an

reduzierte Glukosezufuhr verbessert und dass die Aktivierung der UPR über eine Signalkaskade zu einer Reduktion der 15-Prostaglandin-Dehydrogenase (15-PGDH) führt (279). Die 15-PGDH ist das wesentliche PGE₂-abbauende Enzym und seine Reduktion führt zur Erhöhung der PGE₂-Spiegel.

In den Experimenten, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, wurde GRP-78 an verschiedenen Stellen in den 2D PAGE-Gelen detektiert. Aufgrund der Lage der vier gefundenen Varianten in den Gelen ist anzunehmen, dass es sich bei den Varianten (a) und (d) um unterschiedliche Phosphorylierungsstadien des Proteins handelt, da beide nebeneinander im Gel zum Liegen kommen. Werden die angenommenen Molekulargewichte der beiden anderen Varianten (b) und (c) addiert, ist die sich ergebende Summe etwa so groß wie das Molekulargewicht der beiden anderen Varianten, sodass vermutet werden kann, dass es sich bei (b) und (c) um Fragmente handelt. In Ermangelung einer weiteren Charakterisierung der vier gefundenen GRP-78 Formen wurden sie mit dem Zusatz (a), (b), (c) oder (d) versehen. Die gefundenen Isoformen weisen zudem noch eine differentielle Expression auf: Bei dem Vergleich Bestrahlung vs. Nullkontrolle stellte sich heraus, dass die beiden Varianten (a) und (d) nach der Bestrahlung vermindert vorhanden waren und dass die Variante (b) erhöhte Spiegel aufwies. Die Herabregulierung war bei Variante (a) und (d) durch eine zusätzliche Flurbiprofenapplikation tendenziell verstärkt, wohingegen sich die Hochregulierung der Variante (b) durch die zusätzliche Flurbiprofenapplikation ins Gegenteil verkehrte. Letzteres wäre mit einer Induktion der UPR und einer konsekutiven Erhöhung von GRP-78 durch Bestrahlung vereinbar, die durch den Einfluss des Cyclooxygenase-Inhibitors gehemmt würde. Aufgrund der vier gefundenen Isoformen mit differentiellem Expression, die aber nicht weiter charakterisiert wurden, stellt sich die Einordnung des Ergebnisses jedoch als schwierig dar. Eine Verifizierung der Hypothese von unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien und der Nachweis von Spaltprodukten oder alternativen Splicevarianten wäre von Nöten; außerdem fehlen weitere Daten zum Einfluss von ionisierenden Strahlen und der Cyclooxygenasen auf UPR-assoziierte Mechanismen.

5.1.4 Calreticulin (Gen: CALR)

Calreticulin (CRT) ist kein Phosphoprotein. Proteine mit einem isoelektrischen Punkt (IEP) im sauren Bereich, werden bei der IMAC häufig artifiziell angerei-

chert. Calreticulin weist einen theoretischen IEP von 4,29 auf (280), sodass anzunehmen ist, dass es deshalb in den aufgereinigten Proben vorhanden war. Da es zu den Proteinen mit deutlicher Veränderung der Konzentration nach Bestrahlung und Flurbiprofenapplikation gehört und interessante GO-Annotationen aufweist, soll es an dieser Stelle trotzdem besprochen werden. Calreticulin ist ein multifunktionales Protein, das primär im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert ist. Dort agiert es als wesentliches Ca^{2+} -Ionen bindendes und speicherndes Protein sowie als Chaperon bei der Faltung und Qualitätskontrolle neu synthetisierter Proteine. Das Protein wird daneben auch im Nukleus gefunden und es wird vermutet, dass es dort eine Rolle bei der Regulation der Transkription durch nukleäre Hormonrezeptoren – z.B. Glukocorticid-, Androgen- und Retinsäurerezeptoren – spielt. Außer im ER kommt Calreticulin auch im Zytoplasma, auf der Zelloberfläche und in sezernierter Form vor (281), (282).

Gold et al. stellen in einer Übersichtsarbeit die Prozesse, an denen Calreticulin beteiligt ist, dar: Das Protein wird für die Prozessierung und Präsentation von Antigenen im Rahmen der adaptiven Immunantwort sowie für die Phagozytose von Krebszellen, die CRT an ihrer Oberfläche präsentieren, benötigt. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Phagozytose apoptotischer Zellen, bei der Zelladhäsion, -migration und -proliferation sowie bei der Entwicklung von Resistenz gegenüber Anoikis – dem Zelltod, der durch Verlust der Adhärenz an andere Zellen ausgelöst wird (283).

Alur et al. berichten von tumorsuppressiven Auswirkungen einer Überexpression von CRT in Prostatakarzinomzellen. Die Autoren fanden, dass die Überexpression in Zellkulturen zur Reduktion der Koloniebildung führt und dass die Überexpression in Tiermodellen des Prostatakarzinoms mit einem geringeren Tumorwachstum und einer verminderten Rate an Tumormetastasierungen assoziiert war (284). Demgegenüber steht eine vergleichsweise größere Datenmenge, die proto-onkogene Funktionen von Calreticulin nahelegt. Beispielsweise fanden Du et al., dass eine hohe Expression von Calreticulin mit einer schlechten Prognose bei ösophagealen Plattenepithelkarzinomen assoziiert ist (285) und in Folgeversuchen konnten sie zeigen, dass CRT über einen Signalweg, der PI3K und AKT involviert, die Zellmotilität verstärkt und zudem die Resistenz gegenüber Anoikis erhöht (286). Auch bei Magen- und Mammakarzinomen ist eine hohe CRT-Expression als proto-onkogen und pro-angiogen anzusehen. Bei Ersteren konnte eine signifikante

Korrelation mit hoher Mikrovaskularisationsdichte, Lymphknotenmetastasen, Serosa- und perineuraler Infiltration sowie kürzerer Überlebenszeit der Patienten gezeigt werden (287). Bei Letzteren fand sich eine Korrelation mit der Tumorgröße und dem Auftreten von Fernmetastasen (288).

Die Überexpression von Calreticulin kann die Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies während anhaltender Hypoxie verhindern, indem es die Expression des Antioxidanz Thioreduxin erhöht (289). Eine solche Reaktion von Zellen könnte auch durch die bei einer ionisierenden Bestrahlung entstehenden freien Radikale möglich sein. Dies ist jedoch bisher nicht beschrieben. Hinsichtlich der Modulation einer Bestrahlungsantwort durch CRT ist bekannt, dass mit dem CRT-Gen transfizierte Glioblastomzellen wesentlich sensibler auf Bestrahlung reagieren, als nicht transfizierte Kontrollzellen mit niedriger CRT-Expression. Die höhere bestrahlungsinduzierte Apoptose bei den transfizierten, CRT überexprimierenden Zellen kam vermutlich durch eine Inaktivierung von AKT zustande (290), was insofern inkonklusiv mit den Ergebnissen von Du et al. ist, die eine Verstärkung von AKT durch Calreticulin festgestellt hatten (286). Eine Radiosensitivierung durch Calreticulin stimmt auch nicht mit den Schlüssen, die Ramsamooj et al. aus ihren Experimenten gezogen hatten, überein: Sie untersuchten Zellen einer radioresistenten HNSCC-Linie und fanden eine Hochregulierung des Proteins durch Bestrahlung, in der sie einen Verursacher der Radioresistenz der Zellen vermuteten (291). Eine Hochregulierung durch Bestrahlung fanden auch Chen et al., die Proteom-veränderungen nach Bestrahlung in Makrophagen untersucht hatten (292).

Die Expression von Calreticulin an der Zelloberfläche scheint bei der immunvermittelten Zerstörung von Krebszellen essentiell zu sein. Anthracycline (283) sowie ionisierende Bestrahlung (293) induzieren eine Translokation von Calreticulin an die Zelloberfläche präapoptotischer Zellen, damit diese von dendritischen Zellen und Tumorantigen-spezifischen T-Lymphozyten beseitigt werden können. Die Auswirkungen der Immunantwort wurden in einem Tiermodell gezeigt: Immunkompetenten Mäusen wurden zunächst Tumorzellen implantiert, die eine bestrahlungsinduzierte CRT-Expression an ihrer Oberfläche aufwiesen. Eine Woche später wurden ihnen lebende nichtbestrahlte Tumorzellen der gleichen Art implantiert und es stellte sich heraus, dass die Tiere durch die zuvorige Injektion der CRT-präsentierenden Zellen, wie durch eine Impfung, „immun“ gegen das Tumorwachstum geworden waren (293).

Daten über die Auswirkung von Cyclooxygenasen und ihren Inhibitoren auf Calreticulin sind begrenzt. Ein Bericht beschreibt eine Herabregulierung von Calreticulin durch das NSAID Indomethacin (290).

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten sanken die Calreticulin-Spiegel infolge der Applikation von Flurbiprofen. Entgegen der Feststellungen von Chen et al. und Ramsamoj et al. wurde eine Herabregulierung von CRT durch Bestrahlung gefunden. Dieses gegensätzliche Ergebnis könnte für eine Zelltyp-abhängige Regulation sprechen. Es ist auch möglich, dass die Herabregulierung von Calreticulin durch Bestrahlung, die durch die Flurbiprofen-applikation tendenziell noch verstärkt war, Zeichen eines Ansprechens auf die tumorsuppressive Behandlung ist. In einem erst kürzlich veröffentlichten Bericht schildern Thiel et al., dass Calreticulin zu den Proteinen mit Hochregulierung in Mundhöhlenkarzinomen im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe gehört und potentiell als Markermolekül für diesen Tumor in Frage kommt (294). Auch die für die vorliegende Arbeit genutzte Zelllinie entstammt einem Mundhöhlenkarzinom und die Veränderung seiner Konzentration durch die Behandlung der Zellen macht es als potentiellen Biomarker noch interessanter. Weitere Studien wären notwendig um dies zu bestätigen.

5.1.5 Elongation Factor-1 Delta (Gen: EEF1D)

Dieses Gen encodiert eine Untereinheit des Elongationsfaktor-1 Komplexes, der für die Verlängerung der Peptidkette bei der mRNA-Translation an den Ribosomen verantwortlich ist. Es existieren diverse Transkript-Varianten, die durch alternatives Splicen entstehen und multiple Isoformen encodieren (295). EF-1 delta wurde als ein potentieller Aktivator der NFκB-Signalkaskade identifiziert (296). EF-1 delta ist außerdem ein Repressor der Transkription von E-Cadherin. Dies scheint der Hauptmechanismus seines onkogenen Potentials zu sein (297). E-Cadherin ist ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das am Erhalt der Integrität von epithelialen Zellverbänden beteiligt ist (25). Der Verlust von E-Cadherin in Tumorzellen steigert zum einen deren invasives Potential (298) und zum anderen ist er ein Schlüsselmechanismus der epithelialen-zur-mesenchymalen Transition (297), die eine zentrale Rolle bei der Befähigung von Tumorzellen zur Metastasierung spielt (299). In

humanen Krebszellen korreliert die Anzahl der EF-1 delta Transkripte direkt mit dem Ausmaß der E-Cadherin Repression und dem Verlust eines epithelialen Phänotyps (297). Ogawa et al. untersuchten die Expression von EF-1 delta in karzinomatösem und anliegendem tumorfreiem Gewebe aus Ösophagektomien von Patienten mit Karzinomen der Speiseröhre. Eine Überexpression von EF-1 delta in tumorösem Gewebe lag bei 73 % der Patienten vor und korrelierte mit einer signifikant schlechteren Prognose (300). Es fand sich nur eine Studie, die sich mit der Expression von EF-1 delta nach ionisierender Bestrahlung beschäftigt. Die Autoren fanden, dass die Expression von EF-1 delta innerhalb von 2 Stunden nach Bestrahlung ansteigt und nach 8 Stunden ihr Maximum erreicht (301). Daten über Auswirkungen auf die Radiosensitivität fehlen bis dato.

Dieses Ergebnis der EF-1 delta Induktion durch Bestrahlung ist konträr zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in denen eine Abnahme der EF-1 delta Level nach Bestrahlung festgestellt wurde. Allerdings wurden hier die Zellen schon 30 Minuten nach der Exposition gegenüber den ionisierenden Strahlen geerntet. Auch in den Daten von Jung et al. ist nach Bestrahlung zunächst ein Abfall der Menge an mRNA-Transkripten festzustellen, allerdings fehlen Angaben zur Signifikanz diese Phänomene. Es bleibt festzuhalten, dass die Bestrahlung der untersuchten HNSCC-Zelllinien zu einer Verminderung des proto-onkogenen EF-1 delta führt und dass eine Veränderung dieses Effekts durch die Applikation von Flurbiprofen nicht festzustellen war.

5.1.6 Nucleophosmin (Gen: NPM1)

Das Gen NPM1 encodiert das ubiquitäre Phosphoprotein Nucleophosmin, welches sich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herbewegen kann. Wahrscheinlich ist es am nukleären Export von Ribosomen beteiligt (302). Man vermutet, dass Nucleophosmin in verschiedenste Prozesse, inklusive der Regulation der ARF/p53-Signalkaskade, involviert ist. Einige Gene sind Fusionspartner und wurden charakterisiert. Unter den Fusionspartnern findet sich das Gen der anaplastischen Lymphom Kinase auf Chromosom 2. Mutationen dieses Gens sind assoziiert mit der Ätiologie der akuten myeloischen Leukämie. Mehr als ein Dutzend Pseudogene des NPM-Gens konnten bislang identifiziert werden, außerdem entstehen multiple Transkriptvarianten durch alternatives Splicen (303).

Die Analyse der Funktionen von Nucleophosmin in der Tumorigenese ergibt aufgrund ihrer Mannigfaltigkeit ein komplexes Bild an Aktivitäten, die sowohl die Zellproliferation begünstigen, als auch das Wachstum supprimieren können (304). Die entweder onkogenen oder tumorsuppressiven Funktionen scheinen dabei abhängig von der Höhe der Expression und der Gendosis zu sein: So können entweder die abnorme Überexpression oder der partielle Funktionsverlust durch voneinander verschiedene Mechanismen zur neoplastischen Transformation führen (304). Die vielfältigen Funktionen von Nucleophosmin sind vor allem durch seine molekularen und biochemischen Charakteristika bedingt und eine der wesentlichsten molekularen Funktionen des Proteins stellt seine Chaperonaktivität – sowohl für Proteine als auch für Nukleinsäuren – dar (305), (306). Zu den zellulären Prozessen, an denen es beteiligt ist, gehören indes die Biogenese der Ribosomen, die Antwort auf Stress auslösende Stimuli wie UV-Bestrahlung und Hypoxie, der Erhalt der genomischen Stabilität durch die Kontrolle der Euploidie und die Einbindung in DNA-Reparatur Prozesse sowie die Regulation der DNA-Transkription durch Modulation der Chromatin-Kondensation und -Dekondensation (304). Außerdem reguliert NPM1 die Aktivität und Stabilität der beiden wichtigen Tumorsuppressoren p53 und ARF. NPM liegt in manchen soliden Tumoren überexprimiert vor und die Höhe der Expression korreliert in einigen Fällen mit dem Stadium und der Progression der Erkrankung (304). Die pro-tumorigenen Folgen einer NPM-Überexpression zeigt Abb. 5.1.

Auf der anderen Seite ist der NPM-Genlocus involviert in genetische Alterationen bei onkologischen Erkrankungen des hämatopoietischen Systems, die zu onkogenen Fusionsproteinen oder mutierten Formen des Proteins führen. Außerdem verstärkt NPM durch Interaktion mit dem Tumorsuppressor ARF dessen anti-onkogenen Eigenschaften, wie Abb. 5.2 zeigt (304).

Zusammengenommen wird vermutet, dass NPM das Schicksal einer Zelle abhängig vom Zelltyp, den einwirkenden Stimuli und den aktivierten Signalkaskaden entscheiden kann. Die definitive Rolle von NPM in der Karzinogenese bleibt jedoch noch aufzuklären, da alle Schlussfolgerungen bisher lediglich aus *in vitro* Modellen gezogen wurden und *in vivo* Daten aus geeigneten Mausmodellen fehlen (305).

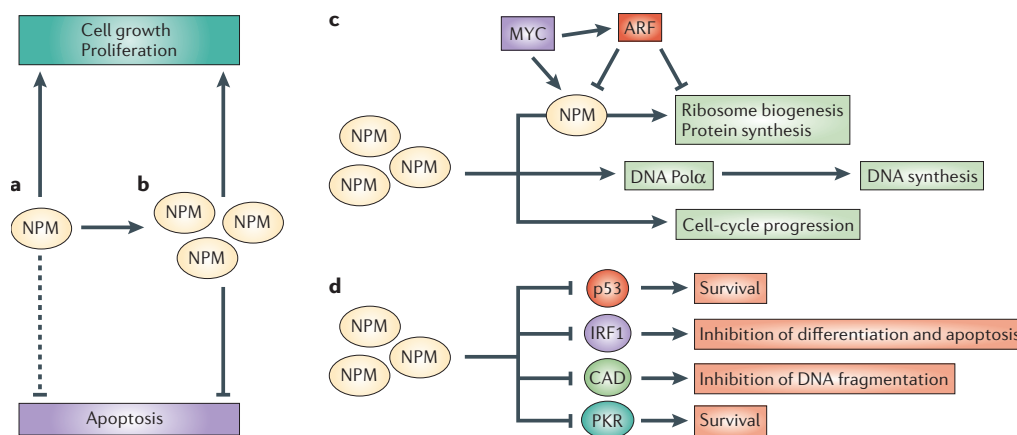


Abb. 5.1: Die Überexpression von NPM in Tumorzellen führt zur verstärkten Proliferation und zur Inhibition der Apoptose.

(a) In normal proliferierendem Gewebe wird Nucleophosmin (NPM) in physiologischen Konzentrationen exprimiert, sodass die Balance zwischen Proliferation und Apoptose erhalten bleibt. (b) In Tumorzellen liegt NPM oft überexprimiert vor und übt sein onkogenes Potential durch Stimulation von Zellwachstum und Proliferation sowie durch Verhinderung der Apoptose aus. (c) Die NPM Überexpression kann durch die Hyperaktivierung der Ribosomenmaschinerie zur Verstärkung von Zellwachstum und Proliferation führen. NPM ist zusammen mit anderen ribosomalen Proteinen Ziel der transkriptionalen Aktivität von MYC. Die veränderte MYC-Expression in Tumorzellen korreliert mit einer verstärkten Expression der betroffenen Proteine. Außerdem ist NPM möglicherweise ein Stimulator der DNA Polymerase-alpha (DNA Poly-alpha) und trägt so zur Progression des Zellzyklus bei. (d) Die Überexpression von NPM hat durch verschiedene Mechanismen der Apoptose-Inhibition ein onkogenes Potential: Es verhindert die Bindung des Transkriptionsfaktors Interferon Regulationsfaktor 1 (IRF1) an die DNA; Es bindet und inhibiert die katalytische Untereinheit der Kinase des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (PKR); es inhibiert die DNA-Fragmentation der Caspase-aktivierten DNAase (CAD) in neuronalen Zellen und es interagiert und inhibiert den Tumorsuppressor p53. Aus (304).

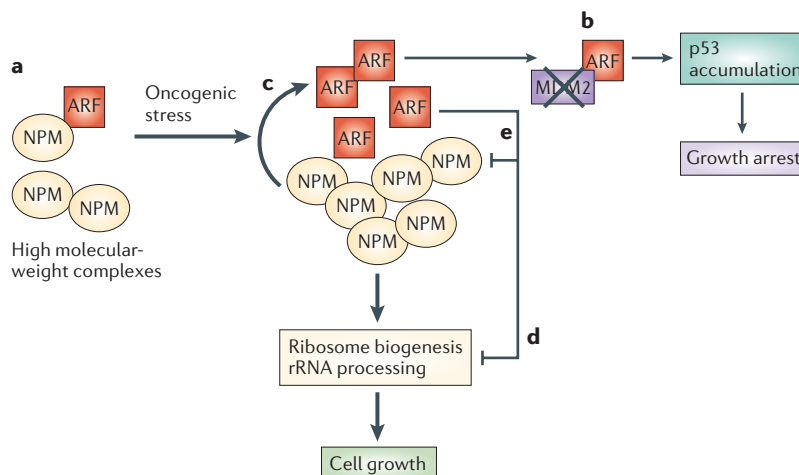


Abb. 5.2: NPM und ARF regulieren das Zellwachstum und die Proliferation, indem sie Stabilität und/oder Aktivität des jeweils anderen kontrollieren.

(a) Nucleophosmin (NPM) und ARF assoziieren innerhalb des Nukleolus. Die verstärkte Expression sowohl von NPM, als auch von ARF tritt im Rahmen der Antwort auf onkogene Stimuli auf. ARF aktiviert und verstärkt p53 abhängige (b) sowie p53 unabhängige (c-e) Signalkaskaden, die zum Wachstumsarrest führen. (b) ARF inhibiert den p53 Inhibitor MDM2. Dies führt zur Aktivierung von p53 und somit zur Suppression der Zellproliferation. (c-e) Ein vermehrtes Vorliegen von NPM stabilisiert ARF und führt zu dessen Akkumulierung. Dies führt zu einer verstärkten negativen Regulation der ribosomalen RNA-Prozessierung durch ARF (d) und steht dem nukleozytoplasmatischen Pendeln von NPM im Wege (e). Aus (304).

Die Folgen einer Überexpression von NPM wurden in *in vitro* Experimenten untersucht. Sie korreliert mit einem gesteigerten Überleben der Zellen nach Exposition gegenüber Stress-auslösenden Stimuli. So sind NPM überexprimierende Zellen z.B. resistenter gegenüber ultravioletter Strahlung (307) und ionisierender Bestrahlung (308). Diese gesteigerte Resistenz ist vermutlich Folge einer Verbesserung der Kapazitäten zur Reparatur von DNA-Schäden (309). Lee et al. identifizierten NPM als ein Protein, das infolge eines DNA-Schadens vom Nukleolus in das Nukleoplasma transloziert und an Chromatin bindet (310) und Koike et al. fanden, dass eine kleine, an der Position Threonin 199 phosphorylierte Fraktion von NPM (pT199-NPM) Teil eines Proteinkomplexes ist, der an DNA-Doppelstrangbrüche rekrutiert wird, um sie zu reparieren. Die Autoren mutmaßen, dass NPM durch seine Histon-Chaperon Aktivität an der Reparatur beteiligt ist. Eine selektive Hemmung von pT199-NPM resultiert in einer – allerdings nur mäßigen – Steigerung der Radio-sensibilität (310). Eine Steigerung der Phosphorylierung von Nucleophosmin durch Bestrahlung wurde vermutet (311). Konträr dazu demonstrierten andere Autoren wiederum, dass infolge eines strahleninduzierten DNA-Schadens die Nucleo-phosmin-Phosphatase PP1beta aktiviert wird und dass die induzierte NPM-Dephosphorylierung (auch an Thr 199) die DNA-Reparaturkapazität steigert. Diese Experimente wurden allerdings nicht mit ionisierenden Strahlen, sondern mit UV-Strahlung durchgeführt (312).

Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuche ergaben eine Senkung der NPM-Level nach alleiniger Bestrahlung, die nach kombinierter Behandlung mit Bestrahlung und dem Cyclooxygenase-Inhibitor jedoch nicht mehr detektierbar war. Verantwortlich dafür könnte eine Interferenz der Flurbiprofen-Wirkung mit den Auswirkungen der Bestrahlung sein, allerdings war eine Veränderung der NPM-Spiegel durch Flurbiprofen allein nicht festzustellen. In das Bild einer Einbindung von NPM in die DNA-Reparaturmechanismen, die nach einer Exposition gegenüber DNA schädigenden Stimuli einsetzen, würden eher erhöhte Spiegel des Proteins passen. Die Verminderung von NPM in den hier durchgeführten Versuchen könnte dann auf einen Artefakt durch die Anreicherung phosphorylierter Proteine hinweisen, wenn NPM – wie durch UV-Bestrahlung – auch durch ionisierende Bestrahlung dephosphoryliert werden würde. Um die Bedeutung dieses Ergebnisses für das Ansprechen auf eine Radiotherapie bei HNSCC einzuordnen, fehlen zudem Daten über die klinische Relevanz des Proteins für diese Tumorentität.

5.1.7 Stress-70 Protein (Gen. HSPA9)

Das Gen HSPA9 codiert ein Protein der heat shock 70 Familie. Dieses sog. Stress-70 Protein – in der Literatur zumeist als Mortalin oder in der Kurzform als GRP-75 bezeichnet – ist primär in Mitochondrien lokalisiert, wird aber auch im endoplasmatischen Reticulum, in der Plasmamembran und in zytoplasmatischen Vesikeln gefunden. Funktionell spielt es eine Rolle in den Prozessen von Zell-Proliferation, bei der zellulären Antwort auf Stress, beim Import von Proteinen in Mitochondrien sowie bei der Energiegewinnung (313), (314). Sind Zellen oxidativem Stress ausgesetzt, wird das Protein oxidiert und büßt einen Teil seiner Funktionen ein (313).

GRP-75 interagiert in seiner Funktion als mitochondriales Chaperon mit sehr vielen Proteinen, daher sind vielfältige Effekte der stressbedingten Modifikation von GRP-75 wahrscheinlich. Yaguchi et al. beschreiben, dass es bei der Abnahme der GRP-75 Funktionalität zu einem reduzierten Proteinimport in die Mitochondrien mit der Folge einer ineffizienten Energiegenerierung sowie zu einer Müll-Katastrophe (*garbage catastrophe*) wegen verminderter Proteinfaltungskapazitäten kommen kann (313), (315). Auf der zellulären Stressantwort beruht wohl auch die Beteiligung des GRP-75 in der Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Alzheimer (316) und Morbus Parkinson (317). Hier gibt es Hinweise, dass oxidativer Stress zu Veränderungen an GRP-75 führt und die posttranslationalen Modifikationen des Proteins beeinflusst (318) (319), (320), die das Proteinbindungsverhalten sowie seine subzelluläre Lokalisation verändern und seine Chaperonaktivität vermindern können (318). Da auch bei einer Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen oxidativer Stress durch die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst wird, könnten quantitative oder qualitative Veränderung des GRP-75 auch bei der Modifikationen der zellulären Bestrahlungsantwort von Bedeutung sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen einer hohen Dosis ionisierender Strahlen ausgesetzt und GRP-75 stellte sich als eines derjenigen Protein dar, dessen Expression durch diese Behandlung reduziert wurde. Sadekova et al. identifizierten GRP-75 jedoch als eines derjenigen Proteine, deren Expression nach einer – allerdings niedrig dosierten – Belastung mit ionisierenden Strahlen induziert wird (321). Niedrig dosierte Bestrahlung reduziert die Sensibilität von Zellen gegenüber einer nachfolgenden höher dosierten Bestrahlung (322), (323); ein Prozess, der als

induzierte Radioresistenz bezeichnet wird und über mehrere Teilungszyklen anhalten kann. Vermutlich ist er durch Verstärkung von DNA-Reparaturmechanismen bedingt (324), (325). Eine Blockade der GRP-75 Expression resultiert in einer höheren Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der höher dosierten Bestrahlung (321). In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten reduzierte die Applikation von Flurbiprofen die GRP-75 Spiegel, sodass zu vermuten ist, dass der Cyclooxygenase-Inhibitor via Herabregulierung von GRP-75 der Entwicklung einer induzierten Radioresistenz vorbeugen könnte.

Auch anti-onkogene Funktionen von GRP-75 werden vermutet. So identifizierten Hsu et al. in einer multivariaten Analyse der Daten von 72 Patienten mit Neuroblastomerkrankung GRP-75 als einen unabhängigen Marker für eine gute Prognose bei diesem embryonalen Tumor des autonomen Nervensystems (326). Das Ausmaß der Anfärbbarkeit für GRP-75 in Biopsien korrelierte stark mit guter Differenzierung des Tumorgewebes und frühen klinischen Stadien. Eine weitere möglicherweise anti-onkogene Funktion von GRP-75 könnte in der Bindung des Proteins an den Rezeptor für Hyaluron vermittelte Motilität (*receptor for hyaluronan mediated motility*, RHAMM) liegen, die in der Interphase der Mitose zur Stabilisierung von Mikrotubuli beiträgt und mit der Herabregulierung von RHAMM assoziiert ist (327). Die RHAMM-Überexpression scheint das Auftreten von Metastasen zumindest bei kolorektalen und endometrialen Karzinomen zu begünstigen (328), (329) und fördert die Zellmotilität (330). Auch Angiogenese verstärkende Mechanismen sind beschrieben (331). Auswirkungen der erhöhten RHAMM-Expression auf strukturelle centrosomale Abnormitäten, die zu Mitosedefekten führen, zeigten Maxwell et al. (332). Des Weiteren ist die überhöhte RHAMM-Expression assoziiert mit dem Ausmaß der Aggressivität von oralen Plattenepithelkarzinomen (333), (334) und Schmitt et al. lancieren RHAMM sogar als mögliches Zielmolekül für T-Zell basierte Immuntherapien des HNSCCs (335). Die exakte biologische Bedeutung der GRP-75 Interaktion mit RHAMM und ihre Auswirkungen auf onkogene Prozesse ist jedoch nicht bekannt.

Den Berichten über anti-onkogene Funktionen steht eine große Datenmenge aus Studien gegenüber, die tumor-begünstigende Funktionen von GRP-75 nahelegen. Eine gesteigerte Expression von GRP-75 kann in vielen Tumoren nachgewiesen werden. Es bestehen jedoch tumorspezifische Unterschiede mit noch unklarer Bedeutung (336). Wadhwa et al. halten es für wahrscheinlich, dass die

Hochregulierung von GRP-75 in Tumorzellen deren gesteigerten Energiebedarf bei einer erhöhten Proliferationsrate widerspiegelt und halten das Protein für einen geeigneten klinischen Marker der Aggressivität eines Tumors. Die Autoren nehmen außerdem an, dass die Bestimmung des GRP-75 Levels in Biopsiematerial die klinische Entscheidungsfindung erleichtern wird und dass das Protein ein attraktives Zielmolekül für neue Tumortherapien darstellen könnte (336).

In Proben von hepatozellulären Karzinomen (*hepatocellular carcinoma*, HCC) zeigte sich, dass GRP-75 in tumorösem Gewebe, verglichen mit nicht-tumorösem Nachbargewebe und normalem Lebergewebe, überexprimiert war (337). Auch Thiel et al. fanden eine Überexpression von GRP-75 in Tumorgewebe von Patienten mit Zungenkarzinomen verglichen mit der Expression in normaler Mukosa. In dieser Studie war GRP-75 außerdem eines von sechs Proteinen durch die am besten zwischen Tumor- und Kontrollgewebe unterschieden werden konnte. Die Autoren fanden drei Isoformen des Proteins (294).

Unterstützt wird das o.g. Konzept von GRP-75 als Zielmolekül neuer Tumortherapien noch durch die Ergebnisse von Pilzer et al., die zeigen, dass das Ausschalten von GRP-75 durch spezifische siRNA die Elimination des Membranangriffskomplexes (*membrane attack complex*, MAC) des Komplementsystems von der Zelloberfläche reduziert und Zellen gegenüber dem MAC induzierten Zelltod sensibilisiert (338). Die Bildung des MAC stellt die Endstrecke einer Aktivierung des Komplementsystems dar, das ein bedeutender Aktivator und Regulator der angeborenen und erworbenen Immunität ist (339). Der MAC ist ein kanalartiges Aggregat aus mehreren Proteinkomponenten des Komplementsystems und wird in die Phospholipid-Doppelschicht von Zielzellen eingebaut. Dies löst die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden aus (340), kann aber auch zu einem Zellschaden führen, der den nekrotischen Zelltod zur Folge hat (341). Alle Zellen besitzen Mechanismen, die sie vor der Zellyse durch eine akzidentelle Komplementaktivierung schützen können; in Tumorzellen sind diese Mechanismen jedoch stärker ausgeprägt (342). Die Resistenz schützt die Tumorzellen dann nicht nur vor dem Komplement-induzierten Zelltod, sondern schmälert auch den Erfolg antikörperbasierter gegen den Tumor gerichteter Immuntherapien (342). Um sich vor dem MAC-induzierten Zelltod zu schützen, können Zellen den Komplex von ihrer Oberfläche eliminieren. Entweder sie schnüren den betroffenen Anteil der Plasmamembran exozytotisch ab oder sie internalisieren den entsprechenden Membran-

abschnitt per Endozytose (342). Es wird angenommen, dass GRP-75 eine Schlüsselrolle bei diesen Prozessen zukommt (343). Die Verallgemeinerung, dass das Komplementsystem die Eliminierung von Tumorzellen durch das unspezifische Immunsystem unterstützt, ist jedoch zu sehr simplifiziert. Es existiert eine vergleichsweise große Datenmenge, die zeigt, dass die wesentlichen Kennzeichen der Karzinogenese durch die Hochregulation einzelner Komplementfaktoren sogar begünstigt werden (344). Jedoch wird der Verstärkung insbesondere der lytischen Komponenten des Komplementsystems, wie beispielsweise des MACs, Potential für die Entwicklung neuer oder ergänzender Tumorthérapien eingeräumt (345), (346). GRP-75 stellt hierbei eines der Zielmoleküle dar, deren Inhibition erfolgversprechend scheint (338).

Ergänzende Mechanismen, durch die GRP-75 proto-onkogene Funktionen ausübt, betreffen Interaktionen mit dem tumorsuppressiven Transkriptionsfaktor p53. In humanen Osteosarkom- und Brustkrebszellen wird die Aktivität von p53 durch die Bindung an GRP-75 reduziert (347). Prinzipiell kann die Funktionsfähigkeit von p53 – dem „Wächter des Genoms“ (36) – auf drei Arten eingeschränkt werden, die in unterschiedlichem Ausmaß in sehr vielen Tumoren vorkommen: (a) Mutationen können die DNA-Bindungs Kapazität oder die Aktivierung der DNA-Transkription einschränken, (b) die abnormale Expression von Proteinen, die mit p53 interagieren können seinen Abbau begünstigen und (c) p53 wird durch die Bindung an zytoplasmatische Proteine an seiner Translokation in den Nukleus gehindert (348), (349). Der letztgenannte Prozess wird als zytoplasmatische Sequestrierung bezeichnet und zu den daran beteiligten Proteinen gehört auch GRP-75. P53 bindet dabei mit seinen carboxyl-terminalen Aminosäuren 312-352 an GRP-75 (350), (351). Werden Tumorzellen, die den normalen p53-Wildtyp exprimieren, mit kurzen, die Aminosäuren 312-352 enthaltenden p53-Fragmenten transfiziert, binden diese anstelle des p53-Gesamtproteins an GRP-75 und bereits gebundenes p53 wird frei. Eine stärkere Translokation von p53 in den Nukleus mit konsekutivem Zellzyklusarrest in Tumorzellen ist die Folge (347). Kaul et al. stellen mit der Auflösung von p53-GRP-75-Komplexen durch p53-Fragmente eine neue, eventuell auch therapeutisch nutzbare Methode vor, um den Zellzyklusarrest in Tumorzellen zu erzielen, die den p53-Wildtyp zwar exprimieren, in denen er aber inaktiv ist. Eine weitere Interaktion von GRP-75 mit dem Tumorsuppressor p53 zeigten Ma et al. (352). Sie konnten nachweisen, dass es durch die Bindung von p53 an GRP-75 zu einer

gesteigerten Centrosomen-Duplikation kommt und zeigten, dass GRP-75 durch direkte Interaktion die Dissoziation von p53, weg von der centrosomalen Lokalisation, begünstigte. In ihren Experimenten war die Centrosomen-Amplifikation in GRP-75 überexprimierenden Zellen abnormal stark ausgeprägt, wie es ein typisches Kennzeichen von Tumorzellen ist (353), (354). Die von den Autoren gefundene Zellzyklus abhängige Bindung von GRP-75 an die Centrosomen legt nahe, dass das Protein eine regulierende Funktion auf die Centrosomen-Duplikation ausübt (352) – eine Hypothese, die auch durch die Ergebnisse von Kanai et al. unterstützt wird (355).

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten nanoUPLC-MS-Versuchen ergaben sich Hinweise, dass die Expression von GRP-75 durch die Gabe von Flurbiprofen und durch Bestrahlung gesteigert ist. Konträr zu diesem Ergebnis war in den Phosphoproteom-Analysen mit der 2D PAGE-Methode eine verminderte Expression durch Bestrahlung und Flurbiprofenapplikation festzustellen. Diese Gegensätzlichkeit könnte durch den Umstand erklärbar sein, dass für die nanoUPLC-MS Versuche nur eine einzelne Messreihe ohne technische oder biologische Replikate durchgeführt wurde. Ihre Ergebnisse bezüglich der Proteinquantifizierung sind daher aus statistischen Gründen anfechtbar. GRP-75 wurde in den 2D PAGE-Versuchen an zwei nebeneinanderliegenden Positionen innerhalb des Gels detektiert. Es kann daher vermutet werden, dass es sich um Isoformen mit differentiellen posttranslationalen Modifikationen handelt. Alternativ, aber aufgrund der Position im Gel unwahrscheinlicher, kämen auch Splicevarianten oder durch unspezifische Proteolyse entstandene Fragmente in Frage. Die Applikation von Flurbiprofen zusätzlich zur Bestrahlung bewirkte eine noch stärker reduzierte Expression als durch alleinige Bestrahlung. Insbesondere hinsichtlich der oben beschriebenen Eignung von GRP-75 als Zielmolekül für Tumortherapien und seiner Beteiligung bei der Entwicklung von induzierter Radioresistenz ist dies als wichtiger Befund mit Implikationen für die weitere Erforschung des Proteins im Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs zu werten. Die Herabregulierung dieses Radioresistenz-vermittelnden Proteins durch Flurbiprofen kann als Hinweis für radiosensitivierende Eigenschaften des Cyclooxygenase-Inhibitors gewertet werden.

5.2 Diskussion der experimentellen Methode

Im ersten Teil dieses Kapitels werden allgemeine Limitationen des Experiments diskutiert. Im zweiten Teil werden methodische Alternativen der Phosphoproteomanalytik aufgezeigt.

5.2.1 Allgemeine Limitationen des Experiments

Die Anreicherung von phosphorylierten Proteinen vor der Peptidanalyse mittels Massenspektrometrie ist aus den in 2.3.3 genannten Gründen notwendig. Alle bislang zur Verfügung stehenden Methoden haben ihre Vor- und Nachteile (231), die im Abschn. 5.2.2 angeführt werden. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde die IMAC-Methode gewählt. Sie eignet sich, verglichen mit anderen Methoden, die vor allem der Anreicherung von Phosphopeptiden dienen, besonders zur Anreicherung von Phosphoproteinen (232). Eine schwerwiegende Einschränkung der Methode liegt darin begründet, dass neben den phosphorylierten Proteinen auch stark saure Proteine angereichert werden. Dies ist bedingt durch den Umstand, dass auch die sauren Aminosäurereste von Glutamin- und Asparaginsäure mit den Metallionen interagieren (224). Weiterentwicklungen der Methode, z.B. die durch Zhou et al. entwickelte Titanionen Affinitätschromatographie (Ti^{4+} -IMAC), sind in der Lage das Problem der unspezifischen Anreicherung saurer Protein zu reduzieren (356).

Die zweidimensionale Elektrophorese ist eine leistungsstarke, klassische Methode der Proteomik (232). Ihr größter Nachteil liegt jedoch in ihrer Störanfälligkeit: Sie hat viele Schritte und bietet daher viele mögliche Fehlerquellen (226). Die zusätzlichen Schritte, die wegen der Phosphoproteinanreicherung in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten notwendig waren, erhöhten die Anzahl der möglichen Fehlerquellen. Außerdem werden Proteine mit extremen pH-Werten sowie sehr große oder sehr kleine Proteine bei dieser Methode nicht erfasst und auch die hydrophoben Membranproteine können häufig nicht ausreichend dargestellt werden. Zusätzlich können Proteine, die in hoher Abundanz vorliegen,

Proteine, die weniger stark exprimiert sind, überdecken, sodass die Identifizierung seltener Proteine mit dieser Methode schwierig ist (226). Einen Fallstrick der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente stellte die IEF mit den Phosphoproteinproben dar. Vermutlich aufgrund von Bestandteilen der Lösungsmittel des Kits zur Anreicherung von Phosphoproteinen, welche auch durch Umpufferung nicht entfernt werden konnten, war die Etablierung eines neuen Protokolls für die IEF mit sanfterem Anstieg der Spannung notwendig. Außerdem war die IEF nur mit Strips mit dem pH-Bereich 4-7 möglich. Strips mit einem Bereich von 3-10 hätten einen breiteren Bereich abdecken können und hätten gerade im sauren pH-Bereich – bei den meisten Phosphoproteinen handelt es sich wegen der anhängenden Phosphatgruppen um saure Proteine (231) – zur Identifizierung zusätzlicher relevanter Proteine beitragen können.

In Vorversuchen des Experiments wurden große Proteinverluste durch die Ultrazentrifugation nach der IMAC, die zur Konzentrierung der Proben notwendig war, festgestellt. Eine Konzentrierung der Proben durch Proteinfällung stellte sich als nicht praktikabel heraus. Die Verwendung alternativer Probenbehälter und Filter bei der Zentrifugation war zwar in der Lage die Verluste zu reduzieren, konnte sie aber nicht verhindern. Da beim Aufgeben einer Proteinmenge von 120 µg nach der 2D PAGE deutliche Proteinspots in den gefärbten Gelen zu erkennen waren, wurde diese Menge für die Hauptversuche festgelegt. Bei der massenspektrometrischen Proteinidentifikation mittels Peptidmassen Fingerabdruck konnte jedoch nur ein Drittel der ausgestochenen Spots mit ausreichender Sicherheit identifiziert werden. Man könnte vermuten, dass eine höhere Proteinmenge notwendig gewesen wäre, um zusätzliche Proteine zu identifizieren und somit mehr Informationen zur Beantwortung der Fragestellungen gewinnen zu können. Versuche aus der eigenen Arbeitsgruppe mit Phosphoproteinproben zeigen, dass die Aufgabe von 150 µg Protein pro Strip zwar mehr Proteinspots sichtbar macht; eine deutliche Erhöhung der Identifizierungsrate ergab sich dadurch jedoch nicht. Vermutlich liegt also die Ursache für die geringe Identifizierung per Peptidmassen Fingerabdruck zumindest teilweise an der Aufarbeitung der Proteine für die MALDI-TOF Massenspektrometrie. So scheint Trypsin für den Verdau von Phosphoproteinen nicht besonders gut geeignet zu sein und auch die Massenspektrometrie an sich mit Phosphopeptiden ist nicht trivial (225), (224). Außerdem kam es leider häufiger zu Verzögerungen zwischen der Trocknung der Peptide und der massenspektrometrischen Auf-

arbeitung, sodass die lyophilisierten Peptide über Wochen gelagert werden mussten, bis sie analysiert werden konnten. Peptidmengenverluste durch die Lagerung sind daher denkbar.

Für die vorliegende Arbeit wurde zur Beantwortung der Fragestellung, ob eine Flurbiprofenapplikation bekannten Mechanismen der Entwicklung von Radioresistenz in Tumorzellen entgegenwirken kann, eine ausführliche Literaturrecherche angestellt. Bezug nehmend auf die differentielle Regulierung von Proteinen durch die Flurbiprofenapplikation, wurden die Ergebnisse von Studien, die sich mit dem jeweiligen Protein beschäftigten, interpretiert. Auf diese Weise konnten Hinweise gesammelt werden, dass Flurbiprofen durch die Herabregulierung von GRP-75, 14-3-3 sigma und eventuell auch CRT zu einer Verminderung der Spiegel dieser möglicherweise Radioresistenz-vermittelnden Proteine führt. Folgeexperimente, die die Rolle dieser Proteine für die Radioresistenz und die Auswirkungen des Cyclooxygenase-Inhibitors gezielt untersuchen, wären notwendig, um diese Hypothese zu überprüfen. Globalere Ansätze, um die Radioresistenz in Tumorzellen des Kopf- und Halsbereichs zu untersuchen stellen Vergleiche der (Phospho-)Proteome von radiosensiblen vs. radioresistenten Zellen dar. Besonderes Augenmerk könnte dabei auf die Auswirkungen differentieller Phosphorylierungsereignisse mittels Methoden der quantitativen Phosphoproteomik gelegt werden oder indem spezifische Phosphorylierungen durch Kinaseinhibitoren gehemmt würden. Proteinkinasen gehören zu den vielversprechenden Zielmolekülen der neuen molekularen Tumorthérapien (223) und die Entwicklung von Kinaseinhibitoren, die Radioresistenz verhindern können, gehört zu den bislang ungelösten Aufgaben der molekularen Tumorbologie.

Eine weitere Limitation bei der Interpretation der Ergebnisse dieses Experiments besteht in der Frage, ob die Veränderungen der Proteinspiegel bei der Behandlung der Tumorzellen mit Bestrahlung, Flurbiprofenapplikation oder deren Kombination durch differentielle Phosphorylierungen oder durch differentielle Transkriptions- bzw. Translationsereignisse zustande gekommen sind. Der kurze Zeitabstand von der Bestrahlung resp. Flurbiprofenapplikation bis zur Zellernte (30 min resp. 90 min) lässt vermuten, dass es sich bei den Konzentrationsveränderungen der Phosphoproteine um hochdynamische Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse handelt. Eine Veränderung der Genexpression durch Veränderung der Transkription würde einen längeren Zeitraum von mindestens

mehreren Stunden beanspruchen, um manifest zu werden. Daneben könnte auch eine verstärkte oder verminderte Translation entsprechender mRNAs für die Konzentrationsveränderungen von Phosphoproteinen durch die Zellbehandlung verantwortlich sein, die ebenfalls schnell auf veränderte Wachstumsbedingungen von Zellen reagieren kann. Bisher unveröffentlichte Ergebnisse aus Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe, die sich gezielt mit einigen der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Proteinen beschäftigt hatten, legen nahe, dass differentielle Phosphorylierungsereignisse vermutlich den größeren Anteil an den Veränderung der Proteinkonzentration haben.

5.2.2 Methodische Alternativen und Perspektiven

Es liegt über den Möglichkeiten dieser Arbeit eine detaillierte Übersicht über die Fülle der Methoden der Phosphoproteomik – und damit der methodischen Alternativen der hier durchgeführten Experimente – zu geben. Für jede Stufe – Phosphoprotein-Anreicherung, Quantifizierung, Massenspektrometrie – gibt es viele verschiedene Ansätze. Alle haben Vor- und Nachteile, unterscheiden sich in ihrer Spezifität und liefern zwar überlappende, aber doch voneinander verschiedene Ergebnisse (231), (224), (223). Es wird daher postuliert, dass die verschiedenen Ansätze komplementär zueinander sind (232).

Die Abb. 5.3 gibt einen Überblick über die am häufigsten verwendeten Methoden zur Phosphoprotein- oder Phosphopeptid-Anreicherung.

Bei der Immunopräzipitation werden Antikörper gegen phosphorylierte Serin-, Threonin- und Tyrosinreste genutzt, um Phosphoproteine aus einer komplexen Probe anzureichern. Limitiert ist diese Methode durch die Spezifität der Antikörper (357, 358). Die Methode kann auch zur Vorfraktionierung einer Probe, beispielsweise vor IMAC oder TiO₂-Chromatographie, genutzt werden (224).

Die Methodik der IMAC und ihr großer Nachteil der unspezifischen Anreicherung saurer Proteine bei der IMAC wurden bereits erläutert. Es existieren verschiedene Ansätze um diesen Nachteil auszugleichen: Veresterung der Carboxylgruppen saurer Aminosäurereste, Protonierung der sauren Aminosäurereste

zur Ansäuerung der Probe, Vorfractionierung der Probe durch IEF, Ionenaustausch-Chromatographie u.a. (224).

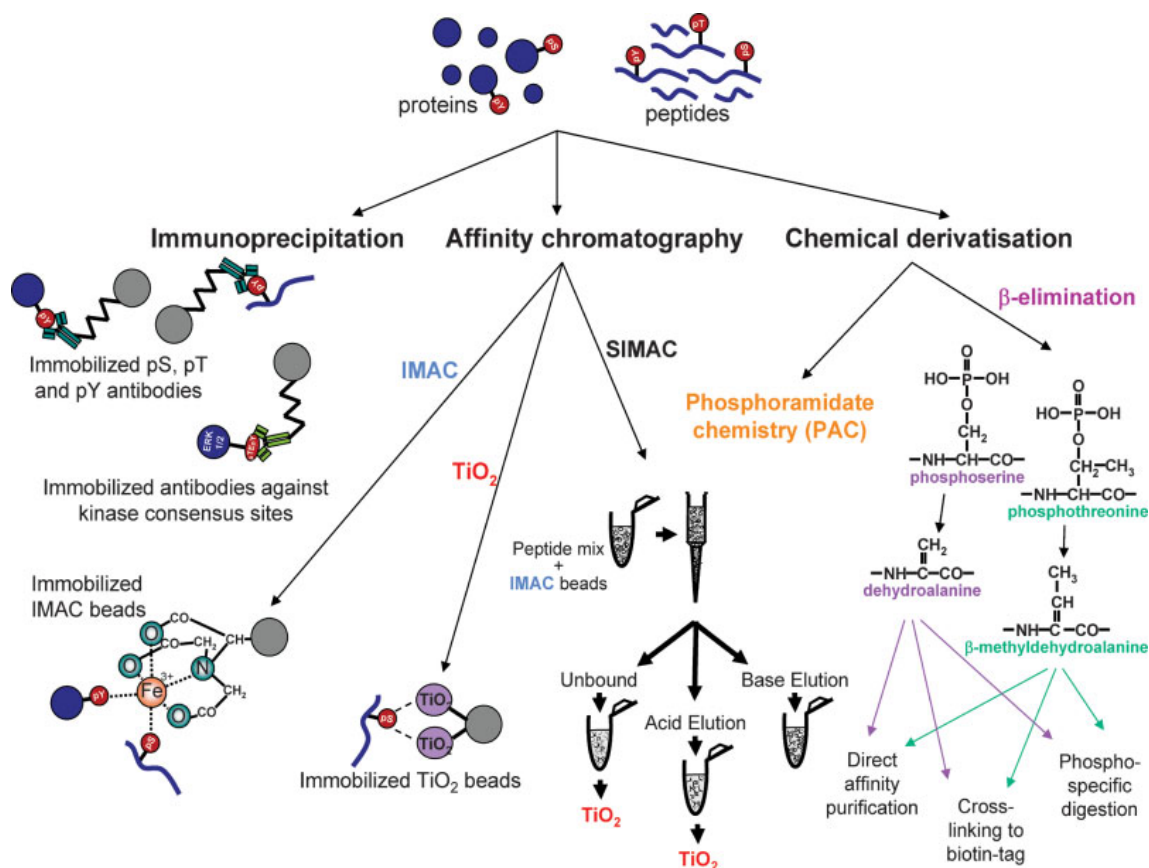


Abb. 5.3 Überblick über die verschiedenen Methoden der Anreicherung von Phosphoproteinen und Phosphopeptiden aus komplexen Proben. Aus (224).

Die TiO₂-Chromatographie hat sich zu einer der beliebtesten Methoden der Phosphoproteinanreicherung entwickelt. Dies hat nicht nur ökonomische Gründe. Auch in der Anwendung erweist sich die Methode durch ihre große Toleranz gegenüber Salzen und Pufferbestandteilen als besonders gut zu handhaben (224).

Mithilfe der Methode der sequentiellen Elution von der IMAC (SIMAC) kann der Nachteil der präferenziellen Anreicherung mono-phosphorylierter Proteine durch TiO₂ und multipel-phosphorylierter Proteine durch IMAC ausgeglichen werden (359).

Weitere affinitätsbasierte Methoden zur Phosphoproteinanreicherung sind die Calcium Phosphat Präzipitation, die Ionenaustausch-Chromatographie und die

Hydrophile Interaktion Chromatographie (HILIC), die vor allem als Methoden der Vorfraktionierung komplexer Proben an Bedeutung gewonnen haben.

Die wesentlichen Nachteile der chemischen Derivatisierung von Phosphatgruppen an Peptiden und Proteinen ist der hohe experimentelle Aufwand und das besonders hohe Risiko von Probenverlusten (224).

Aus den Ergebnissen einer Studie, in der Bodenmiller et al. verschiedene Ansätze zur Anreicherung von Phosphoproteinen – TiO₂, IMAC und PAC – miteinander verglichen, kann geschlussfolgert werden, dass zwar keine der Methoden geeignet ist, das ganze Phosphoproteom darzustellen, dass sie aber jeweils der Identifikation bestimmter überlappender Anteile dienen (360).

Die letzten Jahre zeigen einen Trend der Proteomik weg von den Gelbasierten 2D-Experimenten hin zu Methoden der sog. quantitativen Massenspektrometrie (228). Dazu haben sich Methoden etabliert, die eine relative oder absolute Protein- oder Peptidquantifizierung aus komplexen Proben möglich machen (230). Die Methoden der quantitativen Phosphoproteomik sind zahlreich. Die Techniken sollen die durch definierte Stimuli ausgelösten Prozesse von Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen an ganz bestimmten *Phosphosites* identifizieren, um die Bedeutung der einzelnen Events für zelluläre Signalwege klären zu können. Bei vielen dieser Techniken wird ein stabiles Isotopen-*label* oder *-tag* an Proteine oder Peptide zu deren Markierung angehängt. Die Menge der markierten Spezies, die z.B. aus kranken Gewebe gewonnen wurde, kann dann mit der Menge der nicht oder differentiell markierten Spezies, z.B. aus gesundem Gewebe, verglichen werden (231). Die Methoden zur Quantifizierung unterscheiden sich dabei durch die Ebene, auf der die Markierung eingebracht wird:

- ▶ Lebende Zellen: z.B. *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture* (SILAC) (361, 362)
- ▶ Proteinebene: z.B. *Isotope-Coded Affinity Tags* (ICAT) (363)
- ▶ Peptidebene: z.B. *Isobaric Peptide Tags for Relative and Absolute Quantification* (iTRAQ) (364)

Andere Techniken sind *label*-frei und entnehmen die Informationen zur Quantifizierung den LC-MS Daten (*Extracted Ion Current*, XIC) oder den MS/MS-Daten (*Protein Abundance Index*, PAI) (365-367).

Die Entwicklung neuer und effektiverer Methoden in den letzten Jahren – auch seit Beginn der Experimente der vorliegenden Arbeit – war immens und wurde von der bedeutenden Wichtigkeit der Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung für die Systembiologie und das Verständnis der zugrundeliegenden zellulären Signalnetzwerke angetrieben (224). Dennoch sind sich führende Experten einig, dass es noch ein weiter Weg sein wird, bis geeignete Methoden voll etabliert sind und die automatisierte Phosphoproteomanalyse zur Routine geworden ist (225). Auf der technischen Seite besteht die größte Herausforderung in der Weiterentwicklung von Methoden, mit denen quantitative Analysen von posttranslationalen Modifikationen und die Verarbeitung der gewonnenen Daten gleichzeitig und automatisiert durchgeführt werden können (224). Außerdem wurden andere posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen und Acetylierungen bisher wenig beachtet. Gerade die Erforschung des Zusammenspiels verschiedener PTMs auf quantitativer Basis wird wichtige Erkenntnisse über die komplexen zellulären Netzwerke beisteuern (231).

Quantitative Phosphoproteomstudien der letzten Jahre haben eine große Menge bisher nicht-validierter Daten generiert (232). Tatsächlich ist die Reproduzierbarkeit von Daten aus Phosphoproteomstudien bisher nicht gewährleistet (225). Auch gewähren diese Studien nur einen minimalen mechanistischen Einblick in die Funktionalität der beschriebenen Kinase-regulierten Phosphorylierungsstellen. Fortschrittliche bioinformatische Systeme, die proteomische, genomische, transkriptomische und metabolomische Daten integrieren können, sollten dabei behilflich sein, relevante Informationen über die funktionelle Bedeutung untersuchter *Phospho-sites* anbieten zu können (232).

6. Zusammenfassung

Die Radiotherapie hat in der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs nach wie vor einen hohen Stellenwert. Der Erfolg eines Therapieregimes, das die Behandlung mit ionisierenden Strahlen einschließt, ist jedoch häufig limitiert durch die Entwicklung radioresistenter Tumorzellpopulationen, die nicht selten durch die Bestrahlung selbst induziert wird. Die Mechanismen, die zu einer solchen bestrahlungsinduzierten Radioresistenz führen sind bisher nur unvollständig verstanden und Methoden, durch die die Entwicklung von Radioresistenz verhindert werden könnte, wie beispielsweise der präventive Einsatz von Pharmazeutika, sind bislang nicht systematisch untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob der Cyclooxygenase-Inhibitor Flurbiprofen durch Bestrahlung induzierte Veränderungen der Phosphoprotein-Expression verstärken oder abschwächen kann und ob sich aus solchen Modifikationen des Bestrahlungsergebnisses ein radioprotektiver Effekt der Flurbiprofenapplikation ableiten lässt.

Methodisch wurde hierfür ein experimenteller Ansatz gewählt, der mittels 2D PAGE und anschließender MALDI-TOF Massenspektrometrie das Phosphoproteom einer HNSCC-Zelllinie unter verschiedenen Bedingungen untersuchte. Die Zellen wurden entweder mit einer Energiedosis von 8 Gy bestrahlt, mit einer 200 µM Flurbiprofen enthaltenden Lösung inkubiert oder sie wurden mit einer Kombination aus Flurbiprofenapplikation und Bestrahlung behandelt. Vor der 2D PAGE wurden die Phosphoproteine durch IMAC angereichert. Zur Verbesserung der Gel-Analytik wurde die Software Delta 2D angewendet, die zum Ausgleich von Laufweitenunterschieden zwischen den Gelen ein Warming vorsieht.

Bei der Analyse, der unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen differentiell exprimierten Phosphoproteinen mittels bioinformatischer Hilfsprogramme wie z.B. *WEBGestalt* und *STRING*, wurden sieben Proteine mit Bedeutung für das Wachstum und die Entdifferenzierung von Tumoren identifiziert und einer ausführlichen Literaturrecherche unterzogen. Auf diese Weise konnten die Ergebnisse der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente in den systembiologischen Kontext eingeordnet werden. Besonders hervorzuheben ist die Herabregulierung der möglicherweise Radioresistenz vermittelnden Proteine GRP-75, 14-3-3 sigma und CRT sowie die Herabregulierung des anti-apoptotischen und tumor-begünstigenden

Hsp60 durch Flurbiprofen. Die Verminderung der Expression unterstreicht das Potential dieses Pharmakons sowie der Klasse der COX-Inhibitoren als mögliche radiosensitivierende und tumorsuppressive Substanzen.

7. Literaturverzeichnis

1. Argiris A, Eng C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treat Res.* 2003;114:15-60.
2. Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jun;15(6):1061-77.
3. Warnakulasuriya S. Areca nut use following migration and its consequences. *Addict Biol.* 2002 Jan;7(1):127-32.
4. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Jan 21;96(2):99-106.
5. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988 Jun 1;48(11):3282-7.
6. Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer.* 1988 Apr 15;41(4):483-91.
7. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007 May 10;356(19):1944-56.
8. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002 Nov;89(2):213-28.
9. Slebos RJ, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X, et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):701-9.
10. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 20;100(4):261-9.
11. Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med.* 1995 Sep 14;333(11):693-8.
12. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM, et al. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* 2004 Jun;114(6):1027-31.

13. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
14. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2005/2006; Häufigkeiten und Trends. 2010 [cited 2011 2011-12-30]; Available from: http://www.rki.de/cIn_160/nn_205770/sid_53606E0872850B657F37D00CFD89D84B/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/krebs__node.html?__nnn=true. Accessed: 2011-12-30. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64JiGQtE4>).
15. U.S. National Institutes of Health NCI. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER); Cancer Statistics. [cited 2011 2011-12-30]; Available from: <http://seer.cancer.gov/statistics/index.html>. Accessed: 2011-12-30. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64Jt3UZU>).
16. Brouha XD, Tromp DM, Hordijk GJ, Winnubst JA, de Leeuw JR. Oral and pharyngeal cancer: analysis of patient delay at different tumor stages. *Head Neck.* 2005 Nov;27(11):939-45.
17. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008 May 17;371(9625):1695-709.
18. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993;7(3):139-46.
19. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996 Jun 1;56(11):2488-92.
20. Cowan JM, Beckett MA, Ahmed-Swan S, Weichselbaum RR. Cytogenetic evidence of the multistep origin of head and neck squamous cell carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1992 May 20;84(10):793-7.
21. Van Dyke DL, Worsham MJ, Benninger MS, Krause CJ, Baker SR, Wolf GT, et al. Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994 Mar;9(3):192-206.
22. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988 Sep 1;319(9):525-32.
23. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
24. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):220-8.
25. Alberts B. *Molekularbiologie der Zelle.* 5. Aufl.. ed. Weinheim: Wiley-VCH,; 2011.
26. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jun 3;90(11):824-32.

27. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 1;25(16):2164-70.
28. Pomerantz RG, Grandis JR. The epidermal growth factor receptor signaling network in head and neck carcinogenesis and implications for targeted therapy. *Semin Oncol*. 2004 Dec; 31(6):734-43.
29. Rubin Grandis J, Tweardy DJ, Melhem MF. Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1998 Jan;4(1):13-20.
30. Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res*. 1994 Jun 15;54(12):3153-9.
31. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2003 Oct;260(9):502-8.
32. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 1;24(25):4170-6.
33. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):567-78.
34. 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 Sep 11;359(11): 1116-27.
35. Stewart JS, Cohen EE, Licitra L, Van Herpen CM, Khorprasert C, Soulieres D, et al. Phase III study of gefitinib compared with intravenous methotrexate for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck [corrected]. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 10;27(11):1864-71.
36. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
37. Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8., völlig neu bearb. Aufl. ed. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.; 2007.
38. Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Jul;121(7):790-4.
39. Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, et al. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer*. 1997 Jan 15;79(2):380-9.

40. Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, et al. Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997 May;123(5):497-502.
41. Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene*. 1995 Sep 7;11(5):1005-11.
42. Kong S, Amos CI, Luthra R, Lynch PM, Levin B, Frazier ML. Effects of cyclin D1 polymorphism on age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res*. 2000 Jan 15;60(2):249-52.
43. Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Eicher SA, Strom SS, et al. Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Carcinogenesis*. 2001 Aug;22(8):1195-9.
44. Marsit CJ, Black CC, Posner MR, Kelsey KT. A genotype-phenotype examination of cyclin D1 on risk and outcome of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2008 Apr 15;14(8):2371-7.
45. Matthias C, Harreus U, Strange R. Influential factors on tumor recurrence in head and neck cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2006 Jan;263(1):37-42.
46. Holley SL, Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC, Hoban PR. Association of cyclin D1 polymorphism with increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2005 Feb;41(2):156-60.
47. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Aug 15;56(16):3630-3.
48. Miracca EC, Kowalski LP, Nagai MA. High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. *Br J Cancer*. 1999 Oct;81(4):677-83.
49. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, et al. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res*. 1994 Mar 1;54(5):1156-8.
50. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, et al. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope*. 2002 Mar;112(3):472-81.
51. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 1;26(19):3128-37.
52. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2007 Dec 20;357(25):2552-61.

53. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4477-80.
54. Field JK, Zoumpourlis V, Spandidos DA, Jones AS. p53 expression and mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck: expression correlates with the patients' use of tobacco and alcohol. *Cancer Detect Prev.* 1994;18(3):197-208.
55. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995 Mar 16;332(11):712-7.
56. Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, et al. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Nov 6;88(21):1580-6.
57. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995 Feb 16;332(7):429-35.
58. Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Alvarez I, Suarez C. MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 May;122(5):504-7.
59. Porter MJ, Field JK, Leung SF, Lo D, Lee JC, Spandidos DA, et al. The detection of the c-myc and ras oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol.* 1994 Jan;114(1):105-9.
60. Field JK, Spandidos DA, Stell PM, Vaughan ED, Evan GI, Moore JP. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 1989 Dec;4(12):1463-8.
61. Tang XH, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011 Feb 28;6:345-64.
62. Xu XC, Ro JY, Lee JS, Shin DM, Hong WK, Lotan R. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res.* 1994 Jul 1;54(13):3580-7.
63. Youssef EM, Lotan R, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao L, et al. Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 1;10(5):1733-42.
64. Khuri FR, Lippman SM, Spitz MR, Lotan R, Hong WK. Molecular epidemiology and retinoid chemoprevention of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Feb 5;89(3):199-211.
65. Papadimitrakopoulou VA, Hong WK. Retinoids in head and neck chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997 Nov;216(2):283-90.

66. Fabricius EM, Kruse-Boitschenko U, Schneeweiss U, Wildner GP, Hoffmeister B, Raguse JD. Model examination of chemoprevention with retinoids in squamous cell carcinomas of the head and neck region and suitable biomarkers for chemoprevention. *Int J Oncol.* Jul 22.
67. Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch.* 2001 Dec;439(6):725-51.
68. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res.* 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6328-37.
69. Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):166-72.
70. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol.* Feb;23(2): 213-24.
71. Tsao SW, Liu Y, Wang X, Yuen PW, Leung SY, Yuen ST, et al. The association of E-cadherin expression and the methylation status of the E-cadherin gene in nasopharyngeal carcinoma cells. *Eur J Cancer.* 2003 Mar;39(4):524-31.
72. Dikshit RP, Gillio-Tos A, Brennan P, De Marco L, Fiano V, Martinez-Penuela JM, et al. Hypermethylation, risk factors, clinical characteristics, and survival in 235 patients with laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Cancer.* 2007 Oct 15;110(8):1745-51.
73. Marsit CJ, Posner MR, McClean MD, Kelsey KT. Hypermethylation of E-cadherin is an independent predictor of improved survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2008 Oct 1;113(7):1566-71.
74. Johansson N, Airola K, Grenman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol.* 1997 Aug;151(2):499-508.
75. de Vicente JC, Lequerica-Fernandez P, Lopez-Arranz JS, Esteban I, Fresno MF, Astudillo A. Expression of matrix metalloproteinase-9 in high-grade salivary gland carcinomas is associated with their metastatic potential. *Laryngoscope.* 2008 Feb;118(2):247-51.
76. Gorogh T, Beier UH, Baumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, et al. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2006 Jan;28(1):31-9.
77. P OC, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *Int J Cancer.* 2000 May 1;86(3):307-17.

78. McNally LR, Rosenthal EL, Zhang W, Buchsbaum DJ. Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with replicative adenovirus expressing tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and chemoradiation. *Cancer Gene Ther.* 2009 Mar;16(3):246-55.
79. P OC, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Jul;127(7):813-20.
80. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue and circulating immunoreactive protein for MMP-2 and TIMP-2 in head and neck squamous cell carcinoma--tissue immunoreactivity predicts aggressive clinical course. *Mod Pathol.* 2006 Feb;19(2):208-17.
81. De Schutter H, Geeraerts H, Verbeken E, Nuyts S. Promoter methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. *Oncol Rep.* 2009 Feb;21(2):507-13.
82. Katayama A, Bando N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10(2):634-40.
83. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997 Oct;74(2):111-22.
84. Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, et al. Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18(2):111-20.
85. Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck.* 2006 Jul;28(7):639-48.
86. Pena JC, Thompson CB, Recant W, Vokes EE, Rudin CM. Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 1999 Jan 1;85(1):164-70.
87. Trask DK, Wolf GT, Bradford CR, Fisher SG, Devaney K, Johnson M, et al. Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. *Laryngoscope.* 2002 Apr;112(4):638-44.
88. Gallo O, Boddi V, Calzolari A, Simonetti L, Trovati M, Bianchi S. bcl-2 protein expression correlates with recurrence and survival in early stage head and neck cancer treated by radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 1996 Feb;2(2):261-7.
89. Friedman M, Grey P, Venkatesan TK, Bloch I, Chawla P, Caldarelli DD, et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression in localized squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1997 Jun;106(6):445-50.
90. Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Ronchetti D, Cesana BM, Ottaviani A, et al. Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1998 Jun 19;79(3):263-8.

91. Jin YT, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, et al. The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1998 Jun 1;82(11):2159-65.
92. UpToDate. Tumor node metastases (TNM) staging system for cancer of the larynx. [cited 2011 2011-12-30]; Available from: http://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ONC%2F18124&topicKey=ONC%2F3388&rank=8~150&source=see_link&search=HNSCC+Staging&utmPopup=true. Accessed: 2011-12-30. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64JvPJXQC>).
93. UpToDate. Tumor node metastases (TNM) staging system for cancer of the oropharynx. [cited 2011 2011-12-30]; Available from: http://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ONC%2F18128&topicKey=ONC%2F3399&rank=9~150&source=see_link&search=HNSCC+Staging. Accessed: 2011-12-30. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64JvnGMUL>).
94. UpToDate. Tumor node metastases (TNM) staging system for cancer of the hypopharynx. [cited 2011 2011-12-30]; Available from: http://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ONC%2F18123&topicKey=ONC%2F3397&rank=11~150&source=see_link&search=HNSCC+Staging. Accessed: 2011-12-30. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64Jw7h0Ow>).
95. UpToDate. Tumor node metastases (TNM) staging system for cancer of the lip and oral cavity. [cited 2011 2011-12-30]; Available from: http://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ONC%2F18127&topicKey=ONC%2F3407&rank=14~150&source=see_link&search=HNSCC+Staging&utmPopup=true. Accessed: 2011-12-30. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64Jwsucz>).
96. Brockstein BE. Complications of radiotherapy for head and neck cancer. Last literature review version 19.2: Mai 2011. [updated Mai 25, 2011; cited 2011 02.09.2011]; Available from: http://www.uptodate.com/contents/complications-of-radiotherapy-for-head-and-neck-cancer?source=search_result&search=Complications+of+radiotherapy+for+head+and+neck+cancer&selectedTitle=1~150.
97. Carneiro BA. Overview of treatment for head and neck squamous cell cancer. Last literature review version 19.2: Mai 2011 [updated Februar 10, 2011]; Available from: http://www.uptodate.com/contents/overview-of-treatment-for-head-and-neck-squamous-cell-cancer?source=search_result&selectedTitle=1~150.
98. Cooper JS, Ang KK. Concomitant chemotherapy and radiation therapy certainly improves local control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Jan 1;61(1):7-9.
99. Jolly S. Postoperative radiation therapy in the management of head and neck cancer. Last literature review version 19.2: Mai 2011 [updated Juni 16, 2011]; Available from: http://www.uptodate.com/contents/postoperative-radiation-therapy-in-the-management-of-head-and-neck-cancer?source=see_link.

100. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol.* 2009 Jul;92(1):4-14.
101. Furness S, Glenny AM, Worthington HV, Pavitt S, Oliver R, Clarkson JE, et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* (9):CD006386.
102. Bernier J, Dometge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2004 May 6;350(19):1945-52.
103. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2004 May 6;350(19):1937-44.
104. Layland MK, Sessions DG, Lenox J. The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope.* 2005 Apr;115(4):629-39.
105. Greenberg JS, El Naggar AK, Mo V, Roberts D, Myers JN. Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer.* 2003 Aug 1;98(3):508-15.
106. Haraf DJ. Management of the clinically negative neck in head and neck cancer. Last literature review version 19.2: Mai 2011 [updated Mai 13, 2010]; Available from: http://www.uptodate.com/contents/management-of-the-clinically-negative-neck-in-head-and-neck-cancer?source=search_result&search=management+neck+clinically+negative&selectedTitle=1~150.
107. Hiddemann W, Bartram CR. *Die Onkologie.* Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.; 2010. p. 824 S.
108. Song S. Definitive radiotherapy for advanced head and neck cancer: Dose and fractionation schedule. Last literature review version 19.2: Mai 2011 [updated Juni 3, 2011]; Available from: <http://www.uptodate.com/contents/definitive-radiotherapy-for-advanced-head-and-neck-cancer-dose-and-fractionation-schedule>.
109. Bernier J. Alteration of radiotherapy fractionation and concurrent chemotherapy: a new frontier in head and neck oncology? *Nat Clin Pract Oncol.* 2005 Jun;2(6):305-14.
110. Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, et al. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Aug 1;48(1):7-16.

111. Ang K. A phase III trial (RTOG 0129) of two radiation-cisplatin regimens for head and neck carcinomas (HNC): Impact of radiation and cisplatin intensity on outcome. *Journal of Clinical Oncology (Meeting Abstracts)* 2010;Vol 28(No 15_suppl (May 20 Supplement)).
112. Bentzen SM, Harari PM, Mehta MP, Tomé WA. *Radiation Oncology Advances*. Boston, MA: Springer Science+Business Media, LLC; 2008.
113. Saha GB. *Radiation Biology. Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine* 2006.
114. Sarkaria J, Bristow R. Overview of Cancer Molecular Radiobiology. *Radiation Oncology Advances*.
115. Choudhury A, Cuddihy A, Bristow RG. Radiation and new molecular agents part I: targeting ATM-ATR checkpoints, DNA repair, and the proteasome. *Semin Radiat Oncol*. 2006 Jan; 16(1):51-8.
116. Diggle CP, Bentley J, Knowles MA, Kiltie AE. Inhibition of double-strand break non-homologous end-joining by cisplatin adducts in human cell extracts. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(8):2531-9.
117. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2825-37.
118. Pruschy M, Rocha S, Zaugg K, Tenzer A, Hess C, Fisher DE, et al. Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Feb 1;49(2):561-7.
119. Nix PA, Greenman J, Cawkwell L, Stafford N. Radioresistant laryngeal cancer: beyond the TNM stage. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2004 Apr;29(2):105-14.
120. Akervall J, Guo X, Qian CN, Schoumans J, Leeser B, Kort E, et al. Genetic and expression profiles of squamous cell carcinoma of the head and neck correlate with cisplatin sensitivity and resistance in cell lines and patients. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8204-13.
121. Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. *Lancet Oncol*. 2008 Mar;9(3):288-96.
122. Allen G, Armstrong E, Modhia F, Ludwig D, Hicklin D, Harari P. Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signaling impairs proliferation of head and neck, lung, prostate and breast cancer cells. *AACR Meeting Abstracts*. 2005 April 1, 2005;2005(1):1190-c-1.
123. Machida H, Matsumoto Y, Shirai M, Kubota N. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, sensitizes human tumour cells to radiation. *Int J Radiat Biol*. 2003 Dec;79(12):973-80.
124. Camphausen K, Scott T, Sproull M, Tofilon PJ. Enhancement of xenograft tumor radiosensitivity by the histone deacetylase inhibitor MS-275 and correlation with histone hyperacetylation. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6066-71.

125. Camphausen K, Burgan W, Cerra M, Oswald KA, Trepel JB, Lee MJ, et al. Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of gammaH2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275. *Cancer Res.* 2004 Jan 1;64(1):316-21.
126. Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol.* 1988;27(2):131-46.
127. Balaban N, Moni J, Shannon M, Dang L, Murphy E, Goldkorn T. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Nov 8;1314(1-2):147-56.
128. Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD, et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene.* 1997 Sep 4;15(10):1191-7.
129. Dent P, Reardon DB, Park JS, Bowers G, Logsdon C, Valerie K, et al. Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Mol Biol Cell.* 1999 Aug;10(8):2493-506.
130. Schmidt-Ullrich RK, Valerie K, Chan W, Wazer DE, Lin PS. Expression of oestrogen receptor and transforming growth factor-alpha in MCF-7 cells after exposure to fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1992 Mar;61(3):405-15.
131. Baselga J, Mendelsohn J, Kim YM, Pandiella A. Autocrine regulation of membrane transforming growth factor-alpha cleavage. *J Biol Chem.* 1996 Feb 9;271(6):3279-84.
132. Bowers G, Reardon D, Hewitt T, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, et al. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene.* 2001 Mar 15;20(11):1388-97.
133. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):489-501.
134. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res.* 1999 Jul 15;59(14):3374-8.
135. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell.* 2004 May;5(5):429-41.
136. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Jun;26(2):225-39.
137. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):38-47.

138. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol.* 2005 Oct;77(1):18-24.
139. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 2000 Mar 15;60(6):1541-5.
140. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* Jun;11(6):393-410.
141. Krause M, Ostermann G, Petersen C, Yaromina A, Hessel F, Harstrick A, et al. Decreased repopulation as well as increased reoxygenation contribute to the improvement in local control after targeting of the EGFR by C225 during fractionated irradiation. *Radiother Oncol.* 2005 Aug;76(2):162-7.
142. Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol.* 2003 Apr;67(1):3-15.
143. Milas L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme inhibitors and radiotherapy: preclinical basis. *Am J Clin Oncol.* 2003 Aug;26(4):S66-9.
144. Kang KB, Wang TT, Woon CT, Cheah ES, Moore XL, Zhu C, et al. Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Mar 1;67(3):888-96.
145. Raju U, Ariga H, Dittmann K, Nakata E, Ang KK, Milas L. Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Oct 1;63(2):520-8.
146. Che SM, Zhang XZ, Hou L, Song TB. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances radiosensitivity of radioresistant esophageal cancer cells by inhibiting AKT activation and inducing apoptosis. *Cancer Invest.* Aug;28(7):679-88.
147. Shin YK, Park JS, Kim HS, Jun HJ, Kim GE, Suh CO, et al. Radiosensitivity enhancement by celecoxib, a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor, via COX-2-dependent cell cycle regulation on human cancer cells expressing differential COX-2 levels. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9501-9.
148. Brieger J, Schroeder P, Gosepath J, Mann WJ. The cyclooxygenase inhibitor flurbiprofen reduces radiation-induced angiogenic growth factor secretion of squamous cell carcinoma cell lines. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1030:37-42.

149. Gore E, Bae K, Langer C, Extermann M, Movsas B, Okunieff P, et al. Phase I/II trial of a COX-2 inhibitor with limited field radiation for intermediate prognosis patients who have locally advanced non-small-cell lung cancer: radiation therapy oncology group 0213. *Clin Lung Cancer*. 2011 Mar;12(2):125-30.
150. Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther*. 2011 May 1;11(9):777-92.
151. Lango MN, Dyer KF, Lui VW, Gooding WE, Gubish C, Siegfried JM, et al. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Mar 6;94(5):375-83.
152. Zhang Q, Bholra NE, Lui VW, Siwak DR, Thomas SM, Gubish CT, et al. Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. *Mol Cancer Ther*. 2007 Apr;6(4):1414-24.
153. Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jun;4(6):470-80.
154. Zhang Q, Thomas SM, Xi S, Smithgall TE, Siegfried JM, Kamens J, et al. SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. *Cancer Res*. 2004 Sep 1;64(17):6166-73.
155. Li C, Iida M, Dunn EF, Wheeler DL. Dasatinib blocks cetuximab- and radiation-induced nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*. Nov;97(2):330-7.
156. Brooks HD, Glisson BS, Bekele BN, Ginsberg LE, El-Naggar A, Culotta KS, et al. Phase 2 study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. May 15;117(10):2112-9.
157. Nobelprize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1982. [20 Jul 2011]; Available from: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1982/.
158. Anggard E, Matschinsky FM, Samuelsson B. Prostaglandins: enzymatic analysis. *Science*. 1969 Jan 31;163(866):479-80.
159. Bergstrom S, Samuelsson B. The prostaglandins. *Endeavour*. 1968 Sep;27(102):109-13.
160. Nugteren DH, Van Dorp DA, Bergstrom S, Hamberg M, Samuelsson B. Absolute configuration of the prostaglandins. *Nature*. 1966 Oct 1;212(5057):38-9.
161. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971 Jun 23;231(25):232-5.
162. Hersh EV, Lally ET, Moore PA. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin*. 2005 Aug;21(8):1217-26.
163. Berenbaum F. COX-3: fact or fancy? *Joint Bone Spine*. 2004 Nov;71(6):451-3.

164. Botting RM. Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. *Pharmacol Rep.* May-Jun;62(3):518-25.
165. Gilroy DW, Colville-Nash PR. New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med (Berl).* 2000;78(3):121-9.
166. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 2004 Nov 8;215(1):1-20.
167. Parente L, Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol.* 2003 Jan 15;65(2):153-9.
168. Stichtenoth DO, Frolich JC. COX-2 and the kidneys. *Curr Pharm Des.* 2000 Nov;6(17):1737-53.
169. Hoffmann C. COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. *Curr Med Chem.* 2000 Nov;7(11):1113-20.
170. Klinke R, Bauer C. *Physiologie.* 5., komplett überarb. Aufl.. ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2005.
171. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004 Sep;56(3):387-437.
172. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 2009 ; [Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2008, Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften, umfassende Dosierungen, für Studium und Praxis].* 17. Aufl.. ed. Pulheim: [Selbstverl.]; 2009.
173. Garcia Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term users of nonsteroidal antiinflammatory drugs: a pooled analysis of published studies and a new population-based study. *Epidemiology.* 2000 Jul;11(4):376-81.
174. Moran EM. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2002;21(2):193-201.
175. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Feb 20;94(4):252-66.
176. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim K, et al. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med.* 2006 Aug 31;355(9):873-84.
177. Baron JA, Sandler RS, Bresalier RS, Quan H, Riddell R, Lanas A, et al. A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas. *Gastroenterology.* 2006 Dec;131(6):1674-82.

178. Midgley RS, McConkey CC, Johnstone EC, Dunn JA, Smith JL, Grumett SA, et al. Phase III randomized trial assessing rofecoxib in the adjuvant setting of colorectal cancer: final results of the VICTOR trial. *J Clin Oncol.* 2010 Oct 20;28(30):4575-80.
179. Goldberg RM, Bertagnolli MM. VICTOR spoiled? *J Clin Oncol.* 2010 Oct 20;28(30):4546-8.
180. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell.* 1996 Nov 29;87(5):803-9.
181. Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, et al. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res.* 2000 Sep 1;60(17):4705-8.
182. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med.* 2002 Mar;8(3):289-93.
183. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998 May 29;93(5):705-16.
184. Pradono P, Tazawa R, Maemondo M, Tanaka M, Usui K, Saijo Y, et al. Gene transfer of thromboxane A(2) synthase and prostaglandin I(2) synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 2002 Jan 1;62(1):63-6.
185. Chiarugi V, Magnelli L, Gallo O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis (review). *Int J Mol Med.* 1998 Dec;2(6):715-9.
186. Seed MP, Brown JR, Freemantle CN, Papworth JL, Colville-Nash PR, Willis D, et al. The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac in 2.5% hyaluronan. *Cancer Res.* 1997 May 1;57(9):1625-9.
187. Lu X, Xie W, Reed D, Bradshaw WS, Simmons DL. Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 15;92(17):7961-5.
188. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995 Nov 3;83(3):493-501.
189. Narko K, Ristimaki A, MacPhee M, Smith E, Haudenschild CC, Hla T. Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):21455-60.
190. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998 Jan 15;58(2):362-6.

191. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 20;95(2):681-6.
192. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 10;97(21):11280-5.
193. Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*. 1996 Dec 13;274(5294):1855-9.
194. Jana NR. NSAIDs and apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2008 May;65(9):1295-301.
195. Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, et al. Purification, Characterization and Selective-Inhibition of Human Prostaglandin-G/H Synthase-1 and Synthase-2 Expressed in the Baculovirus System. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1994 Nov 16;1209(1):130-9.
196. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Medicine*. 1998 May;104(5):413-21.
197. Peskar BM, Kluge S, Peskar BA, Soglowek SM, Brune K. Effects of pure enantiomers of flurbiprofen in comparison to racemic flurbiprofen on eicosanoid release from various rat organs ex vivo. *Prostaglandins*. 1991 Dec;42(6):515-31.
198. Bennett A, Houghton J, Leaper DJ, Stamford IF. Cancer growth, response to treatment and survival time in mice: beneficial effect of the prostaglandin synthesis inhibitor flurbiprofen. *Prostaglandins*. 1979 Feb;17(2):179-91.
199. Mamytbekova A, Rezabek K, Grimova J, Svobodova J. Inhibitory action of flurbiprofen and mopidamole on tumor lung metastasis formation in mice. *Cancer Treat Rep*. 1987 Nov;71(11):1089-90.
200. McCormick DL, Moon RC. Inhibition of mammary carcinogenesis by flurbiprofen, a non-steroidal antiinflammatory agent. *Br J Cancer*. 1983 Dec;48(6):859-61.
201. Mamytbekova A, Rezabek K, Kacerovska H, Grimova J, Svobodova J. Antimetastatic effect of flurbiprofen and other platelet aggregation inhibitors. *Neoplasma*. 1986;33(4):417-21.
202. McCracken JD, Wechter WJ, Liu Y, Chase RL, Kantoci D, Murray ED, Jr., et al. Antiproliferative effects of the enantiomers of flurbiprofen. *J Clin Pharmacol*. 1996 Jun;36(6):540-5.
203. Fosslien E. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. *Ann Clin Lab Sci*. 1998 Mar-Apr;28(2):67-81.
204. Fosslien E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2000 Oct;37(5):431-502.

205. King JG, Jr., Khalili K. Inhibition of human brain tumor cell growth by the anti-inflammatory drug, flurbiprofen. *Oncogene*. 2001 Oct 18;20(47):6864-70.
206. Grosch S, Tegeder I, Schilling K, Maier TJ, Niederberger E, Geisslinger G. Activation of c-Jun-N-terminal-kinase is crucial for the induction of a cell cycle arrest in human colon carcinoma cells caused by flurbiprofen enantiomers. *FASEB J*. 2003 Jul;17(10):1316-8.
207. Krygier S, Djakiew D. The neurotrophin receptor p75NTR is a tumor suppressor in human prostate cancer. *Anticancer Res*. 2001 Nov-Dec;21(6A):3749-55.
208. Krygier S, Djakiew D. Neurotrophin receptor p75(NTR) suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 2002 Mar 1;98(1):1-7.
209. Chapman BS. A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett*. 1995 Oct 30;374(2):216-20.
210. Khwaja F, Allen J, Lynch J, Andrews P, Djakiew D. Ibuprofen inhibits survival of bladder cancer cells by induced expression of the p75NTR tumor suppressor protein. *Cancer Res*. 2004 Sep 1;64(17):6207-13.
211. Quann EJ, Khwaja F, Djakiew D. The p38 MAPK pathway mediates aryl propionic acid induced messenger rna stability of p75 NTR in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2007 Dec 1;67(23):11402-10.
212. Andrews P, Zhao X, Allen J, Li F, Chang M. A comparison of the effectiveness of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives against cancer cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Feb;61(2):203-14.
213. Chi X, Freeman BM, Tong M, Zhao Y, Tai HH. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) is up-regulated by flurbiprofen and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer HT29 cells. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Jul 15;487(2):139-45.
214. Ding Y, Tong M, Liu S, Moscow JA, Tai HH. NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) behaves as a tumor suppressor in lung cancer. *Carcinogenesis*. 2005 Jan;26(1):65-72.
215. Yan M, Rerko RM, Platzer P, Dawson D, Willis J, Tong M, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 14;101(50):17468-73.
216. Myung SJ, Rerko RM, Yan M, Platzer P, Guda K, Dotson A, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 8;103(32):12098-102.
217. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*. 1996 Jan;14(1):61-5.

218. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1996;13:19-50.
219. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:311-23.
220. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000 Jun 15;405(6788):837-46.
221. Graves JD, Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther.* 1999 May-Jun;82(2-3):111-21.
222. Hubbard MJ, Cohen P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci.* 1993 May;18(5):172-7.
223. Ashman K, Villar EL. Phosphoproteomics and cancer research. *Clin Transl Oncol.* 2009 Jun; 11(6):356-62.
224. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics.* 2009 Mar;9(6):1451-68.
225. Piggee C. Phosphoproteomics: miles to go before it's routine. *Anal Chem.* 2009 Apr 1;81(7): 2418-20.
226. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics.* 6. Aufl.. ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2010.
227. Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Oct;76(6):1223-43.
228. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Sep;5(9):699-711.
229. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003 Mar 13;422(6928):198-207.
230. May C, Brosseron F, Chartowski P, Schumbrutzki C, Schoenebeck B, Marcus K. Instruments and methods in proteomics. *Methods Mol Biol.* 2011;696:3-26.
231. Eyrich B, Sickmann A, Zahedi RP. Catch me if you can: mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. *Proteomics.* 2011 Feb;11(4):554-70.
232. Kosako H, Nagano K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Rev Proteomics.* 2011 Feb;8(1): 81-94.
233. Welkoborsky HJ, Jacob R, Riazimand SH, Bernauer HS, Mann WJ. Molecular biologic characteristics of seven new cell lines of squamous cell carcinomas of the head and neck and comparison to fresh tumor tissue. *Oncology.* 2003;65(1):60-71.

234. Riazimand SH, Welkoborsky HJ, Bernauer HS, Jacob R, Mann WJ. Investigations for fine mapping of amplifications in chromosome 3q26.3-28 frequently occurring in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology*. 2002;63(4):385-92.
235. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
236. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Apr;5(4):749-57.
237. Jahn O, Tenzer S, Werner HB. Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol*. 2009 Aug;40(1):55-72.
238. UniProtKB. 14-3-3 protein sigma. [cited 2011 2011-12-31]; Available from: <http://ebi1.uniprot.org/uniprot/P31947>. Accessed: 2011-12-31. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64LISC92m>).
239. Samuel T, Weber HO, Rauch P, Verdoodt B, Eppel JT, McShea A, et al. The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):45201-6.
240. Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):931-43.
241. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*. 1999 Oct 7;401(6753):616-20.
242. Li Z, Dong Z, Myer D, Yip-Schneider M, Liu J, Cui P, et al. Role of 14-3-3sigma in poor prognosis and in radiation and drug resistance of human pancreatic cancers. *BMC Cancer*. 2010;10:598.
243. Chan SY, To KF, Leung SF, Yip WW, Mak MK, Chung GT, et al. 14-3-3sigma expression as a prognostic marker in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep*. 2010 Oct; 24(4):949-55.
244. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*. 1997 Dec;1(1):3-11.
245. Lodygin D, Hermeking H. The role of epigenetic inactivation of 14-3-3sigma in human cancer. *Cell Res*. 2005 Apr;15(4):237-46.
246. Veereshwarayya V, Kumar P, Rosen KM, Mestril R, Querfurth HW. Differential effects of mitochondrial heat shock protein 60 and related molecular chaperones to prevent intracellular beta-amyloid-induced inhibition of complex IV and limit apoptosis. *J Biol Chem*. 2006 Oct 6;281(40):29468-78.
247. Kirchhoff SR, Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation*. 2002 Jun 18;105(24):2899-904.

248. Hwang YJ, Lee SP, Kim SY, Choi YH, Kim MJ, Lee CH, et al. Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer. *Yonsei Med J.* 2009 Jun 30;50(3):399-406.
249. Cappello F, David S, Rappa F, Bucchieri F, Marasa L, Bartolotta TE, et al. The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase. *BMC Cancer.* 2005;5:139.
250. Tsai YP, Yang MH, Huang CH, Chang SY, Chen PM, Liu CJ, et al. Interaction between HSP60 and beta-catenin promotes metastasis. *Carcinogenesis.* 2009 Jun;30(6):1049-57.
251. Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 1999 Dec;21(12):1021-30.
252. Hlubek F, Spaderna S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 2004 Jan 10;108(2):321-6.
253. Baldus SE, Monig SP, Huxel S, Landsberg S, Hanisch FG, Engelmann K, et al. MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 15;10(8):2790-6.
254. Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, et al. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer.* 2004 Sep 15;101(6):1345-56.
255. Imai T, Horiuchi A, Shiozawa T, Osada R, Kikuchi N, Ohira S, et al. Elevated expression of E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenins in metastatic lesions compared with primary epithelial ovarian carcinomas. *Hum Pathol.* 2004 Dec;35(12):1469-76.
256. Abu-Hadid M, Wilkes JD, Elakawi Z, Pendyala L, Perez RP. Relationship between heat shock protein 60 (HSP60) mRNA expression and resistance to platinum analogues in human ovarian and bladder carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 1997 Oct 28;119(1):63-70.
257. Li SL, Ye F, Cai WJ, Hu HD, Hu P, Ren H, et al. Quantitative proteome analysis of multidrug resistance in human ovarian cancer cell line. *J Cell Biochem.* Mar 1;109(4):625-33.
258. Chun JN, Choi B, Lee KW, Lee DJ, Kang DH, Lee JY, et al. Cytosolic Hsp60 is involved in the NF-kappaB-dependent survival of cancer cells via IKK regulation. *PLoS One.* 5(3):e9422.
259. Tsai YP, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of HSP60 expression by c-MYC induces transformation. *FEBS Lett.* 2008 Dec 10;582(29):4083-8.
260. Kim SC, Stice JP, Chen L, Jung JS, Gupta S, Wang Y, et al. Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circ Res.* 2009 Dec 4;105(12):1186-95.
261. Kim YS, Koh JM, Lee YS, Kim BJ, Lee SH, Lee KU, et al. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-regulation of toll-like receptors. *Bone.* 2009 Jul;45(1):68-76.

262. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J*. 1999 Apr 15;18(8):2040-8.
263. Faried A, Sohda M, Nakajima M, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H. Expression of heat-shock protein Hsp60 correlated with the apoptotic index and patient prognosis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004 Dec;40(18):2804-11.
264. Leuret T, Watson RW, Molinie V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, et al. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer*. 2003 Sep 1;98(5):970-7.
265. Chandra D, Choy G, Tang DG. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *J Biol Chem*. 2007 Oct 26;282(43):31289-301.
266. Lin TY, Chang JT, Wang HM, Chan SH, Chiu CC, Lin CY, et al. Proteomics of the radioresistant phenotype in head-and-neck cancer: Gp96 as a novel prediction marker and sensitizing target for radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Sep 1;78(1):246-56.
267. Billack B, Heck DE, Mariano TM, Gardner CR, Sur R, Laskin DL, et al. Induction of cyclooxygenase-2 by heat shock protein 60 in macrophages and endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Oct;283(4):C1267-77.
268. Merendino AM, Bucchieri F, Campanella C, Marciano V, Ribbene A, David S, et al. Hsp60 is actively secreted by human tumor cells. *PLoS One*. 2010;5(2):e9247.
269. Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J*. 2011 Mar 1;434(2):181-8.
270. Ni M, Zhou H, Wey S, Baumeister P, Lee AS. Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. *PLoS One*. 2009;4(8):e6868.
271. Lee HK, Xiang C, Cazacu S, Finniss S, Kazimirsky G, Lemke N, et al. GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. *Neuro Oncol*. 2008 Jun;10(3):236-43.
272. Backer MV, Backer JM, Chinnaiyan P. Targeting the unfolded protein response in cancer therapy. *Methods Enzymol*. 2011;491:37-56.
273. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*. 1999 May 15;13(10):1211-33.
274. Zhang LH, Zhang X. Roles of GRP78 in physiology and cancer. *J Cell Biochem*. 2010 Aug 15;110(6):1299-305.

275. Chiu CC, Lin CY, Lee LY, Chen YJ, Kuo TF, Chang JT, et al. Glucose-regulated protein 78 regulates multiple malignant phenotypes in head and neck cancer and may serve as a molecular target of therapeutic intervention. *Mol Cancer Ther.* 2008 Sep;7(9):2788-97.
276. Lee E, Nichols P, Spicer D, Groshen S, Yu MC, Lee AS. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res.* 2006 Aug 15;66(16):7849-53.
277. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer.* 2004 Dec;4(12):966-77.
278. Moretti L, Cha YI, Niermann KJ, Lu B. Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle.* 2007 Apr 1;6(7):793-8.
279. Roberts HR, Smartt HJ, Greenhough A, Moore AE, Williams AC, Paraskeva C. Colon tumour cells increase PGE2 by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the microenvironmental stress of glucose deprivation. *Carcinogenesis.* 2011 Nov;32(11):1741-7.
280. Portal EBR. CALR_HUMAN (P27797). [cited 2011 2011-12-31]; Available from: http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?P27797@18-417@average. Accessed: 2011-12-31. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64Llns2DC>).
281. UniProtKB. Calreticulin. [cited 2011 2011-12-31]; Available from: <http://ebi4.uniprot.org/uniprot/P27797>. Accessed: 2011-12-31. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64LJGhS1l>).
282. Gene N. CALR calreticulin [Homo sapiens] [cited 2011 2011-12-31]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/811>. Accessed: 2011-12-31. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64LJV8qiY>).
283. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J.* 2009 Mar;24(3):665-83.
284. Alur M, Nguyen MM, Eggener SE, Jiang F, Dadras SS, Stern J, et al. Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis. *Am J Pathol.* 2009 Aug;175(2):882-90.
285. Du XL, Hu H, Lin DC, Xia SH, Shen XM, Zhang Y, et al. Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Med (Berl).* 2007 Aug;85(8):863-75.
286. Du XL, Yang H, Liu SG, Luo ML, Hao JJ, Zhang Y, et al. Calreticulin promotes cell motility and enhances resistance to anoikis through STAT3-CTTN-Akt pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2009 Oct 22;28(42):3714-22.
287. Chen CN, Chang CC, Su TE, Hsu WM, Jeng YM, Ho MC, et al. Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2009 Feb;16(2):524-33.

288. Lwin ZM, Guo C, Salim A, Yip GW, Chew FT, Nan J, et al. Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod Pathol*. 2010 Dec;23(12):1559-66.
289. Jia L, Xu M, Zhen W, Shen X, Zhu Y, Wang W, et al. Novel anti-oxidative role of calreticulin in protecting A549 human type II alveolar epithelial cells against hypoxic injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Jan;294(1):C47-55.
290. Okunaga T, Urata Y, Goto S, Matsuo T, Mizota S, Tsutsumi K, et al. Calreticulin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum, modulates radiosensitivity of human glioblastoma U251MG cells. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8662-71.
291. Ramsamooj P, Notario V, Dritschilo A. Enhanced expression of calreticulin in the nucleus of radioresistant squamous carcinoma cells in response to ionizing radiation. *Cancer Res*. 1995 Jul 15;55(14):3016-21.
292. Chen C, Boylan MT, Evans CA, Whetton AD, Wright EG. Application of two-dimensional difference gel electrophoresis to studying bone marrow macrophages and their in vivo responses to ionizing radiation. *J Proteome Res*. 2005 Jul-Aug;4(4):1371-80.
293. Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2007 Oct;14(10):1848-50.
294. Thiel UJ, Feltens R, Adryan B, Gieringer R, Brochhausen C, Schuon R, et al. Analysis of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF MS. *J Oral Pathol Med*. 2010 May;40(5):369-79.
295. Gene N. EEF1D eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein) [Homo sapiens] [cited 2011 2011-12-31]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1936>. Accessed: 2011-12-31. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64LLo37gg>).
296. Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene*. 2003 May 22;22(21):3307-18.
297. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*. 2005 Mar 31;24(14):2375-85.
298. Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 1991 Jul 12;66(1):107-19.
299. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.

300. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka Y, Tanaka F, Inoue H, et al. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma. *Br J Cancer*. 2004 Jul 19;91(2):282-6.
301. Jung M, Kondratyev AD, Dritschilo A. Elongation factor 1 delta is enhanced following exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*. 1994 May 15;54(10):2541-3.
302. UniProtKB. Nucleophosmin. [cited 2011 2011-31-12]; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06748>. Accessed: 2011-12-31. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64LMCD54f>).
303. Gene N. NPM1 nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) [Homo sapiens] [cited 2011 2011-12-31]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4869>. Accessed: 2011-12-31. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/64LMeop4b>).
304. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul;6(7):493-505.
305. Colombo E, Alcalay M, Pelicci PG. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene*. 2011 Jun 9;30(23):2595-609.
306. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem*. 2000 Aug 11;275(32):24451-7.
307. Wu MH, Chang JH, Chou CC, Yung BY. Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation. *Int J Cancer*. 2002 Jan 20;97(3):297-305.
308. Dalenc F, Drouet J, Ader I, Delmas C, Rochaix P, Favre G, et al. Increased expression of a COOH-truncated nucleophosmin resulting from alternative splicing is associated with cellular resistance to ionizing radiation in HeLa cells. *Int J Cancer*. 2002 Aug 20;100(6):662-8.
309. Wu MH, Chang JH, Yung BY. Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis*. 2002 Jan;23(1):93-100.
310. Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman AR, Ohta T. Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. *Cancer Res*. 2010 Sep 1;70(17):6746-56.
311. Ramsamooj P, Notario V, Dritschilo A. Modification of nucleolar protein B23 after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*. 1995 Aug;143(2):158-64.
312. Lin CY, Tan BC, Liu H, Shih CJ, Chien KY, Lin CL, et al. Dephosphorylation of nucleophosmin by PP1beta facilitates pRB binding and consequent E2F1-dependent DNA repair. *Mol Biol Cell*. 2010 Dec;21(24):4409-17.

313. Yaguchi T, Aida S, Kaul SC, Wadhwa R. Involvement of mortalin in cellular senescence from the perspective of its mitochondrial import, chaperone, and oxidative stress management functions. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Apr;1100:306-11.
314. HSPA9 heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) [Homo sapiens] [database on the Internet] [cited 06/21/11]. Available from: <http://www.webcitation.org/5zbPn8hrz>.
315. Terman A. Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage? *Redox Rep.* 2001;6(1):15-26.
316. Osorio C, Sullivan PM, He DN, Mace BE, Ervin JF, Strittmatter WJ, et al. Mortalin is regulated by APOE in hippocampus of AD patients and by human APOE in TR mice. *Neurobiol Aging.* 2007 Dec;28(12):1853-62.
317. Shi M, Jin J, Wang Y, Beyer RP, Kitsou E, Albin RL, et al. Mortalin: a protein associated with progression of Parkinson disease? *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 Feb;67(2):117-24.
318. Choi J, Forster MJ, McDonald SR, Weintraub ST, Carroll CA, Gracy RW. Proteomic identification of specific oxidized proteins in ApoE-knockout mice: relevance to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2004 May 1;36(9):1155-62.
319. De Mena L, Coto E, Sanchez-Ferrero E, Ribacoba R, Guisasola LM, Salvador C, et al. Mutational screening of the mortalin gene (HSPA9) in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2009 Oct;116(10):1289-93.
320. Burbulla LF, Schelling C, Kato H, Rapaport D, Voitalla D, Schiesling C, et al. Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. *Hum Mol Genet.* Nov 15;19(22):4437-52.
321. Sadekova S, Lehnert S, Chow TY. Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol.* 1997 Dec;72(6):653-60.
322. Lambin P, Marples B, Fertil B, Malaise EP, Joiner MC. Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *Int J Radiat Biol.* 1993 May;63(5):639-50.
323. Joiner MC, Marples B, Johns H. The response of tissues to very low doses per fraction: a reflection of induced repair? *Recent Results Cancer Res.* 1993;130:27-40.
324. Wolff S. Adaptation to ionizing radiation induced by prior exposure to very low doses. *Chin Med J (Engl).* 1994 Jun;107(6):425-30.
325. Ikushima T, Aritomi H, Morisita J. Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat Res.* 1996 Nov 4;358(2):193-8.
326. Hsu WM, Lee H, Juan HF, Shih YY, Wang BJ, Pan CY, et al. Identification of GRP75 as an independent favorable prognostic marker of neuroblastoma by a proteomics analysis. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 1;14(19):6237-45.

327. Kuwabara H, Yoneda M, Hayasaki H, Nakamura T, Mori H. Glucose regulated proteins 78 and 75 bind to the receptor for hyaluronan mediated motility in interphase microtubules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 20;339(3):971-6.
328. Zlobec I, Terracciano L, Tornillo L, Gunthert U, Vuong T, Jass JR, et al. Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer. *Gut*. 2008 Oct;57(10):1413-9.
329. Rein DT, Roehrig K, Schondorf T, Lazar A, Fleisch M, Niederacher D, et al. Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumour progression and metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Mar;129(3):161-4.
330. Hall CL, Turley EA. Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis. *J Neurooncol*. 1995 Dec;26(3):221-9.
331. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36770-8.
332. Maxwell CA, Keats JJ, Belch AR, Pilarski LM, Reiman T. Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity. *Cancer Res*. 2005 Feb 1;65(3):850-60.
333. Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, et al. Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol*. 2009 Jun;34(6):1565-71.
334. Yamano Y, Uzawa K, Shinozuka K, Fushimi K, Ishigami T, Nomura H, et al. Hyaluronan-mediated motility: a target in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2008 May;32(5):1001-9.
335. Schmitt A, Barth TF, Beyer E, Borchert F, Rojewski M, Chen J, et al. The tumor antigens RHAMM and G250/CAIX are expressed in head and neck squamous cell carcinomas and elicit specific CD8+ T cell responses. *Int J Oncol*. 2009 Mar;34(3):629-39.
336. Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Deocaris CC, Pereira-Smith OM, Reddel RR, et al. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2006 Jun 15;118(12):2973-80.
337. Yi X, Luk JM, Lee NP, Peng J, Leng X, Guan XY, et al. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Feb;7(2):315-25.
338. Pilzer D, Saar M, Koya K, Fishelson Z. Mortalin inhibitors sensitize K562 leukemia cells to complement-dependent cytotoxicity. *Int J Cancer*. Mar 15;126(6):1428-35.
339. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1058-66.

-
340. Bohana-Kashtan O, Ziporen L, Donin N, Kraus S, Fishelson Z. Cell signals transduced by complement. *Mol Immunol*. 2004 Jul;41(6-7):583-97.
341. Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Shin ML, Trump BF. Ultrastructural studies of complement mediated cell death: a biological reaction model to plasma membrane injury. *Virchows Arch*. 1994;424(6):677-85.
342. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol*. 2003 Sep;40(2-4):109-23.
343. Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol*. 2005 Nov;27(3):375-87.
344. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Parsa AT. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res*. Nov;8(11):1453-65.
345. Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, Gorter A. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol*. 2004 Mar;25(3):158-64.
346. Wang SY, Weiner G. Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Jun;8(6):759-68.
347. Kaul SC, Aida S, Yaguchi T, Kaur K, Wadhwa R. Activation of wild type p53 function by its mortalin-binding, cytoplasmically localizing carboxyl terminus peptides. *J Biol Chem*. 2005 Nov 25;280(47):39373-9.
348. O'Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat*. 2003 Dec;6(6):313-22.
349. Tweddle DA, Pearson AD, Haber M, Norris MD, Xue C, Flemming C, et al. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2003 Jul 18;197(1-2):93-8.
350. Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan MK, Mitsui Y, Reddel RR, Kaul SC. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Exp Cell Res*. 2002 Apr 1;274(2):246-53.
351. Kaul SC, Reddel RR, Mitsui Y, Wadhwa R. An N-terminal region of mot-2 binds to p53 in vitro. *Neoplasia*. 2001 Mar-Apr;3(2):110-4.
352. Ma Z, Izumi H, Kanai M, Kabuyama Y, Ahn NG, Fukasawa K. Mortalin controls centrosome duplication via modulating centrosomal localization of p53. *Oncogene*. 2006 Aug 31;25(39):5377-90.
353. D'Assoro AB, Lingle WL, Salisbury JL. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene*. 2002 Sep 9;21(40):6146-53.

354. Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett.* 2005 Dec 8;230(1):6-19.
355. Kanai M, Ma Z, Izumi H, Kim SH, Mattison CP, Winey M, et al. Physical and functional interaction between mortalin and Mps1 kinase. *Genes Cells.* 2007 Jun;12(6):797-810.
356. Zhou H, Ye M, Dong J, Han G, Jiang X, Wu R, et al. Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *J Proteome Res.* 2008 Sep;7(9):3957-67.
357. Gronborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M, et al. A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics.* 2002 Jul;1(7):517-27.
358. Pandey A, Fernandez MM, Steen H, Blagoev B, Nielsen MM, Roche S, et al. Identification of a novel immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing molecule, STAM2, by mass spectrometry and its involvement in growth factor and cytokine receptor signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38633-9.
359. Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, Larsen MR. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Apr;7(4):661-71.
360. Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, Domon B, Aebersold R. Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nat Methods.* 2007 Mar;4(3):231-7.
361. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002 May;1(5):376-86.
362. Zhu H, Pan S, Gu S, Bradbury EM, Chen X. Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(22):2115-23.
363. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 1999 Oct;17(10):994-9.
364. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2004 Dec;3(12):1154-69.
365. Ono M, Shitashige M, Honda K, Isobe T, Kuwabara H, Matsuzuki H, et al. Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Jul;5(7):1338-47.
366. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 2002 Aug;12(8):1231-45.

367. Rinner O, Mueller LN, Hubalek M, Muller M, Gstaiger M, Aebersold R. An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks. *Nat Biotechnol.* 2007 Mar;25(3):345-52.
368. Redlich G. Proteom- und Phosphoproteom-Analyse humaner Primärhepatozyten und Lebermikrosomen unter pharmakologischen Aspekten. Online-Ressource.].

8. Anhang

8.1 Effekte der Bestrahlung auf die Phosphoprotein-Expression in den nano-UPLC-MS Versuchen

In der Tab. 8.1 sind diejenigen fünf Phosphoproteine aufgelistet, die nach der Bestrahlung mit 8 Gy in deutlich erhöhter Konzentration gefunden wurden – als Hinweis für eine gesteigerte Proteinexpression durch Bestrahlung – und Tab. 8.2 listet diejenigen zwölf Phosphoproteine auf, die nach der Bestrahlung in verminderter Konzentration vorlagen – als Hinweis für eine reduzierte Expression. Die Ergebnisse wurden zusätzlich gefiltert: Von einem durch Bestrahlung entstandenen Effekt ist dann auszugehen, wenn sich die Veränderung nicht nur in dem Vergleich *Bestrahlung vs. Nullkontrolle* sondern auch in dem Vergleich *kombinierte Behandlung vs. alleinige Flurbiprofenapplikation* zeigt.

Tab. 8.1: Phosphoproteine mit Hinweis auf Steigerung der Expression durch Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen

Name des Proteins	Kurzform	V _{sign.} in 8 Gy vs. Nullkontrolle	V _{sign.} in 200 µM F + 8 Gy vs. 200 µM F
Myosin-9	MYH9_HUMAN	5,48	6,00
14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	3,87	5,13
Transcription intermediary factor 1-beta	TIF1B_HUMAN	4,06	4,19
G-rich sequence factor 1	GRSF1_HUMAN	3,04	3,49
Tropomodulin-3	TMOD3_HUMAN	2,87	3,17

Tab. 8.2: Phosphoproteine mit Hinweis auf Minderung der Expression durch Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen

Name des Proteins	Kurzform	V _{sign.} in 8 Gy vs. Nullkontrolle	V _{sign.} in 200 µM F + 8 Gy vs. 200 µM F
Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	-1,15	-3,32
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	K22E_HUMAN	-1,67	-3,93
Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	-1,54	-4,96
Thioredoxin-related transmembrane protein 1	TXND1_HUMAN	-2,98	-2,83

High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	HMGA1_HUMAN	-4,14	-3,63
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6_HUMAN	-3,85	-3,92
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	AN32B_HUMAN	-1,10	-4,15
Protein DEK	DEK_HUMAN	-4,60	-4,46
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9_HUMAN	-4,54	-4,77
Tight junction protein ZO-1	ZO1_HUMAN	-5,03	-5,01
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	IF4G1_HUMAN	-1,46	-5,01
Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSP72_HUMAN	-7,40	-6,82

8.2 Effekte von Flurbiprofen auf die Phosphoprotein-Expression in den nanoUPLC-MS Versuchen

Analog der Darstellungen in 8.1 sind in den Tabellen 8.3 und 8.4 diejenigen Phosphoproteine aufgelistet, deren Konzentration sich durch die Applikation des Cyclooxygenase-Inhibitors Flurbiprofen deutlich verändert hatte. Auch in diesem Falle wurden die Ergebnisse vorgefiltert: Ein Flurbiprofen-induzierter Effekt liegt dann vor, wenn die Veränderung sowohl im Vergleich *200 µM Flurbiprofenapplikation vs. Nullkontrolle*, als auch im Vergleich *kombinierte Behandlung vs. alleinige Bestrahlung mit 8 Gy* präsent war.

Tab. 8.3: Phosphoproteine mit Hinweis auf Steigerung der Expression durch Flurbiprofenbehandlung in den nanoUPLC-MS Versuchen			
Name des Proteins	Kurzform	V_{sign.} in 200 µM F vs. Nullkontrolle	V_{sign.} in 200 µM F + 8 Gy vs. 8 Gy
Brain acid soluble protein 1	BASP_HUMAN	2,10	3,64
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	3,58	4,27
Protein LYRIC	LYRIC_HUMAN	3,58	3,77
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	ASPH_HUMAN	3,86	4,31
ATP-dependent RNA helicase DDX39	DDX39_HUMAN	4,94	5,32

Tab. 8.4: Proteine mit Hinweis auf Minderung der Expression durch Flurbiprofenbehandlung in den nanoUPLC-MS Versuchen			
Name des Proteins	Kurzform	V _{sign.} in 200 µM F vs. Nullkontrolle	V _{sign.} in 200 µM F + 8 Gy vs. 8 Gy
mRNA turnover protein 4 homolog	MRT4_HUMAN	-2,44	-2,73
Transcriptional activator protein Pur-beta	PURB_HUMAN	-2,85	-2,72
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA_HUMAN	-3,22	-2,54
Septin-2	SEPT2_HUMAN	-3,96	-3,24
Caldesmon	CALD1_HUMAN	-4,47	-4,25
Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	-2,26	-4,44
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	K22E_HUMAN	-2,24	-4,50
Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	-2,04	-5,45

8.3 Zusätzliche Effekte der Flurbiprofenapplikation im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung

Entsprechend der Überlegungen im Abschnitt 4.2.2 wurden auch die Ergebnisse der nanoUPLC-MS Versuche auf Effekte geprüft, die eine zusätzliche Flurbiprofenapplikation verglichen mit der alleinigen Bestrahlung auf das Phosphoproteom der untersuchten Tumorzellen hat. Wie im o.g. Abschnitt wurden auch hier Proteine in die Betrachtung eingeschlossen, die bei zusätzlicher Flurbiprofenapplikation (*kombinierte Behandlung vs. Nullkontrolle*) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (*Bestrahlung mit 8 Gy vs. Nullkontrolle*) eine veränderte Expression aufwiesen.

Hinweise für eine zusätzlich Hochregulierung durch die additional Flurbiprofenapplikation ergaben sich für die in Tab. 8.5 genannten Phosphoproteine.

Tab. 8.5: Phosphoproteine mit Hinweis auf zusätzliche Steigerung der Expression durch kombinierte Behandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen

Name des Proteins	Kurzform	V _{sign.} in 8 Gy vs. Nullkontrolle	V _{sign.} in 200 µM F + 8 Gy vs. Nullkontrolle
Spectrin beta chain, brain 1	SPTB2_HUMAN	5,84	5,91
Myosin-9	MYH9_HUMAN	5,48	6,00
Transcription intermediary factor 1 beta	TIF1B_HUMAN	4,06	4,19
14 3 3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	3,87	5,13
G rich sequence factor 1	GRSF1_HUMAN	3,04	3,49
Tropomodulin-3	TMOD3_HUMAN	2,87	3,17

Hinweise für eine zusätzliche Herabregulierung ergaben sich für die in der Tab. 8.6 genannten Proteine.

Tab. 8.6: Phosphoproteine mit Hinweis auf zusätzliche Verminderung der Expression durch kombinierte Behandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen

Name des Proteins	Kurzform	V _{sign.} in 8 Gy vs. Nullkontrolle	V _{sign.} in 200 µM F + 8 Gy vs. Nullkontrolle
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	AN32B_HUMAN	-1,10	-4,41
Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	-1,15	-5,59
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	IF4G1_HUMAN	-1,46	-5,46
Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	-1,54	-6,99
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	K22E_HUMAN	-1,67	-6,17

Es wurde kein Phosphoprotein ermittelt, das in den Zellen mit kombinierter Behandlung nicht so stark hochreguliert war, wie in den nur bestrahlten Zellen. Jedoch wurden drei Phosphoproteine gefunden, die in den Zellen mit kombinierter Bestrahlung weniger stark herabreguliert waren, als in den bestrahlten Zellen. Sie sind in Tab 8.7 aufgelistet.

Tab. 8.7: Phosphoproteine mit Hinweis auf weniger stark ausgeprägte Minderung der Expression durch kombinierte Behandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung in den nanoUPLC-MS Versuchen

Name des Proteins	Kurzform	$V_{\text{sign.}}$ in 8 Gy vs. Nullkontrolle	$V_{\text{sign.}}$ in 200 μM F + 8 Gy vs. Nullkontrolle
Nucleolar protein 58	NOP5_HUMAN	-1,05	-0,40
Elongation factor 1-beta	EF1B_HUMAN	-1,09	-0,18
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	SNUT1_HUMAN	-5,08	-1,00

Es konnten ein Phosphoproteine ermittelt werden, das durch die additionalen Flurbiprofenapplikation bei der kombinierten Behandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung eine gegensätzliche Regulation erfahren hat. Es handelt sich dabei um das

- ▶ DNA-binding protein A (DBPA_HUMAN),

das durch Bestrahlung herab und durch die kombinierte Behandlung hochreguliert war ($V_{\text{sign.}}$ in 8 Gy vs. Nullkontrolle = -3,39 und $V_{\text{sign.}}$ in 200 μM F + 8 Gy vs. Nullkontrolle = 1,17).

Die Messungen mit der nanoUPLC-MS Methode wurden als Einzelmessungen an den vier Phosphoprotein-Proben einer Experimentalgruppe durchgeführt. Da weder biologische noch technische Replikate untersucht wurden, wurden die Ergebnisse aufgrund der somit fehlenden statistischen Aussagekraft nicht weiter aufgearbeitet.

Danksagung

Abschließend möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Für die Überlassung des Promotionsthemas, die überaus engagierte Betreuung bei der Konzeption dieser Arbeit, die motivierenden und inspirierenden Gespräche, für die kritische fachliche Diskussion, das Korrekturlesen sowie für die Erstellung des ersten Gutachtens gilt mein ganz besonderer Dank [REDACTED]

[REDACTED].
Mein Dank gilt weiterhin [REDACTED] für die vertrauensvolle Überlassung der Laborräume und das zur Verfügung stellen der Materialien.

Ich danke außerdem [REDACTED] für fruchtbare fachliche Diskussionen und für die Erstellung des zweiten Gutachtens.

Dank gilt auch [REDACTED] für ihre außerordentliche Unterstützung beim Erlernen der Grundlagen der Zellkultur und der verwendeten proteinbiochemischen Methoden.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Labors der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz unter der Leitung von [REDACTED] für die Mitbenutzung des MALDI-TOF Massenspektrometers und die Hilfe bei dessen Handhabung sowie bei [REDACTED] aus dem Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz für die Analyse meiner Proben mit der nanoUPLC-MS Methode und die Hilfe bei der Auswertung von deren Ergebnissen.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern des Labors für Tumorbologie der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Lösungsfindung für unvorhersehbare Probleme.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern und Freunden für motivierende Worte, ihr Verständnis für die stellenweise knapp bemessene gemeinsame Zeit und für ihre unermüdliche Unterstützung.

Lebenslauf

ZU MEINER PERSON

Katrin Gellner

geboren am 30. Dez. 1983
in Groß-Umstadt

Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSBILDUNG

Juni 2003

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

STUDIUM DER HUMANMEDIZIN

Mai 2004 bis Mai 2011

Studium der Humanmedizin an der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz und der
Universitätsmedizin Mainz

Mai 2011 bis Dezember 2011

Fertigstellung der Dissertationsschrift

ÄRZTLICHE WEITERBILDUNG

seit Jan 2012

Weiterbildungsassistentin der Klinik und Poliklinik für
Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und
Psychotherapie am Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg, 6. Dezember 2012

Katrin Gellner