

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
des Klinikums der Universität München
Prof. Dr. med. Claus Belka

**Evaluierung von CD44v6 als neue molekulare
Zielstruktur für multimodale Radiotherapie von
Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elisa Vanessa Osterode
aus Deggendorf
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Philipp Baumeister
Priv. Doz. Dr. rer. nat. Markus Moser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2022

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	10
3	TABELLENVERZEICHNIS	12
4	ZUSAMMENFASSUNG	13
5	EINLEITUNG	15
5.1	Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region	15
5.2	Transmembranrezeptor <i>Cluster of Differentiation 44</i> (CD44)	16
5.2.1	CD44 und seine Isoformen	16
5.2.2	Biologie von CD44/CD44v6	17
5.2.3	Funktionsweise von CD44v6 in Tumoren	18
5.2.4	Aktuelle klinische Bedeutung von CD44v6 im HNSCC	21
5.2.5	Wechselwirkungen zwischen CD44v6-Isoformen und der TGF β -Signalkaskade	23
5.3	Zielgerichtete Therapieansätze in der Behandlung des HNSCC	24
5.3.1	Kompetitierende Peptide	25
5.3.2	Aptamere	26
5.3.3	Indirekte pharmakologische Inhibition von CD44v6	26
6	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	28
7	MATERIAL	29
7.1	Hersteller	29
7.2	Zelllinien und Zellkulturmedien	30
7.3	Antikörper	31
7.4	Oligonukleotid-Primer für qRT-PCR-Analysen	32
7.5	Reagenzien und Kits	33
7.6	Einwegmaterialien	34
7.7	Laborgeräte	35
7.8	Software	35
8	METHODEN	36
8.1	Zellkultur	36
8.1.1	Zellkultivierung	36
8.1.2	Langzeitkonservierung	36
8.1.3	Zellzahlbestimmung	37
8.1.4	Bestrahlung von Zellen <i>in vitro</i>	37

8.1.5	Bestimmung der Verdopplungszeit	37
8.1.6	Viabilitätsmessung	38
8.1.7	Koloniebildungsassay	38
8.2	Durchflusszytometrie	39
8.2.1	Analyse von Zelloberflächenproteinen	39
8.2.2	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität	39
8.2.3	Apoptotische DNA-Fragmentierung und Zellzyklusanalyse	41
8.2.4	Titration von Cy3-markierten Aptameren	42
8.3	Molekularbiologische Methoden	42
8.3.1	RNA-Isolation und Quantifizierung	42
8.3.2	Reverse Transkription	43
8.3.3	Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	43
8.4	Festphasenbindungsassay	44
8.5	Statistische Analysen	44
9	ERGEBNISSE	46
9.1	Humane HNSCC-Zelllinien unterscheiden sich in ihrer Expression von CD44v6 und dessen Co-Rezeptoren	46
9.2	Evaluierung von CD44v6-kompetitierenden Peptiden im Rahmen einer kombinierten Radiochemotherapie in HNSCC-Zellen	48
9.2.1	CD44v6-kompetitierende Peptide haben keinen Einfluss auf die Viabilität von HNSCC-Zellen nach Bestrahlung	48
9.2.2	Proliferation und klonogenes Überleben werden nicht durch CD44v6-kompetitierende Peptide beeinflusst	51
9.2.3	CD44v6-kompetitierende Peptide haben keinen Einfluss auf den Zellzyklus CD44v6-überexprimierender HNSCC-Zellen	52
9.2.4	Strahlungsinduzierte Apoptose und – Seneszenz werden nicht durch CD44v6-kompetitierende Peptide beeinflusst	53
9.3	Etablierung spezifischer CD44v6-Aptamere	55
9.4	CD44v6-Genexpression kann indirekt durch Modulation des TGFβ-Signalwegs reguliert werden	58
9.4.1	TGF β -Rezeptorstatus in HNSCC-Zelllinien	59
9.4.2	Stimulation mit rekombinantem TGF β 1 erhöht die Oberflächenproteinexpression von CD44v6, aber wirkt radiosensibilisierend in HNSCC-Zellen	61
9.4.3	Inhibition des TGF β -RI reduziert die Oberflächenproteinexpressionen von CD44 und CD44v6, aber wirkt radioprotektiv in HNSCC-Zellen	63
10	DISKUSSION	65
10.1	Keine radiosensibilisierende Wirkung von CD44v6-kompetitierenden Peptiden auf CD44v6-überexprimierende HNSCC-Zellen in vitro	66
10.1.1	Mögliche Ursache für die fehlende Radiosensibilisierung durch CD44v6-kompetitierende Peptide: Wirkmechanismus des CD44v6-spezifischen 14mer-Peptids in HNSCC-Zellen	67
10.1.2	Mögliche Ursachen für die fehlende Radiosensibilisierung durch CD44v6-kompetitierende Peptide: Spezifität und Stabilität des CD44v6-spezifischen 14mer-Peptids	68
10.1.3	Mögliche Ursachen für die fehlende Radiosensibilisierung durch CD44v6-kompetitierende Peptide: Re-Evaluierung des gewählten Modellsystems	70
10.1.4	Mögliche Ursachen für die fehlende Radiosensibilisierung durch CD44v6-kompetitierende Peptide: Kompensatorische Mechanismen gegenüber der Wirkung CD44v6-kompetitierender Peptide in HNSCC-Zellen	73

10.2 CD44v6-spezifische Aptamere als zielgerichtete Therapiestrategie im HNSCC	74
Die Optimierung der CD44v6-spezifischen Aptamere ist essentiell für den Erhalt zukünftiger Behandlungserfolge	75
10.3 Auf Umwegen zu CD44v6 – die TGFβ-Signalkaskade im HNSCC	77
Nachweis einer funktionellen Interaktion zwischen CD44v6-abhängiger – und TGF β - abhängiger Signaltransduktion bei adversen Antwortverhalten auf strahlungsinduzierte DNA-Schädigung	77
10.4 Von der Zielstruktur zur zielgerichteten Therapie – die zukünftige Bedeutung von CD44v6 für neuartige Therapieansätze des HNSCC	80
11 LITERATURVERZEICHNIS	83
12 ANHANG	93
12.1 Übersicht projektexterner Daten	93
12.2 Publikationsliste	93
13 LEBENS LAUF	95
14 DANKSAGUNG	97
15 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	98

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
aCGH	<i>Array Comparative Genome Hybridization</i>
AS	Aminosäure
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Teleangiectasia and Rad3</i>
BPE	<i>Bovine Pituitary Extract</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
c	centi (10^{-2})
C12-FDG	Dodecanoylaminofluorescein Di- β -D-Galactopyranoside
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CD44v6	<i>Cluster of Differentiation 44 Variant 6</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
CHEK1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
C _t	<i>Cycle Treshold</i>
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4
Cy3	Cyanin 3
D	Dalton
DDR	<i>DNA Damage Repair</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
ERM	Ezrin-Radizin-Moesin
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>

FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HMGU	Helmholtz Zentrum für Gesundheit
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HPV	Humanes Papillomavirus
k	kilo (10 ³)
KKG	Klinische Kooperationsgruppe
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
m	milli (10 ⁻³)
M	molar (mol/L)
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP9	Matrixmetalloproteinase 9
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
n	nano (10 ⁻⁹)
OP	Operation
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>
p	pico (10 ⁻¹²)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	<i>Principal Component</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PE	Plattierungseffizienz
PE	Phycoerythrin
PET	Positronenemissionstomografie

PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositol-3 Kinase
qRT-PCR	<i>quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RWH	Arginin-Tryptophan-Histidin
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i>
SELEX	<i>Selected Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SF2	<i>Survival Fraction 2</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TGF β -RI	TGF β -Rezeptor I
TGF β -RII	TGF β -Rezeptor II
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
TPM	<i>Transcripts per million</i>
U	Units
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
β -Gal	β -Galaktosidase
δ -ALAS	δ -Aminolävulinatsynthase
μ	mikro (10^{-6})

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von CD44s und seinen Isoformen (adaptiert aus [16]).....	17
Abbildung 2: Wechselwirkungen der N- und C-terminalen Domänen von CD44/CD44v6 (adaptiert aus [16]).	18
Abbildung 3: Intrinsische Radioresistenzen humaner HNSCC-Zelllinien nach Radiotherapie (adaptiert aus [32])..	20
Abbildung 4: Die CD44v6-Oberflächenproteinexpression korreliert mit dem Grad intrinsischer Radioresistenz in HNSCC-Zellen.	20
Abbildung 5: Knockdown der CD44v6-Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi) resultiert in erhöhter Radiosensitivität und verstärkter Seneszenzinduktion nach Bestrahlung.....	21
Abbildung 6: Erhöhte Expressionswerte von CD44v6 sind mit signifikant reduziertem Gesamtüberleben assoziiert in der TCGA HNSCC-Kohorte und einer retrospektiven in-house HNSCC-Kohorte (LMU-KKG HNSCC) nach postoperativer Radio(chemo)therapie.	23
Abbildung 7: Gatingstrategie zur Detektion seneszenten Zellen.	40
Abbildung 8: FACS-Histogramm bei 660 nm Wellenlänge zur Darstellung apoptotischer SubG1-Zellen.	41
Abbildung 9: FACS-Histogramm bei 575 nm Wellenlänge zur Darstellung der Zellzyklusverteilung..	41
Abbildung 10: Oberflächenproteinexpression von CD44v6, CD44, EGFR und c-Met in einem repräsentativen Panel humaner HNSCC-Zelllinien.....	46
Abbildung 11: CD44v6-kompetitierende Peptide beeinflussen die Viabilität der HNSCC-Zelllinien UPCI-SCC-040 und Cal33 nach Bestrahlung nicht.	51
Abbildung 12: Proliferation und klonogenes Überleben von UPCI-SCC-040-Zellen nach Bestrahlung werden durch das CD44v6-kompetitierende Peptid nicht beeinflusst.....	52
Abbildung 13: Zellzyklusprogression von UPCI-SCC-040-Zellen nach Bestrahlung in Gegenwart und Abwesenheit CD44v6-kompetitierender Peptide.	53
Abbildung 14: Induktion von Apoptose und Seneszenz in UPCI-SCC-040-Zellen nach Bestrahlung und Behandlung mit CD44v6-kompetitierendem Peptid.....	55
Abbildung 15: Bindungseigenschaften von Aptameren, die mittels SELEX anhand des CD44v6-14mer-Peptids generiert worden waren.....	57

Abbildung 16: Bindungseigenschaften von Aptameren, die anhand des CD44v6-14mer-Peptids (oben) oder des v6-Vollängenpeptids generiert worden waren..	58
Abbildung 17: Analyse der mRNA-Expression von TGF β 1, TGF β RI, TGF β RII, c-Met, EGFR, CD44, CD44v6 und CD44v3-10 in humanen HNSCC-Zellen und Korrelation dieser Expressionswerte.	60
Abbildung 18: Oberflächenproteinexpressionen von TGF β RI und TGF β RII in HNSCC-Zelllinien und deren Korrelation mit den Expressionswerten von CD44, CD44v6, EGFR und c-Met.	61
Abbildung 19: Die Behandlung mit TGF β 1 erhöht zwar die Oberflächenproteinexpression von CD44v6, führt jedoch zur Radiosensibilisierung von UPCI-SCC-040-Zellen.	63
Abbildung 20: Die pharmakologische Inhibition von TGF β 1-RI reduziert die Oberflächenexpression von CD44v6 und CD44, führt aber zur Radioprotektion in UPCI-SCC-040-Zellen.	64

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Hersteller aller verwendeter Produkte	30
Tabelle 2: Liste aller verwendeter HNSCC-Zelllinien.....	31
Tabelle 3: Liste aller verwendeter Zellkulturmedien und Supplemente	31
Tabelle 4: Liste aller verwendeten Primärantikörper und der Isotypenkontrollen	32
Tabelle 5: Liste aller verwendeten Sekundärantikörper.....	32
Tabelle 6: Sequenzen der für quantitative Realtime PCR (qRT-PCR) verwendeten Primer.....	33
Tabelle 7: Liste aller verwendeten Reagenzien	33
Tabelle 8: Liste aller verwendeten Peptide.....	34
Tabelle 9: Liste aller verwendeten Kits	34
Tabelle 10: Liste aller Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 11: Liste aller verwendeten Laborgeräte.....	35
Tabelle 12: Liste aller verwendeten Softwares	35
Tabelle 13: PCR-Programm für die reverse Transkription.....	43
Tabelle 14: PCR-Programm für die quantitative Realtime PCR	43
Tabelle 15: Bewertung von Korrelationskoeffizienten nach Pearson.....	45

4 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCCs) werden häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und zeichnen sich daher oft durch eine negative Prognose aus. Trotz der bestehenden Behandlungsmodalitäten in Form von Radio(chemo)therapie und chirurgischer Resektion – falls möglich – liegt die 5-Jahres-überlebensrate von Patient*innen mit lokal fortgeschrittenem HNSCC bei weniger als 50 %. Das Therapieversagen ist oft die Konsequenz einer hohen, intrinsischen Therapieresistenz von HNSCC-Zellen. In diesem Zusammenhang scheint der Oberflächenrezeptor *Cluster of Differentiation 44 (CD44)* und insbesondere dessen Spleißvarianten mit variablem Exon v6 (CD44v6) eine signifikante Rolle zu spielen, da dieser multivalent ist und in zahlreiche tumorwachstumsstimulierende und therapieresistenzvermittelnde Signalwege eingreift.

In den Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte in einer LMU-intern behandelten Kohorte von HNSCC-Patient*innen, welche mit adjuvanter Radiochemotherapie behandelt worden waren, eine direkte Korrelation von erhöhter Expression der CD44-Spleißvarianten 6 (CD44v6) und verkürztem Gesamtüberleben dargestellt werden. Parallel konnte in einem Panel von HNSCC-Zelllinien eine direkte Korrelation zwischen dem Expressionswert von CD44v6 und intrinsischer Resistenz gegenüber Strahlentherapie (Radioresistenz) dargestellt und eine Radiosensibilisierung von HNSCC-Zellen durch Abschalten der CD44v6-Expression mittels RNA-Interferenz erreicht werden. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass CD44v6 einen geeigneten Kandidaten für eine zielgerichtete, therapeutische Intervention im HNSCC in Kombination mit Bestrahlung darstellt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, gegen CD44v6-Isoforme gerichtete, therapeutische Ansätze in Kombination mit Bestrahlung an einem Panel humaner HNSCC-Modellzelllinien *in vitro* zu evaluieren. Dabei wurden verschiedene Therapiekonzepte verfolgt – in einem ersten Ansatz wurde ein CD44v6-kompetitierendes Peptid verwendet, welches spezifisch die Wechselwirkung von CD44v6 mit Co-Rezeptoren (insbesondere mit c-Met) an der Zelloberfläche verhindern und dadurch die Funktion tumorwachstumsfördernder Signalwege unterdrücken sollte. In einem zweiten Ansatz wurden synthetisierte RNA-Moleküle (sogenannte Aptamere), welche aufgrund ihrer spezifischen Bindung an den extrazellulären Bereich von CD44v6 eine weitestgehend tumorzellspezifische Verabreichung von radiosensibilisierenden Adjuvantien, im vorliegenden Fall

5-Fluorouracil (5-FU) ermöglichen sollten, untersucht. Schließlich sollten in einem dritten Ansatz indirekt CD44v6-Spleißvarianten durch die pharmakologische Inhibition des Rezeptors I des *Transforming Growth Factor β* (TGF β -RI) adressiert werden. Alle drei Ansätze wurden auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Strahlenantwort von HNSCC-Zellen untersucht. Es konnte bislang im Rahmen dieser Experimente für keinen der untersuchten Endpunkte (Viabilität, Proliferation, Zellzyklus, klonogenes Überleben, Apoptose, Seneszenz) ein additiver – oder synergistischer Effekt zwischen ionisierender Strahlung und CD44v6-Inhibition nachgewiesen werden. Eine funktionelle Charakterisierung der verschiedenen CD44v-Transkripte könnte aber für die Regulation der Strahlenantwort relevant sein. Da die Wirksamkeit der verwendeten Therapiemodalitäten (Peptide, Aptamere) bereits in Studien belegt wurde, könnte die molekulare Intervention in andere variable Regionen von CD44 zum gewünschten radiosensibilisierenden Effekt führen und dem Mangel an zielgerichteten multimodalen Radiotherapien des HNSCC entgegenwirken.

5 Einleitung

5.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, HNSCCs) stellen mit 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die sechst häufigste Tumorentität dar [1]. Sie entstehen in der Regel aus mukösen Epithelzellen der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx oder des Larynx. Obwohl HNSCCs als eine Gesamt-Tumorentität zusammengefasst werden, stellen sie, bedingt durch ihre unterschiedlichen Ursprungsorte, Ätiologien und molekulargenetischen Alterationen eine extrem heterogene Entität innerhalb der Tumorerkrankungen dar [2]. Als Hauptrisikofaktoren gelten neben Infektionen mit humanen Papillomaviren (HPV) der Hochrisiko-Kategorie vor allem Nikotin- und Alkoholabusus [3], [4].

Die Therapie von HNSCCs gestaltet sich je nach Lokalisierung und Tumorstadium unterschiedlich komplex. Dabei stehen Chirurgie, Radiatio sowie medikamentöse Therapiemöglichkeiten (Chemotherapien, EGFR-Inhibitoren, Immuntherapien) zur Verfügung. Die Erhaltung der Lebensqualität sowie der Funktionserhaltung gilt als oberste Priorität [5].

In frühen Stadien (Stadium I-II) werden chirurgische Resektionen und Strahlentherapie in kurativer Absicht angewendet, wobei die Operation als die bevorzugte Therapieform gilt. Nach der Resektion wird in der Regel innerhalb von 6 Wochen eine adjuvante Strahlentherapie durchgeführt [6], [7]. In lokal fortgeschrittenen Stadien (Stadium III-IV) werden hingegen zumeist multimodale Therapiekonzepte angewandt, wobei neben der Chirurgie (sofern möglich) postoperative Radiotherapie und bei Vorliegen von Risikofaktoren wie beispielsweise befallenen Resektionsrändern (R+) oder extrakapsulärer Lymphknotenausbreitung zusätzlich eine Chemotherapie indiziert ist. Bei alleiniger (primärer) Radiotherapie wird die hyperfraktionierte, akzelerierte Radiotherapie (2 x 1,25 Gy/d, Gesamtdosis 75 Gy) bevorzugt eingesetzt. Bei einer Radiochemotherapie, gleichermaßen ob in primärer oder adjuvanter Behandlungssituation, gilt hingegen die normfraktionierte Radiotherapie als Standard (5 Fraktionen/Woche, 2 Gy/Fraktion, 35 Fraktionen) [7]. Im palliativen Setting

schließlich gilt die Chemo- und insbesondere die Immuntherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren als Erstlinientherapie [8].

Trotz dieser zuweilen aggressiven Behandlungsregimes beträgt die 5-Jahresüberlebensrate beim lokal fortgeschrittenen HNSCC gegenwärtig weniger als 50 % [9]. Als Hauptursache dafür ist neben der Entwicklung von Fernmetastasen und Zweittumoren vor allem die mangelnde lokale Kontrolle des HNSCCs zu nennen [10], [11]. Das damit einhergehende Therapieversagen wird häufig durch einen hohen Grad an intrinsischer Resistenz gegenüber strahlungsinduzierter DNA-Schädigung verursacht, welches ein Charakteristikum des HNSCC darstellt [12]. Gegenwärtig gibt es neben dem HPV-Status keine etablierten molekularen Marker, mit denen sich Krankheitsprogression und Therapieansprechen im HNSCC mit Sicherheit vorhersagen lassen, weshalb ein großer Bedarf besteht, die Mechanismen der Tumorgenese und der Therapieresistenzbildung von HNSCC-Tumoren aufzuschlüsseln.

5.2 Transmembranrezeptor *Cluster of Differentiation 44* (CD44)

5.2.1 CD44 und seine Isoformen

Der Transmembranrezeptor *Cluster of Differentiation 44* (CD44) gehört zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle, die strukturelle Funktionen zum Erhalt der Gewebeintegrität, die Vermittlung von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakten sowie signaltransduzierende Funktionen übernehmen; er stellt ein Glykoprotein dar [13]. CD44 kommt in einer Vielzahl von Expressionsformen (sogenannter Isoformen) vor, die alle auf einem einzigen Genlocus kodiert werden. Dieser befindet sich beim Menschen auf Chromosom 11p13 und besteht aus insgesamt 20 Exons, wobei lediglich 10 dieser Exons in allen CD44-Isoformen vorkommen [14]. Die Standardisoform von CD44 (CD44s) umfasst insgesamt sieben extrazelluläre Domänen (S1 – S7), die von den Exons 1 – 5 sowie 16 und 17 kodiert werden (Abbildung 1), eine Transmembrandomäne (S8), die von Exon 18 kodiert wird, und eine zytoplasmatische Domäne (S9 – S10), die von den Exons 19 und 20 kodiert wird. Durch alternatives Spleißen der variablen Region von CD44 (V1 – V10), die durch die Exons 6 – 15 kodiert wird, im Bereich der sogenannten *Stalk* Domäne (S5 - S6) entsteht eine Vielzahl von Isoformen, zu denen unter anderem alle Isoformen CD44 Variante 6 (CD44v6) zählen. CD44v6 ist somit kein einzelnes

Protein, sondern eine heterogene Gruppe von Transmembranrezeptoren, die zwar alle ein Exon v6 exprimieren, aber ansonsten in der Zusammensetzung der variablen Region differieren. Für diese und mehrere ähnliche Spleißvarianten (beispielsweise CD44v3) konnte gezeigt werden, dass diese mit massiven Veränderungen der räumlichen Konformation des Gesamtproteins einhergehen, woraus sich zusätzliche Bindestellen für Zytokine und Wachstumsfaktoren wie den Hepatozytenwachstumsfaktor (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF) ergeben, was die biologische – und somit auch die tumorfördernde Aktivität von CD44 beeinflusst [15]. Darüber hinaus wird die Heterogenität von CD44 noch durch verschiedenartige posttranslationale Modifikationen (beispielsweise Glykosylierungen) verstärkt [13].

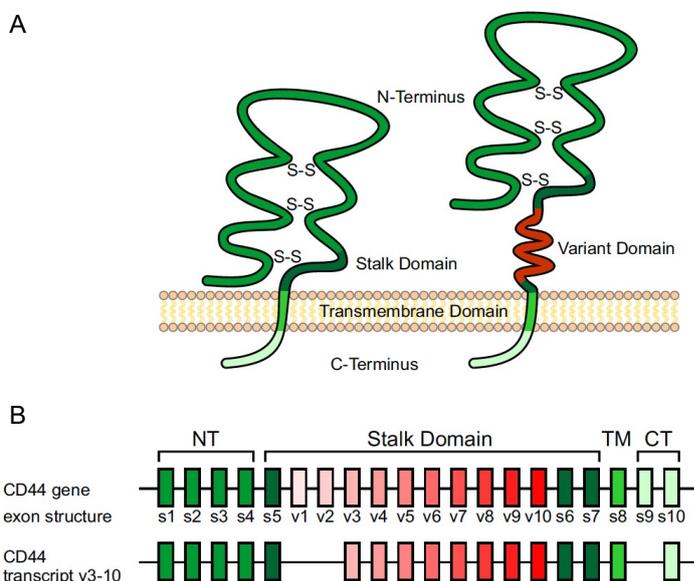


Abbildung 1: Struktur von CD44s und seinen Isoformen (adaptiert aus [16]).

A: Darstellung der Domänenstruktur von CD44 mit Standardisoform CD44s (links) und Variantenisoform CD44v (rechts). Das CD44-Protein besteht aus einer extrazellulären *Link* Domäne, einer *Stalk-like* Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. CD44-Varianten wie CD44v3 oder CD44v6 bestehen neben dem konstanten Teil zusätzlich aus einem variablen Teil, der in die *Stalk-like* Domäne (S5 – S6) eingespleißt wird. **B:** Die CD44-mRNA beinhaltet insgesamt 10 konstante Exons (S1 – S5, S6 – S10; grün dargestellt) sowie mehrere variable Exons (V1 – V10; rot dargestellt), die je nach Isoform eingespleißt werden. Durch das Spleißen von CD44 entsteht eine Vielzahl strukturell und funktionell verschiedener Spleißvarianten, die in unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert werden. CD44v6 umfasst alle Transkripte, die das Exon v6 enthalten wie z.B. die Keratinozyten-Isoform CD44v3-10.

5.2.2 Biologie von CD44/CD44v6

Das adhäsionsvermittelnde Oberflächenprotein CD44 bindet an Hyaluronsäure und reguliert dadurch sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Adhäsion [17]. Darüber hinaus ermöglichen verschiedene posttranslationale Modifikationen auch Wechselwirkungen mit Kollagen, Fibronectin sowie Laminin [17]. Daneben konnten für CD44 Funktionen in der Zellproliferation, der Differenzierung, der Zellmigration und des Überlebens von Zellen (zum Beispiel nach Bestrahlung) identifiziert werden [14], [17]. Des Weiteren vermittelt die Überexpression von CD44 verschiedene Stammzeleigenschaften und

beeinflusst dadurch pro-tumorale Prozesse, wie Tumorprogression und Therapieresistenz sowie Metastasierung [13], [18], [19]. Derartige Funktionen von CD44 beruhen zumeist auf physikalischen Wechselwirkungen der extrazellulären Domäne von CD44 mit Komponenten der extrazellulären Matrix, wobei CD44(v) dabei eine Funktion als Co-Rezeptor einnimmt, mit dessen Hilfe die Signale anderer Zelloberflächenrezeptoren effektiver in die Zelle weitergeleitet werden [20], [21]. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung verschiedener Rezeptortyrosinkinasen (RTKs; wie beispielsweise c-Met), G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs; wie beispielsweise des *C-X-C Chemokine Receptors Type 4* (CXCR4)) oder des *Transforming Growth Factor β -Receptors I* (TGF β -RI) durch CD44(v) maßgeblich beeinflusst werden [17], [22], [23], [24].

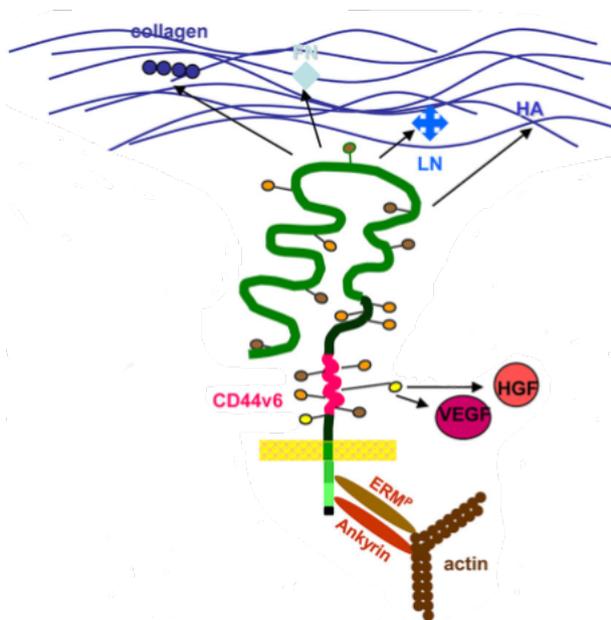


Abbildung 2: Wechselwirkungen der N- und C-terminalen Domänen von CD44/CD44v6 (adaptiert aus [16]). Der N-Terminus von CD44 wechselwirkt mit Komponenten der extrazellulären Matrix, während der C-Terminus mit dem Zytoskelett (z.B. mit ERM, Ankyrin, Aktin) interagiert. Durch zusätzliche Bindestellen kann die Variante 6 von CD44 (CD44v6) mit verschiedenen anderen Transmembranrezeptoren wie beispielsweise EGFR, c-Met oder VEGFR-2 interagieren, dadurch deren Aktivierung und nachfolgende Signalkaskade modulieren und damit eine ungehemmte Tumorzellwachstum/-proliferation aufrechterhalten.

5.2.3 Funktionsweise von CD44v6 in Tumoren

Für die Überexpression der Variante 6 von CD44 (CD44v6) ist seit langem bekannt, dass diese mit verstärkter Tumorprogression und Metastasierung und damit mit verschlechterter klinischer Prognose einhergeht [14]; die molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unverstanden. In vitro Daten zeigten, dass ein CD44v6-Knockdown in Prostatakarzinomzelllinien sich gleichermaßen auf die Zellproliferation, die Zelladhäsion, die Invasivität sowie auf die Therapieresistenz auswirkt [25]. An der Regulation dieser Vorgänge ist ein Prozess beteiligt, der als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird. Die EMT wird durch pro-tumorale Signaltransduktionswege, im Fall des Prostatakarzinoms vor allem durch den

Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K)/Akt/*mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) – sowie den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert [25]. Durch die Stabilisierung und Translokation von β -Catenin in den Zellkern wird zunächst die Expression EMT-assoziiierter Gene induziert. Zu diesen Genen zählen unter anderem auch alle CD44v6-Transkripte [26]. Nach dessen Expression und Rekrutierung an die Zelloberfläche wird dann durch Wechselwirkung von CD44v6-Isoformen mit Hyaluronsäure die Expression von Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9) induziert, die nach ihrer Rekrutierung an die Zelloberfläche zu latenter Aktivierung des TGF β /SMAD-Signalwegs führt. Dieser Signalweg wiederum wird gleichermaßen zur Initiierung der EMT wie zur Stabilisierung von β -Catenin benötigt, womit es zu einer persistierenden Aktivierung in Form eines positiven Feedback-Loops kommt [14], [26]. Ein weitgehend analoger Mechanismus konnte *in vitro* in *squamösen Karzinomzellen* (SCCs) des Oropharynx dargestellt werden, wobei CD44v6 hier den PI3K/Akt/GSK3 β -Signalweg aktiviert [27]. Zudem konnte die Rolle von CD44v-Transkripten bei der Erhöhung antioxidativer Kapazitäten durch vermehrte Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) gezeigt werden. Dieser Mechanismus wird durch Hochregulation von Glutathion (GSH) sowie der Interaktion der Untereinheit xCT des Cystin-Glutamat Transporters vermittelt. Dadurch wird die Cystinaufnahme erhöht, die wiederum der GSH-Synthese und somit der Neutralisierung oxidativen Stresses dient. Dieser Mechanismus scheint bei der Radiotherapieresistenz von entscheidender Bedeutung, da durch ionisierende Strahlung ROS entstehen, die u.a. Schäden an der DNA verursachen oder Seneszenz vermitteln [28], [29]. In diesem Zusammenhang ist auch die Rolle von CD44v6 bei der Regulation der Ferroptose zu nennen, die bei Akkumulation von ROS induziert wird. Insbesondere CD44v6-exprimierende Stammzellen, die sehr therapieresistent sind, können so spezifisch eliminiert werden [30], [31].

In Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HNSCC-Zellen, die sich durch hohe Expression von CD44v6-Transkripten auszeichneten, auch erhöhte Werte an intrinsischer Radioresistenz aufwiesen (Schötz et al., unveröffentlichte Daten). Dabei wurde in einem Panel von insgesamt acht HNSCC-Linien jeweils die intrinsische Radioresistenz dieser Zelllinien mittels Klonogenitätsassays und anschließender Hauptkomponentenanalyse ermittelt (Abbildung 3) und mit der Expression von CD44v6 korreliert (Abbildung 4A, B). Dabei konnte eine signifikante, positive Korrelation zwischen der Oberflächenproteinexpression von CD44v6 und dem klonogenem Überleben von HNSCC-Zelllinien nach einer

Bestrahlungsdosis von 2 Gy (SF2) festgestellt werden (Abbildung 4B), während für die Expression von Gesamt-CD44 keine Korrelation gefunden werden konnte. In weiterführenden Experimenten konnte bei Verwendung CD44v6-spezifischer *small interfering RNAs* (siRNAs) eine signifikante Sensibilisierung radioresistenter, CD44v6-überexprimierender HNSCC-Zellen gegenüber Bestrahlung (Abbildung 4C) bei massiv erhöhter Induktion von zellulärer Seneszenz nach Bestrahlung erreicht werden (Abbildung 5).

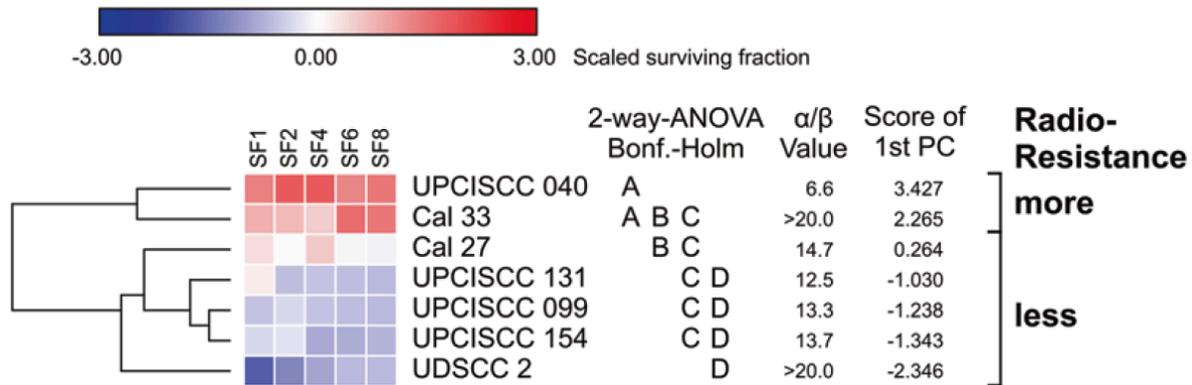


Abbildung 3: Intrinsische Radioresistenzen humaner HNSCC-Zelllinien nach Radiotherapie (adaptiert aus [32]). Hierarchisches Clustering von z-transformierten Klonogenitätsdaten von 7 HNSCC-Zelllinien ohne Darstellung der Normalgewebeskontrolle OKF6. Abbildung der Alpha/Beta-Werte und Werte der 1. Hauptkomponente der Hauptkomponentenanalyse. Großbuchstaben zeigen Ergebnisse der Gruppierung, die durch 2-way-ANOVA erhalten wurden mit Vergleich der Mittelwerte und Bonferroni-Holm-Korrektur. Zelllinien, die keinen gleichen Buchstaben aufzeigen, sind statistisch nicht signifikant.

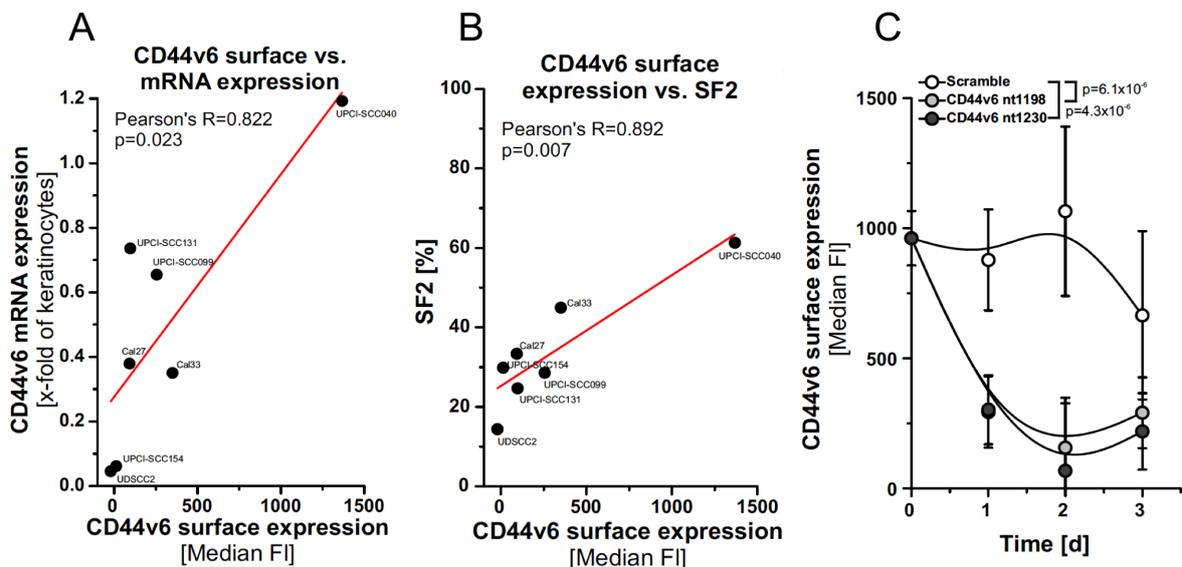


Abbildung 4: Die CD44v6-Oberflächenproteinexpression korreliert mit dem Grad intrinsischer Radioresistenz in HNSCC-Zellen. **A:** Pearson's Korrelationsanalyse der mittels Durchflusszytometrie gemessenen CD44v6-Oberflächenproteinexpression mit der CD44v6-mRNA-Expression in humanen HNSCC-Zelllinien. Dargestellt sind die x-fachen CD44v6-mRNA-Expressionswerte im Verhältnis zur CD44v6-mRNA-Expression in Keratinozyten und die Mediane der CD44v6-Oberflächenexpression. **B:** Pearson's Korrelationsanalyse der CD44v6-Oberflächenproteinexpression mit dem klonogenem Überleben nach Bestrahlung mit 2 Gy (*Survival Fraction 2*, SF2). Dargestellt sind die Mediane der CD44v6-Oberflächenexpression und das prozentuale klonogene Überleben. **C:** Durchflusszytometrische Bestimmung der CD44v6-Proteinexpression in UPCI-SCC-040-Zellen nach

der Transfektion mit CD44v6-spezifischen siRNAs (nt1198, nt1230; jeweils 50 nM) oder Kontroll- („scramble“) siRNAs. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Berechnung der p-Werte mittels 2-way-ANOVA.

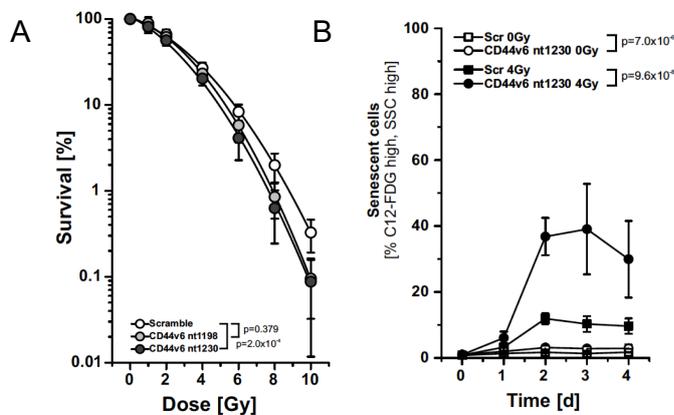


Abbildung 5: Knockdown der CD44v6-Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi) resultiert in erhöhter Radiosensitivität und verstärkter Seneszenzinduktion nach Bestrahlung. **A:** Überlebenskurven zur Darstellung des klonogenen Überlebens von UPCI-SCC-040-Zellen nach der Transfektion mit Kontroll- oder CD44v6-spezifischen siRNAs. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Berechnung der p-Werte mittels 2-way-ANOVA. **B:** Durchflusszytometrische Bestimmung der C12-FDG-Prozessierung durch seneszenzassoziierte β -Galaktosidase (β -Gal) zur Darstellung erhöhter Seneszenzinduktion nach siRNA-vermitteltem Knockdown von CD44v6 und Bestrahlung mit 4 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Berechnung der p-Werte mittels 2-way-ANOVA.

5.2.4 Aktuelle klinische Bedeutung von CD44v6 im HNSCC

Die Progression von Tumoren im Allgemeinen und damit auch die Progression von HNSCCs wird vor allem durch dereguliertes Zellwachstum, deregulierte Proliferation und Migration sowie durch die Resistenz gegenüber therapeutischer Intervention bestimmt [33]. Zahlreiche Studien verfolgten daher das Ziel, neue Signaltransduktionswege und deren Komponenten zu identifizieren, die an diesen Prozessen beteiligt sind. Durch diese Studien erlangten CD44v6-Isoformen 1991 erstmalig Interesse, nachdem Günthert et. al. gezeigt hatten, dass eine erhöhte CD44v6-Expression mit verstärkter Tendenz zur Metastasierung in pankreatischen Tumorzellen der Ratte einher ging [34]. In nachfolgenden Arbeiten konnten dann Überexpressionen von CD44v6-Isoformen auch im HNSCC und verschiedenen anderen Tumorentitäten nachgewiesen werden [25, 35-37]; für primäre und metastasierte HNSCC-Tumore konnte dabei in mehr als 90 % aller untersuchten Fälle eine Überexpression von CD44v6 nachgewiesen werden [38]. In einer LMU-internen Kohorte mit adjuvanter Radio(chemo)therapie behandelter HNSCC-Patient*innen konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte Expression von CD44v6-Isoformen ($p = 0,079$ Abbildung 6A (Mitte)) und insbesondere der Variante CD44v3-10 mit einem signifikant verkürztem Gesamtüberleben einhergehen ($p = 0,016$ Abbildung 6A (unten)) [39]. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls in einer

retrospektiven Kohorte des Cancer Genome Atlas (TCGA) mit HNSCC-Patient*innen, die ebenso mit adjuvanter Radio(chemo)therapie behandelt wurden, bestätigt werden (Abbildung 6B) [40]. Als Hauptursache für diesen Effekt konnte durch Analyse von mRNA-Sequenzierdaten, die an fixiertem und paraffin-eingebettetem Resektionsmaterial erhoben worden waren, die Überexpression der Isoform CD44v3-10 (ENST00000415148) identifiziert werden. Diese war in beiden Kohorten die am häufigsten exprimierte Transkriptvariante (s. Abbildung 6D, 100 bzw. 200 *transcripts per million* (TPM)).

Neben der Korrelation mit verkürztem Gesamtüberleben konnte auch gezeigt werden, dass die Überexpression von CD44v6-Isoformen mit weiteren klinisch-pathologischen Merkmalen wie verstärkter Tumorprogression, verstärkter Invasivität und Metastasierungstendenz sowie mit erhöhter Therapieresistenz assoziiert ist [27], [33], [41], [42], [43], [44]. Dies zeigt die Bedeutung einer klinischen Adressierung von CD44v6 in der Behandlung des HNSCC. CD44v6 stellt aufgrund seiner niedrigen Expression in Normalgeweben und der gleichzeitig hohen Expression in Tumorgeweben einen interessanten Kandidaten für molekular zielgerichtete Therapiekonzepte dar [45]. Gleichzeitig könnte CD44v6 aufgrund seiner Korrelation mit TNM-Stadien und dem Auftreten von Lokalrezidiven nach Radiotherapie als zukünftiger prognostischer Marker für radiotherapiebasierte Behandlungsschemata im HNSCC dienen [46], [47].

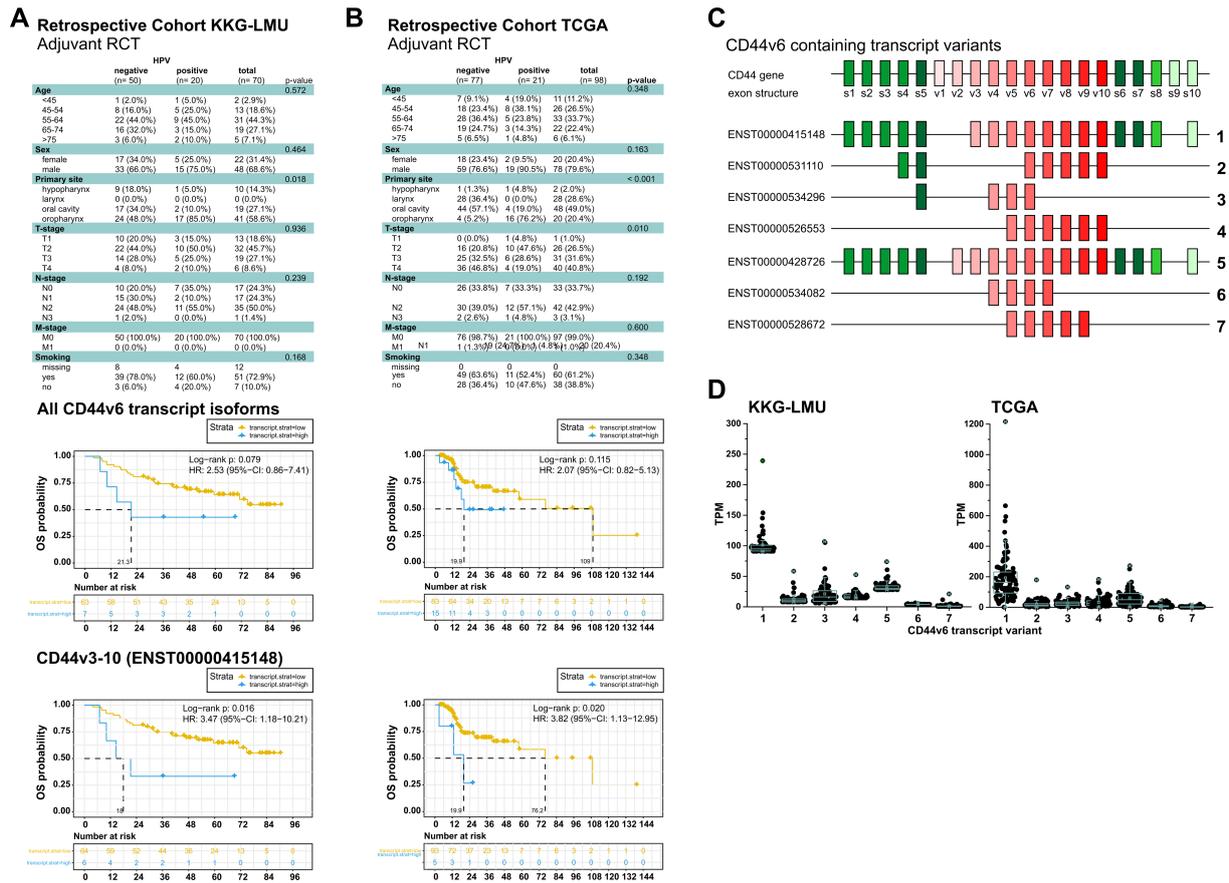


Abbildung 6: Erhöhte Expressionswerte von CD44v6 sind mit signifikant reduziertem Gesamtüberleben assoziiert in der TCGA HNSCC-Kohorte und einer retrospektiven in-house HNSCC-Kohorte (LMU-KKG HNSCC) nach postoperativer Radio(chemo)therapie. A: LMU-KKG HNSCC-Kohorte mit adjuvanter Radiochemotherapie. Klinische Parameter (oben), Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in der LMU-KKG HNSCC-Kohorte (n = 70) in Fällen mit hoher oder niedriger Expression von CD44v6-Transkripten in RNA-Seq-Daten (mitte). Die Unterteilung in hohe (blau) und niedrige (gelb) Expressionswerte erfolgte nach einem definierten, optimierten Cut-Off. Analoge Kaplan-Meier-Analyse für das Transkript CD44v3-10 (unten). **B:** TCGA-HNSCC-Kohorte (Subgruppe der Fälle mit adjuvanter Radiochemotherapie mit n = 98). Klinische Parameter (oben), Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens für alle CD44v6-Transkripte (Mitte) oder das Transkript CD44v3-10 (unten) analog zu A. Hazard Ratios wurden mit einem univariaten Cox Regressions Hazard-Modell, p-Werte mithilfe des log-rank Tests ermittelt. **C:** Übersicht aller bekannten CD44-Transkriptisoformen, die das Exon v6 beinhalten. **D:** Verteilung der TPM-Werte aus den RNA-Seq-Daten der beiden Kohorten über die verschiedenen Transkriptisoformen.

5.2.5 Wechselwirkungen zwischen CD44v6-Isoformen und der TGFβ-Signalkaskade

In seiner Funktion als multifunktionale Signalplattform wechselwirkt CD44/CD44v6 mit zahlreichen anderen Signalkaskaden, unter anderem mit dem von TGFβ abhängigen Signalweg. Für beide Rezeptoren von TGFβ (TGFβ-RI und TGFβ-RII) konnte jeweils eine physikalische Wechselwirkung mit CD44v6 nachgewiesen werden, die beide zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege führten [48].

Die TGFβ-Signalkaskade ist komplex und fungiert in Tumoren diametral – zum einen erfüllt sie während der frühen Tumorgenese anti-tumorale Funktionen, wie die

Inhibition des Tumorwachstums sowie Stimulation von apoptotischem Zelltod und Seneszenz. Umgekehrt begünstigt TGF β in späteren Phasen der Tumorgenese die Progression von Tumoren, unter anderem durch die Induktion von Angiogenese und EMT sowie aufgrund der Unterdrückung der anti-tumoralen Immunantwort [49], [50]. TGF β bindet an TGF β -RII, welcher daraufhin mit dem TGF β -RI heterodimerisiert und diesen durch Phosphorylierung aktiviert [51]. Innerhalb der nachfolgenden Signalkaskade kommt es zur Phosphorylierung sogenannter SMAD-Proteine durch TGF β -RI, woraufhin diese in den Zellkern transloziert werden und die Expression von Zielgenen triggern, zu denen auch die CD44v6-Isoformen zählen [52]. Alternativ erfolgt die Weiterleitung des Signals über Signalwege wie den PI3K/Akt-Weg oder den *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK)-Weg [51]. Fehlregulationen des TGF β -Signalwegs treten im Allgemeinen relativ häufig bei neoplastischen Erkrankungen auf, so auch im HNSCC [1]. Ursächlich sind in der Regel Mutationen in den Genen, die für TGF β , TGF β -RI oder TGF β -RII kodieren, sowie der Verlust von Chromosom 18q21, auf dem das TGF β -RII-kodierende Gen *TGFBR2* liegt [49], [53]. Für den Verlust des TGF β -RII-Gens ist eine kausale Rolle in der Progression des HNSCCs beschrieben, da durch diesen die anti-tumorale Funktion von TGF β wegfällt [54]. Neben dieser Funktion in der Tumorprogression fällt dem TGF β -Signalweg auch eine Funktion in der EMT zu, durch die Tumorzellen den Zellverband verlassen und sich systemisch im Körper verbreiten können (Metastasierung) [18], [55], [56]. Damit sind TGF β und CD44v6-Spleißvarianten an überlappenden Prozessen in der Zelle beteiligt. Jedoch konnte noch nicht abschließend geklärt werden, wie stark sich beide Signalkaskaden gegenseitig beeinflussen.

5.3 Zielgerichtete Therapieansätze in der Behandlung des HNSCC

Das grundsätzliche Ziel von zielgerichteten onkologischen Therapieansätzen (Tabelle 8) ist es, Tumore molekularmechanistisch und damit hoch präzise und individualisiert anzugreifen. Idealerweise greift die Therapie spezifisch am Tumor an ohne dem Normalgewebe zu schaden. Toxizität und Spätfolgen im Vergleich zu herkömmlichen Therapiekonzepten, die im Wesentlichen proliferierende Gewebe (Tumoren und verschiedene Normalgewebe) attackieren, sollen auf diese Weise möglichst bei

gleichzeitiger Verbesserung des Gesamtüberlebens und der lokalen Kontrolle reduziert werden. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde eine Vielzahl neuer, zielgerichteter Therapiekonzepte entwickelt. Ein bekanntes Beispiel ist der humanisierte, monoklonale Antikörper Cetuximab, der gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) gerichtet ist und der in verschiedenen Settings für die HNSCC-Behandlung, insbesondere bei nicht-chemotherapiefähigen Patient*innen, zugelassen ist [12], [57]. Nachdem Günthert et. al. 1991 erstmals eine direkte funktionelle Verbindung zwischen der Metastasierung von Krebszellen und der Überexpression von CD44v6-Isoformen nachweisen konnten, wurden spezifische Antikörper gegen CD44v6 wie beispielsweise 1.1ASML, U36, VFF18, BIWA4 generiert [34]. Als Folge von schlechter Gewebepenetration, schlechter Metabolisierung und teilweise starker Nebenwirkungen erhielt jedoch keiner dieser Antikörper eine klinische Zulassung [45]. So besteht bis heute ein Bedarf an der Etablierung von auf CD44v6 ausgerichteten Therapiekonzepten. In der Folge werden daher Möglichkeiten zur molekular zielgerichteten Adressierung von CD44, insbesondere seiner Spleißvarianten mit dem variablen Exon 6 (CD44v6) vorgestellt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

5.3.1 Kompetitierende Peptide

Ein weiteres Konzept zur Adressierung molekularer Strukturen stellen synthetische Peptide dar, die ähnlich wie Antikörper mit hoher Spezifität an Zielstrukturen binden können, gleichzeitig aber eine niedrigere Immunogenität als Antikörper zeigen und damit eine bessere Verträglichkeit aufweisen [58]. Darüber hinaus weisen Peptide gegenüber Antikörpern eine bessere Gewebepenetration und Vorhersagbarkeit ihrer Pharmakokinetik auf [59]. Demzufolge eignen sich Peptide sehr gut für zielgerichtete Therapiekonzepte. Im Jahr 2002 wurde das erste Peptid generiert, das die Funktion von CD44v6-Isoformen spezifisch inhibieren sollte. Das Peptid wurde so entwickelt, dass es aufgrund seiner Aminosäuresequenz bzw. -struktur die ligandenabhängige Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen HGF und c-Met mittels CD44v6 durch kompetitive Inhibition der Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren verhindern sollte [22]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Krebszellkulturen mit diesem Peptid, die durch CD44v6 vermittelte Signalweiterleitung von c-Met im Rahmen des MAPK-Signalwegs, zu unterbrechen vermochte. Daneben zeigte das Peptid auch anti-angiogenetische Funktionen, unter anderem Inhibition von

Endothelzellmigration, Gefäßaussprossung und Tumolvaskularisierung [60]. Darüber hinaus konnte in präklinischen Mausmodellen des duktales pankreatisches Adenokarzinoms (PDAC) durch die Applikation dieses Peptids das Tumorstadium und die Metastasierung nachhaltig reduziert werden [61]. Das Peptid (Bezeichnung AMC303) wird derzeit in einer klinischen Phase I/Ib-Studie an Patient*innen mit fortgeschrittenen, soliden Tumoren evaluiert (NCT03009214).

5.3.2 Aptamere

Aptamere stellen einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle (DNA oder RNA) mit einer Länge von 64 – 83 Nukleotiden dar, die aufgrund ihrer Tertiärstruktur molekular gerichtet sowohl für diagnostische wie auch für therapeutische Zwecke (somit „theranostisch“) eingesetzt werden können [62]. Mittels *Selected Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) können Aptamere selektiert werden, die mit hoher Affinität und Spezifität an eine Zielstruktur wie beispielsweise den CD44v6-Isoformen binden können und dadurch nachgeschaltete Signalwege entweder inhibieren oder auch aktivieren können [63], [64]. Aptamere bieten gegenüber Antikörpern zahlreiche Vorteile: Da Aptamere keinen F_C-Teil besitzen, können Immunreaktionen sowie andere unerwünschte Nebeneffekte weitgehend vermieden werden. Aufgrund ihres geringen molekularen Gewichts (6 – 30 kDa vs. 150 kDa bei Antikörpern) weisen Aptamere ebenfalls eine deutlich bessere Gewebepenetration als Antikörper auf. Weitere Vorteile von Aptameren sind die verhältnismäßig niedrigen Produktionskosten und die hohe chemische Stabilität weshalb jüngst auch gegen verschiedene Formen von CD44, beispielsweise gegen dessen Hyaluronsäurebindedomäne und gegen CD44v10 Aptamere generiert und präklinisch untersucht wurden [65], [66], [67], [68].

5.3.3 Indirekte pharmakologische Inhibition von CD44v6

Neben direkten Therapiekonzepten stellt die indirekte pharmakologische Inhibition von Signaltransduktionswegen, die beispielsweise mit CD44v6-Isoformen funktionell assoziiert sind, eine Möglichkeit dar, um mit der Funktion von CD44v6-Isoformen zu interferieren. In diesem Zusammenhang stellt die pharmakologische Inhibition des TGF β -Signalwegs eine besonders vielversprechende Option dar, da wie oben beschrieben, beide Signalwege eng miteinander verwoben sind. Niedermolekulare Inhibitoren des TGF β -Signalwegs wie beispielsweise LY364947 inhibieren zumeist die

Kinasedomäne von TGF β -RI, da dieser Rezeptor im Gegensatz zu TGF β -RII für TGF β -vermittelte Signaltransduktion essentiell benötigt wird [69]. Als Folge der Wechselwirkung zwischen CD44v6 und dem TGF β -Signalweg und einer in der Literatur beschriebenen gegenseitigen Abhängigkeit auf Expressionsebene sollte die Inhibition von TGF β -RI somit zu einer reduzierten Expression von CD44v6 und dadurch zur Radiosensibilisierung von Tumorzellen führen [52], [70]. Darüber hinaus könnte mit Hinblick auf das bearbeitete Projekt, in dem die Blockierung der Funktion von CD44v6-Isoformen in Verbindung mit Strahlentherapie untersucht werden sollte, durch Inhibition von TGF β während der Radatio die strahlungsbedingte Toxizität im Normalgewebe reduziert und gleichzeitig die Radiosensitivität epithelialer Tumorzellen erhöht werden [71]. Diese Hypothese wird unter anderem durch zwei Studien gestützt, die gezeigt haben, dass eine Behandlung mit dem TGF β -RI-Inhibitor LY364947 vor der Strahlenbehandlung eine Radiosensibilisierung von Tumorzellen als Folge reduzierter Effektivität der DNA-Schadensantwort hervorruft [72], [73].

6 Fragestellung und Zielsetzung

Trotz teilweise aggressiver Behandlungsregime beträgt die 5-Jahresüberlebensrate im lokal fortgeschrittenen HNSCC gegenwärtig weniger als 50 %. Verantwortlich dafür sind häufige Rezidive, die durch Therapieresistenzen der Tumorzellen getrieben werden.

Die Variante 6 des Transmembranrezeptors CD44 wird im HNSCC und in zahlreichen anderen Tumorentitäten (über)exprimiert. Nach aktuellem Stand der Forschung steht die Überexpression von CD44v6 im HNSCC in direktem Zusammenhang mit erhöhter Tumorprogression und Therapieresistenz sowie mit einem signifikant verschlechterten Gesamtüberleben. Bisher gibt es keine molekular zielgerichtete Therapie gegen CD44v6, weshalb im vorliegenden Projekt CD44v6 als Zielstruktur für eine derartige pharmakologische Intervention in Kombination mit Bestrahlung evaluiert werden sollte. Dabei wurden verschiedene Therapiekonzepte verfolgt:

- CD44v6-kompetierende Peptide, durch die die von CD44v6 abhängende, pro-tumorale Signaltransduktion inhibiert und dadurch die Progression und die Resistenz gegenüber einer Strahlenbehandlung (Radioresistenz) von HNSCC-Zellen reduziert werden sollte
- CD44v6-bindende Aptamere, mittels derer die tumorspezifische Verabreichung eines radiosensibilisierend wirkenden Nukleosidanalogs (hier: 5-Fluorouracil (5-FU)) erreicht werden sollte
- Die indirekte therapeutische Adressierung von CD44v6 durch Modulation des TGF β -Signalwegs mittels eines niedermolekularen Inhibitors des TGF β -Rezeptors I (TGF β -RI; LY364947)

Alle drei Ansätze sollten an kultivierten, humanen HNSCC-Zelllinien im Rahmen einer kombinierten, molekular zielgerichteten Radiochemotherapie mit Hilfe von Klonogenitäts-, Viabilitäts-, Wachstums- und Zelltodanalysen (Seneszenz, Apoptose) charakterisiert werden.

7 Material

7.1 Hersteller

Hersteller	Hauptsitz des Herstellers
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
ATCC	Manassas, VA, USA
Bachem	Bubendorf, Schweiz
BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Biochrom	Berlin, Deutschland
BioLegend	San Diego, CA, USA
BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall, Deutschland
Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Corning	Corning, NY, USA
DSMZ	Braunschweig, Deutschland
eBioscience	San Diego, CA, USA
Enzo Life Sciences	Lörrach, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St. Leon-Roth, Deutschland
GE HealthCare	München, Deutschland
GenScript	Piscataway Township, NJ, USA
Glaswarenfabrik Karl Hecht	Sondheim, Deutschland
Graphpad Prism Software	San Diego, CA, USA
Greiner BIO-ONE	Kremsmünster, Österreich
Ibidi	Martinsried, Deutschland
IBL International	Hamburg, Deutschland
Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Kern & Sohn	Balingen, Deutschland
Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
LI-COR	Lincoln, NE, USA
Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Lonza	Basel, Schweiz
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Microsoft	Richmond, WA, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Neolab	Heidelberg, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
PromoCell	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Venlo, Niederlande

R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Roche Applied Science	Penzberg, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Tocris	Bristol, Großbritannien
Tree Star Inc.	Ashland, OR, USA
Xstrahl	Camberley, Großbritannien
Zeiss	Göttingen, Deutschland

Tabelle 1: Liste der Hersteller aller verwendeter Produkte

7.2 Zelllinien und Zellkulturmedien

Die Zelllinien wurden durch *short tandem repeats* (STR) Typisierung authentifiziert (durchgeführt durch DSMZ) und regelmäßig negativ auf Mykoplasmen-Kontamination getestet (MycoAlert).

Zelllinie	HPV Status	Ursprungsort	Herkunft/ Referenz
UM-SCC1	negativ	Mundboden	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, Deutschland Referenz [74]
DU-SCC2	positiv	Hypopharynx	Universitätsklinikum Ulm, Deutschland Referenz [75]
OKF6	negativ	Mundhöhle	Rheinwald Laboratory, Brigham and Woman's Hospital, Boston, USA Referenz: [76]
SCC9	negativ	Zunge	ATCC, Manassas, VA, USA ATCC Nummer: CRL-1629
UT-SCC16A	negativ	Zunge	Universität Turku, Finnland Referenz: [77]
Cal27	negativ	Zunge	DSMZ, Braunschweig DSMZ Nummer: ACC446
Cal33	negativ	Zunge	DSMZ, Braunschweig DSMZ Nummer: ACC447
UPCI-SCC-040	negativ	Zunge	DSMZ, Braunschweig DSMZ Nummer: ACC660
UPCI-SCC-099	negativ	Mundhöhle	DSMZ, Braunschweig DSMZ Nummer: 665
UPCI-SCC-131	negativ	Mundhöhle	DSMZ, Braunschweig DSMZ Nummer: 668

VU147	positiv	Mundboden	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, Deutschland Referenz: [78]
UPCI-SCC-154	positiv	Mundhöhle	DSMZ, Braunschweig DSMZ Nummer: 669

Tabelle 2: Liste aller verwendeter HNSCC-Zelllinien

Zellkulturmedien und Supplements	Hersteller
DMEM	Thermo Fisher Scientific
DMEM high Glucose (4,5 g/L)	Thermo Fisher Scientific
F12 Nutrient Mix	Thermo Fisher Scientific
Fötale Kälberserum	Thermo Fisher Scientific
Glutamax	Thermo Fisher Scientific
Rekombinanter humaner EGF	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	Thermo Fisher Scientific
Serumfreies Keratinozytenmedium	Thermo Fisher Scientific
TrypLE Express	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 3: Liste aller verwendeter Zellkulturmedien und Supplemente

7.3 Antikörper

Antikörper	Klon	Fluoreszenz	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD44	G44-26	Brillant Violett510	Maus IgG2b, κ	BD Biosciences	1 : 25
CD44v6	VFF-7	FITC	Maus IgG1	BioRad	1 : 25
HGFR/c-Met	95106	Alexa Fluor700	Maus IgG1	R&D Systems	1 : 25
EGFR	EGFR.1	PE	Maus IgG2b, κ	BD Biosciences	1 : 25
TGFβ-RI/ ALK-5	854621R	-	Maus IgG1	R&D Systems	1 : 25
TGFβ-RII	25508	PE	Maus IgG1	R&D Systems	1 : 25
Isotyp IgG2b		Brillant Violett510	Maus IgG2b, κ	BD Biosciences	1 : 25
Isotyp IgG1		FITC	Maus IgG1	BD Biosciences	1 : 25

Isotyp IgG1		Alexa Fluor700	Maus IgG1, κ	BD Biosciences	1 : 25
Isotyp IgG2b		PE	Maus IgG2b	BD Biosciences	1 : 25
Isotyp IgG1		Alexa Fluor488	Maus IgG1	BD Biosciences	1 : 25
Isotyp IgG1		PE	Maus IgG1	BD Biosciences	1 : 25

Tabelle 4: Liste aller verwendeten Primärantikörper und der Isotypenkontrollen

Antikörper	Fluoreszenz	Spezies	Reaktivität	Hersteller	Verdünnung
Sek. AK IgG (H*L), polyklonal	Alexa Fluor488	Ziege	Maus	Thermo Fisher Scientific	1 : 500

Tabelle 5: Liste aller verwendeten Sekundärantikörper

7.4 Oligonukleotid-Primer für qRT-PCR-Analysen

Gen	Primer	Sequenz (5' – 3')
18S rRNA	Forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
	Reverse	AGCTGGAATTACCGCGGC
c-Met	Forward	ATCCACCTTCATTAAAGGAGACCTC
	Reverse	AAACCACAACCTGCATGAAGC
CD44 total	Forward	GGACAAGTTTTGGTGGCACG
	Reverse	GCAGGTTATATTCAAATCGATCTGC
CD44v3-v10	Forward	CCCTGCTACCAGTACGTCTTCA
	Reverse	AGGAGTTGCCTGGATTGTGC
CD44v6	Forward	AGATGGCATGAGGGATATCGC
	Reverse	CTGTTGTCTGAATGGGAGTCTTCTT
EGFR	Forward	AGGAGAAGTCCAGAACTGACC
	Reverse	CAGCCTGCAGCACACTGGT
TGF- β 1	Forward	CTGCTGAGGCTCAAGTTAAAAGTG
	Reverse	TGAGGTATCGCCAGGAATTGT
TGF β -RI	Forward	ATGGCAGAGCTGTGAAGCCT
	Reverse	TGTAAGCCTAGCTGCTCCATTG
TGF β -RII	Forward	GCTGTAATGCAGTGGGAGAAAGTAA
	Reverse	TGCTTTTCGACACAGGGGTG

β2-Mikroglobulin	Forward	TGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC
	Reverse	TCTCTGCTGGATGACGTGAGTAAAC
δ-ALAS	Forward	TCCACTGCAGCAGTACACTACCA
	Reverse	ACGGAAGCTGTGTGCCATCT

Tabelle 6: Sequenzen der für quantitative Realtime PCR (qRT-PCR) verwendeten Primer. Die Synthese der Primer erfolgte durch Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland).

7.5 Reagenzien und Kits

Reagenz	Hersteller
AlamarBlue®-Reagenz	Bio-Rad
Bafilomycin A1	Tocris
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich
C12-FDG	Axxora
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
dNTPs	Promega
Ethanol	Merck
FACS-Puffer	BD Biosciences
HCl	Merck
Humanes Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck
LY364947	Tocris
Methanol	Merck
Methylenblau	AppliChem
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich
Oligo(dT)18	Fermentas
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich
Random Hexamer	Fermentas
Ribolock Rnase Inhibitor	Fermentas
Rnase A	Qiagen
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
TGFβ1, human	R&D Systems

Tabelle 7: Liste aller verwendeten Reagenzien

Peptid	Sequenz
hCD44v6_14mer	KEQWFGNRWHEGYR
hCD44v6_14mer scramble	RYGEHWNRNGFWQEK
hCD44v6_42mer-H10	QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPKEDSHSTTGTAHHHHHHHHHH
hCD44v6_14mer-H10	KEQWFGNRWHEGYRHHHHHHHHHH

Tabelle 8: Liste aller verwendeten Peptide. Die Synthese der Peptide erfolgte durch GenScript; gelöst wurden die Peptide gemäß Herstellerangabe in PBS.

Kits	Hersteller
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza
NucleoSpin® RNA Kit II	Macherey-Nagel
RevertAid H Minus M-MuLV RT	Thermo Fisher

Tabelle 9: Liste aller verwendeten Kits

7.6 Einwegmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml, 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 ml, 50 ml Röhrchen	Sarstedt
5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Stripetten	Corning
6-, 24-, 96- (f/v) well-Platten	Corning, BD Falcon
FACS Röhrchen 1,3 ml	Greiner BIO-ONE
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific
Light Cycler 480 Multiwell-Platten	Roche Applied Sciences
PCR Reaktionsgefäß 8er Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific
Pierce® Nickel Coated Plates	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen epT.I.P.S.	Eppendorf
Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S.	Eppendorf
T75, T175 Zellkulturflaschen	Corning
Zellkulturschalen mit 10 cm, 15 cm Durchmesser	Sarstedt

Tabelle 10: Liste aller Verbrauchsmaterialien

7.7 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage ABJ-NM	Kern & Sohn
Brutschrank Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific
Lichtmikroskop Primovert	Carl Zeiss
LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences
Mikrozentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific
Multipipette Plus	Eppendorf
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Pipetboy	Integra Biosciences
Reagenzglas mixer, Vortex 7-2020	Neolab
Research plus Pipetten	Eppendorf
RS225 Röntgenbestrahlungsgerät	Xstrahl
Sicherheitswerkbank Maxisafe 2020	Thermo Fisher Scientific
Synergy MX Fluoreszenzplattenmessgerät	BioTek Instruments GmbH
Thermomix Comfort	Eppendorf
Trockenschrank Heraeus Oven Function, Line UT20	Thermo Fisher Scientific
Universalzentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 11: Liste aller verwendeten Laborgeräte

7.8 Software

Software	Hersteller
FACSDiva	BD Biosciences
Graphpad Prism 7.0d	Graphpad Software
Microsoft Office	Microsoft

Tabelle 12: Liste aller verwendeten Softwares

8 Methoden

8.1 Zellkultur

8.1.1 Zellkultivierung

Alle HNSCC-Zelllinien (Cal27, Cal33, SCC9, DU-SCC2, UM-SCC1, UPCI-SCC-040, UPCI-SCC-099, UPCI-SCC-131, UPCI-SCC-154, UT-SCC16A und VU147) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, 4,5 g/L Glucose), welches mit 10 % hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin supplementiert war, bei 37 °C und 7,5 % CO₂ kultiviert. Die immortalisierte Keratinozytenlinie OKF6 wurde in Keratinozyten-Nährmedium kultiviert, das sich aus 0,5 Teilen serumfreiem Keratinozyten-Medium, 0,25 Teilen DMEM, 0,25 Teilen Ham's F12 Nutrient Mix, 25 U/ml Penicillin, 25 µg/ml Streptomycin, 155 µM CaCl₂, 1,5 mM GlutaMax, 35 µg/ml Rinderhypophysen-Extrakt (BPE) und 0,3 ng/ml rekombinantem humanen EGF zusammensetzte, bei 37 °C und 7,5 % CO₂ kultiviert. Alle Zelllinien wurden mittels STR-Analyse authentifiziert (durchgeführt durch DSMZ), auf Mycoplasmen-Freiheit regelmäßig getestet (MycoALERT) und nicht länger als 15 Passagen in Kultur gehalten.

Zur Subkultivierung bei einer Konfluenz von mehr als 80 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels TrypLE Express bei 37 °C abgelöst. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde das Enzym inaktiviert und der Vorgang gestoppt. Die Zellen wurden bei 314 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen anschließend in einem definierten Volumen an Zellkulturmedium resuspendiert.

8.1.2 Langzeitkonservierung

Zur Langzeitkonservierung wurden Zellen zunächst expandiert, wie oben beschrieben abgelöst, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und in Kryomedium (90 % FCS, 10 % DMSO) suspendiert. Nach dem Einfrieren bei – 80 °C für mindestens 24 h erfolgte die Langzeiteinlagerung in flüssigem Stickstoff.

Zur Kultivierung wurden Zellen bei 37 °C aufgetaut, in 20 ml Kulturmedium suspendiert und bei 314 g für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die

Zellen in Medium resuspendiert, über Nacht bei 37 °C und 7,5 % CO₂ inkubiert und am nächsten Tag das Medium gewechselt.

8.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl bzw. Dichte von Zellen in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension in die Kammer gegeben und jeweils die Zellen in den vier äußeren Quadranten gezählt. Der Mittelwert wurde mit dem Kammerfaktor von 10.000 multipliziert, um die Zahl an Zellen pro ml Suspension zu erhalten.

8.1.4 Bestrahlung von Zellen *in vitro*

Zur Bestrahlung von Zellen *in vitro* wurde ein Röntgengerät vom Typ RS225 (Xstrahl) verwendet. Die Bestrahlung erfolgte bei 200 kV Röhrenspannung und 10 mA Stromstärke in Gegenwart eines Thoräus-Filters. Die Dosis von 1 Gy wurde in 244 sec (FSD60) bei Raumtemperatur abgestrahlt.

8.1.5 Bestimmung der Verdopplungszeit

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit von Zellen wurden 15.000 Zellen je Kavität in 24-well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach dem Wechsel des Mediums und der damit verbundenen Umstellung von 10 % FCS auf 2,5 % FCS und Behandlung mit den zu untersuchenden Peptiden (hCD44v6-14mer, 100 nM bzw. scramble, 100 nM) oder Kontrollmedium wurden die Zellen in definierten Zeitabständen von 12 h von der Platte abgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt (8.1.3). Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde der Logarithmus der erhaltenen Zellzahl (y-Achse) gegen die Zeit in Stunden (x-Achse) aufgetragen. Die Steigung der Regressionsgeraden wurde zur Berechnung der Verdopplungszeit gemäß folgender Formel herangezogen:

$$\text{Verdopplungszeit [h]} = \log(2) \frac{\Delta \text{zeit[h]}}{\Delta \log(\text{Zellen})}$$

8.1.6 Viabilitätsmessung

Zur Bestimmung der zellulären Viabilität wurde der Vitalfarbstoff AlamarBlue® verwendet, der metabolisch in ein pink fluoreszierendes Resorufin-Produkt umgesetzt wird. Es wurden 5.000 Zellen je Kavität in 96-well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Einstellung von 2,5 % FCS wurden die Zellen mit den Peptiden (CD44v6-14mer- oder Kontrollpeptid) in Konzentrationen von 0,0 nM, 1,0 nM, 10,0 nM, 100,0 nM und 1.000,0 nM behandelt und bestrahlt (0 – 10 Gy). Die Gabe des Peptids wurde täglich wiederholt. Die Zellen wurden bis 96 h nach Bestrahlung inkubiert. In Zeitabständen von 24 h wurde AlamarBlue®-Reagenz in einer Verdünnung von 1/10 zugegeben und die Zellen in dessen Gegenwart für weitere 2 – 8 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium in eine neue 96-well-Platte überführt und die Resorufin-Fluoreszenz mit einem Synergy Mx Plattenlesegerät bestimmt (Exzitation 560 nm, Emission 590 nm). Die gemessene Viabilität wurden auf unbehandelte, unbestrahlte Zellen des gleichen Messtages (100 % Viabilität) normalisiert.

8.1.7 Koloniebildungsassay

Die Analyse des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung erfolgte mittels Koloniebildungsassay. Es wurden Einzelzellsuspensionen in 6-well-Platten mit 150 – 50.000 Zellen je Kavität in Duplikaten ausgesät. Nach einer Adhärenzzeit von 4 h wurde ein Medienwechsel und gleichzeitig die Behandlung mit Peptiden, TGFβ1 oder TGFβ1-Inhibitoren (LY364947) vorgenommen. Danach erfolgte die Bestrahlung mit Dosen von 0 – 10 Gy. Nach einer Inkubation von 11 – 15 d wurden die Zellen mit Ethanol (80 %) fixiert, mit 0,3 % Methylenblau gefärbt und diejenigen Kolonien, die aus mindestens 50 Zellen bestanden, mittels eines binokularen Mikroskops gezählt. Das prozentuale Überleben wurde unter Berücksichtigung der Plattierungseffizienz gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Überlebensfraktion} = \frac{\text{gezählte Kolonien} \times 100}{\text{ausgesäte Zellzahl} \times \text{PE}}$$

$$\text{PE} [\%] = \frac{\text{gezählte Kolonien (unbehandelt)} \times 100}{\text{ausgesäte Zellzahl (unbehandelt)}}$$

8.2 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden an einem LSR II Durchflusszytometer unter Verwendung der Software FACSDiva (BD Biosciences) durchgeführt.

8.2.1 Analyse von Zelloberflächenproteinen

Zur Detektion von Zelloberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Je nach Versuchsaufbau und Zelllinie wurden entweder $1,5 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Zellkulturschalen oder 100.000 – 500.000 Zellen je Kavität in 6-well-Platten ausgesät. Nach einer 16-stündigen Adhärenzzeit erfolgte ggf. ein Medienwechsel und damit die Zugabe von TGF β 1 oder TGF β -RI-Inhibitoren. Für die Messung wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert (314 g, 5 min) und in FACS-Puffer mit einer finalen Zelldichte von 10^6 Zellen je ml resuspendiert. Zur Antikörperfärbung wurden die Zellen in 96-well-Platten (mit V-Böden) transferiert (100.000 Zellen pro well), pelletiert (314 g, 5 min) und mit 2 μ l des jeweiligen Antikörpers (verdünnt in 50 μ l FACS-Puffer) bzw. mit der entsprechenden Isotypenkontrolle oder FACS-Puffer ohne Antikörper (Negativkontrolle) für 30 min bei 4 °C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert. SSC, FSC sowie Fluoreszenzintensitäten von PE, BV510, FITC und A700 wurden jeweils durchflusszytometrisch gemessen und die relative Expression der Oberflächenproteine anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Expression} = \frac{\text{Median FI (Probe)}}{\text{Median FI (Isotyp)}}$$

8.2.2 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität

Die Bestimmung von zellulärer Seneszenz erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messung Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase- (SA- β -Gal) Aktivität sowie der Granularität [79]. Dazu wurden Zellen in 24-well-Platten (8.000 Zellen pro Kavität) ausgesät und für ca. 65 h adhärirt. Nach einem Medienwechsel und der Einstellung von 2,5 % FCS sowie Behandlung mit den Peptiden (100 nM CD44v6-14mer oder Kontrollpeptid, tägliche Zugabe) erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit Dosen zwischen 0 und 10 Gy. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 100 nM Bafilomycin in serumfreiem Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend

wurde das Substrat 5-Dodecanoylaminofluorescein-di-β-D-galactopyranosid (C₁₂-FDG) in der Konzentration von 50 μM zugesetzt und die Zellen erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach mit PBS gewaschen, abgelöst und schließlich durchflusszytometrisch analysiert. Seneszente Zellen wurden durch hohe FITC – und sideward scatter (SSC) Signale innerhalb des „No Debris“ Gates definiert (Abbildung 7).

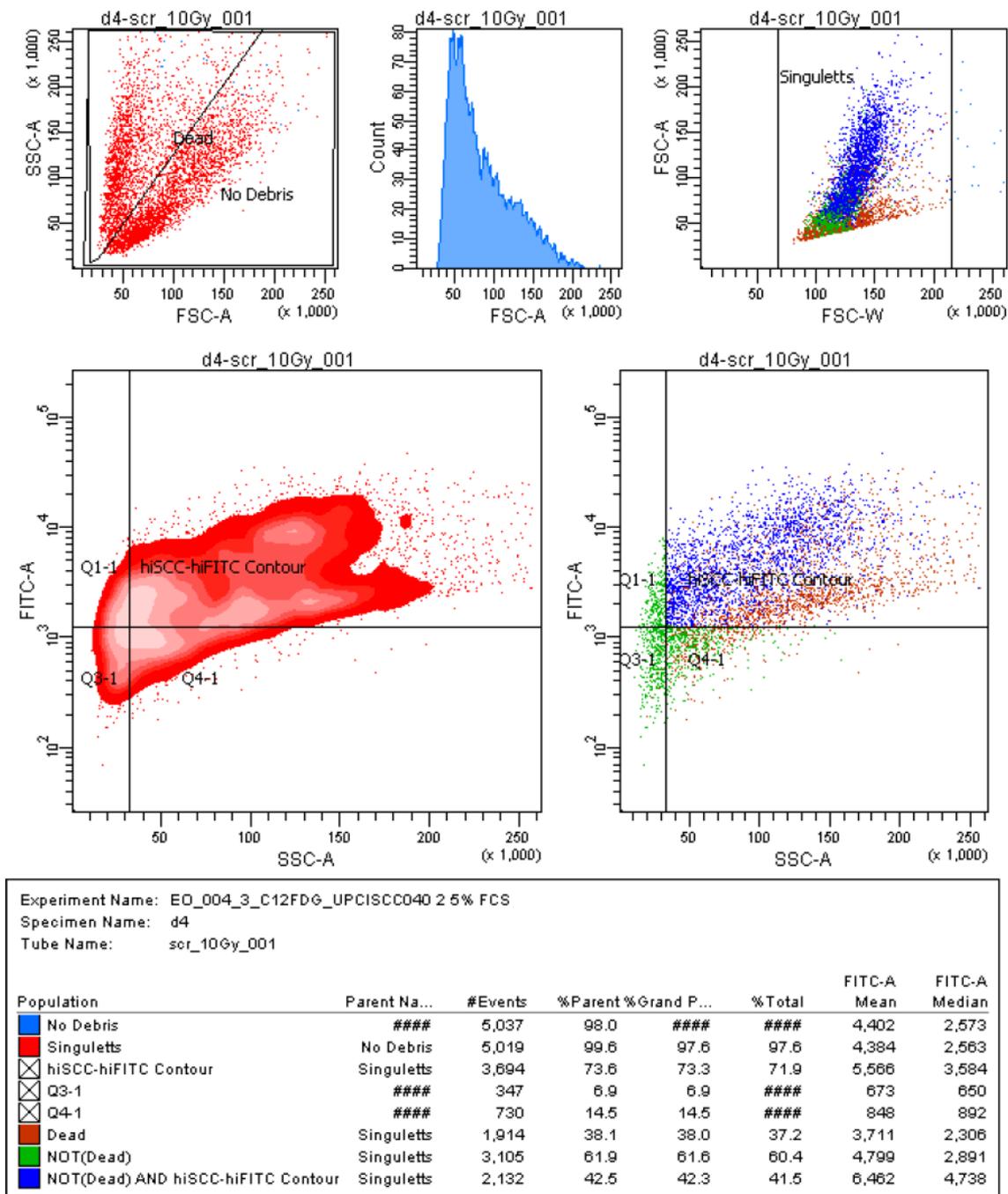


Abbildung 7: Gatingstrategie zur Detektion seneszenter Zellen. Selektion nicht toter Zellen („no Debris“) außerhalb des FSC-SSC Gates („Dead“). Als seneszent wurden solche Zellen definiert, die diesen Filter passiert hatten und eine erhöhte Granularität (SSC^{high}) und erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität (FITC^{high}) aufwiesen.

8.2.3 Apoptotische DNA-Fragmentierung und Zellzyklusanalyse

Zur Bestimmung apoptotischen Zelltods und für Zellzyklusanalysen wurden 8.000 bzw. 9.000 Zellen je Kavität in 24-well-Platten ausgesät und über 65 h adhärirt. Nach dem Wechsel auf 2,5 % FCS wurden Peptide zugegeben (100 nM CD44v6-14mer, 100 nM Kontrollpeptid, tägliche Zugabe) und die Zellen bestrahlt (0 – 10 Gy). In 24 h-Intervallen wurden Proben für durchflusszytometrische Messungen der Apoptose entnommen, für Zellzyklusanalysen nach 2, 4, 6, 12, 24, 36 und 48 h. Hierzu wurden zunächst die Zellkulturüberstände in FACS-Röhrchen gesammelt, die Zellen mit PBS gewaschen und danach abgelöst. Diese Fraktionen wurden jeweils gepoolt, zentrifugiert (314 g, 5 min), mit PBS gewaschen und mit 70 % eiskaltem Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden bis zur Analyse bei – 20 °C gelagert. Vor der Analyse wurden die Zellen zweifach mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen und mit PI-Puffer (100 µg/ml RnaseA, 64 µM Propidiumiodid, 38 mM Natriumcitrat) für 20 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die Definition apoptotischer Zellen bei im PI-Kanal 660 nm (log-Darstellung) erfolgte wie unten gezeigt (Abbildung 8). Zur Analysierung der Zellzyklusphase wurde der Anteil an Zellen in G₁-, S- und G₂/M-Phase im PI-Kanal bei 575 nm (lin-Darstellung) bestimmt (Abbildung 9).

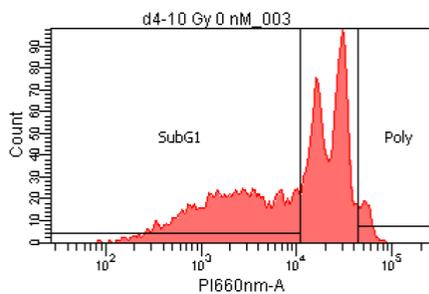


Abbildung 8: FACS-Histogramm bei 660 nm Wellenlänge zur Darstellung apoptotischer SubG1-Zellen. Apoptotische Zellen zeichnen sich durch einen subdiploiden (SubG1) DNA-Gehalt aus, der bei 660 nm definiert wurde. Der Doppelpeak entspricht den Phasen des Zellzyklus (s. Abbildung 9). Poly definiert polyploide Zellen.

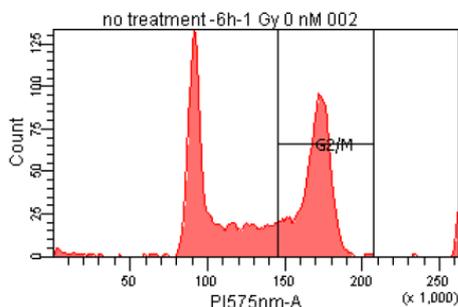


Abbildung 9: FACS-Histogramm bei 575 nm Wellenlänge zur Darstellung der Zellzyklusverteilung. Zellen in der G₀/G₁-Phase stellen sich im linken Peak dar, während Zellen in der G₂/M-Phase dem rechten Peak entsprechen. Zellen in der S-Phase definieren sich durch die Signale zwischen den beiden Peaks.

8.2.4 Titration von Cy3-markierten Aptameren

Zur Bestimmung der für die Assays geeigneten Aptamer-Konzentrationen wurden die Aptamere mit einem Cyaninfluoreszenzfarbstoff (Cy3) markiert. Es wurden $4 - 5 \times 10^6$ UPCI-SCC-040- oder UD-SCC2-Zellen in 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und über 16 h hinweg adhäriert. Nach Ablösung der Zellen wurden diese zentrifugiert (314 g, 5 min) und in FACS-Puffer (+ 5 mM MgCl₂) resuspendiert. Pro Kavität einer 96-well-V-Bodenplatte wurden dann 100.000 Zellen ausgesät, zweimal mit FACS-Puffer (+ 5 mM MgCl₂) gewaschen und die Zellen danach mit Aptameren in den Konzentrationen 0,01 nM, 0,1 nM, 1,0 nM, 10,0 nM, 100,0 nM, 1,0 µM und 5,0 µM für 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach zweifachem Waschen wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil von aufgrund der Bindung Cy3-gelabelter Aptamere im Cy3-Kanal detektierbaren Zellen wurde aus dem Median der Cy3-Fluoreszenzintensität gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Cy3-Fluoreszenz} = \frac{\text{Median FI (Probe)}}{\text{Median FI (Kontrolle)}}$$

8.3 Molekularbiologische Methoden

8.3.1 RNA-Isolation und Quantifizierung

Je nach Größe und Morphologie der Zellen wurden zwischen 5×10^6 und 1×10^7 Zellen in 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach mittels eines Spatels abgelöst, mit kaltem PBS gewaschen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße (2,0 ml) überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (16.200 g, 1 min), ein weiteres Mal gewaschen, der Überstand abgenommen und das getrocknete Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin® RNA Kits II entsprechend der Herstellerangaben. Die Bestimmung von RNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte mittels eines Spektralphotometers vom Typ NanoDrop 2000c.

8.3.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von RNA zu cDNA wurde 1 µg RNA mittels RevertAid H Minus M-MuLV RT Kit in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RNA in einem ersten Reaktionsschritt für 15 min bei 65 °C in Gegenwart von 200 ng/µl Random Hexameren, 500 ng/µl Oligo(dT)₁₈-Primern und 10 mM dNTPs denaturiert. Danach wurden weitere 4 µl RT Puffer (5 x), 0,5 µl Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl), 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV RT und 2,5 µl H₂O zugefügt und die reverse Transkription unter Verwendung des Standardprogramms des Herstellers (Tabelle 13) durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde bis zu ihrer Analysierung mittels qRT-PCR bei - 20 °C gelagert.

Temperatur [°C]	Zeit [min]
25	10
42	60
72	10
4	∞

Tabelle 13: PCR-Programm für die reverse Transkription

8.3.3 Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Analyse der Genexpressionsstärke von verschiedenen Zielgenen (Tabelle 6) wurde quantitative Realtime PCR (qRT-PCR) verwendet. Pro Zelllinie wurden Dreifachwerte mit 4 oder 20 ng cDNA mit 300 nM Vorwärts- und 300 nM Rückwärtsprimern und 2x SYBR Green Master Mix in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Verwendung eines LC480 II qPCR-Cyclers analysiert (Tabelle 14). Die Quantifizierung der Expressionswerte erfolgte anhand der ΔC_t -Methode. Die C_t -Werte der Zielgene (20 ng und 4 ng) wurden auf den Mittelwert der C_t -Werte der Referenzgenmatrix aus 18S rRNA, β_2 -Mikroglobulin und δ -ALAS normalisiert.

Temperatur [°C]	Zeit [min : sec]	Anzahl des Zyklus
95	10:00	1x
95	00:15	45x
60	00:30	

Tabelle 14: PCR-Programm für die quantitative Realtime PCR

8.4 Festphasenbindungsassay

Fluoreszenz-markierte, gegen CD44v6-gerichtete Aptamere wurden hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber dem Peptid CD44v6-14mer oder eines CD44v6-Vollängenpeptids analysiert. Dazu wurden His-Tag-markierte Peptide (CD44v6-14mer, 40 pmol je Kavität) oder CD44v6-Vollängenpeptid (20 pmol/ Kavität) für 1 h bei Raumtemperatur an eine nickelbeschichtete 96-well-Mikrotiterplatte gebunden. Die Platte wurde danach zweifach mit PBS (+ 5 mM MgCl₂) gewaschen und Aptamer in aufsteigenden Konzentrationen (0,244 nM, 0,976 nM, 3,9 nM, 15,625 nM, 62,5 nM, 250 nM, 1 nM oder 0,064 nM, 0,32 nM, 1,6 nM, 8 nM, 40 nM, 200 nM, 1 µM) auf die Platte gegeben. Diese wurde daraufhin für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, ehe die Überstände auf eine neue unbeschichtete 96-well-Platte überführt und ungebundenes Aptamer fluorometrisch gemessen wurde (Exzitation 548 nm, Emission 561 nm). Die nickelbeschichtete Platte wurde anschließend zweifach gewaschen (PBS + 5 mM MgCl₂), mit 100 µl PBS befüllt und ebenfalls fluorometrisch analysiert. Die Quantifizierung der Cy3-Fluoreszenz als Maß für die Menge von gebundenem Aptamer erfolgte durch Berechnung der Differenz zwischen dem Mittelwert der Replikate und dem der Leerkontrolle.

8.5 Statistische Analysen

Statistische Rechnungen wurden mittels der Software Graphpad Prism (Version 7.0d) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt und bei multipler Testung gemäß der Methode nach Bonferroni-Holm korrigiert. Die Angabe des p-Wertes erfolgt grundsätzlich nur bei Versuchsreihen mit drei oder mehr biologischen Replikaten. Für Korrelationsanalysen nach Pearson wurden folgende Wertebereiche definiert:

Pearson's Korrelationskoeffizient	Bewertung
$R \leq 0,2$	sehr geringe Korrelation
$0,2 < R \leq 0,5$	geringe Korrelation
$0,5 < R \leq 0,7$	mittlere Korrelation
$0,7 < R \leq 0,9$	hohe Korrelation
$0,9 < R \leq 1,0$	sehr hohe Korrelation

Tabelle 15: Bewertung von Korrelationskoeffizienten nach Pearson

Die hierarchische Clusteranalyse der qRT-PCR Daten (Euklidische Distanzmethode) wurde mittels der Software Morpheus durchgeführt (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

9 Ergebnisse

9.1 Humane HNSCC-Zelllinien unterscheiden sich in ihrer Expression von CD44v6 und dessen Co-Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit sollte CD44v6 als Zielstruktur für eine molekular zielgerichtete Therapie unter Verwendung CD44v6-kompetitierender Peptide in Kombination mit Bestrahlung in HNSCC Zellen in vitro evaluiert werden. Um dafür Zelllinien mit divergenter Expression von CD44v6 auszuwählen, wurden insgesamt zwölf humane HNSCC-Zelllinien durchflusszytometrisch auf die Oberflächenproteinexpression von CD44, CD44v6, EGFR und c-Met untersucht (Abbildung 10A). Zum Vergleich verschiedener Entitäten (HNSCC vs. PDAC) und Definition einer Referenzzelllinie, in der der Effekt des kompetitierenden Peptids bereits gezeigt werden konnte, wurden auch neun humane Pankreaszelllinien hinsichtlich der Oberflächenexpression von CD44v6, CD44 und c-Met untersucht (Daten nicht gezeigt) [61].

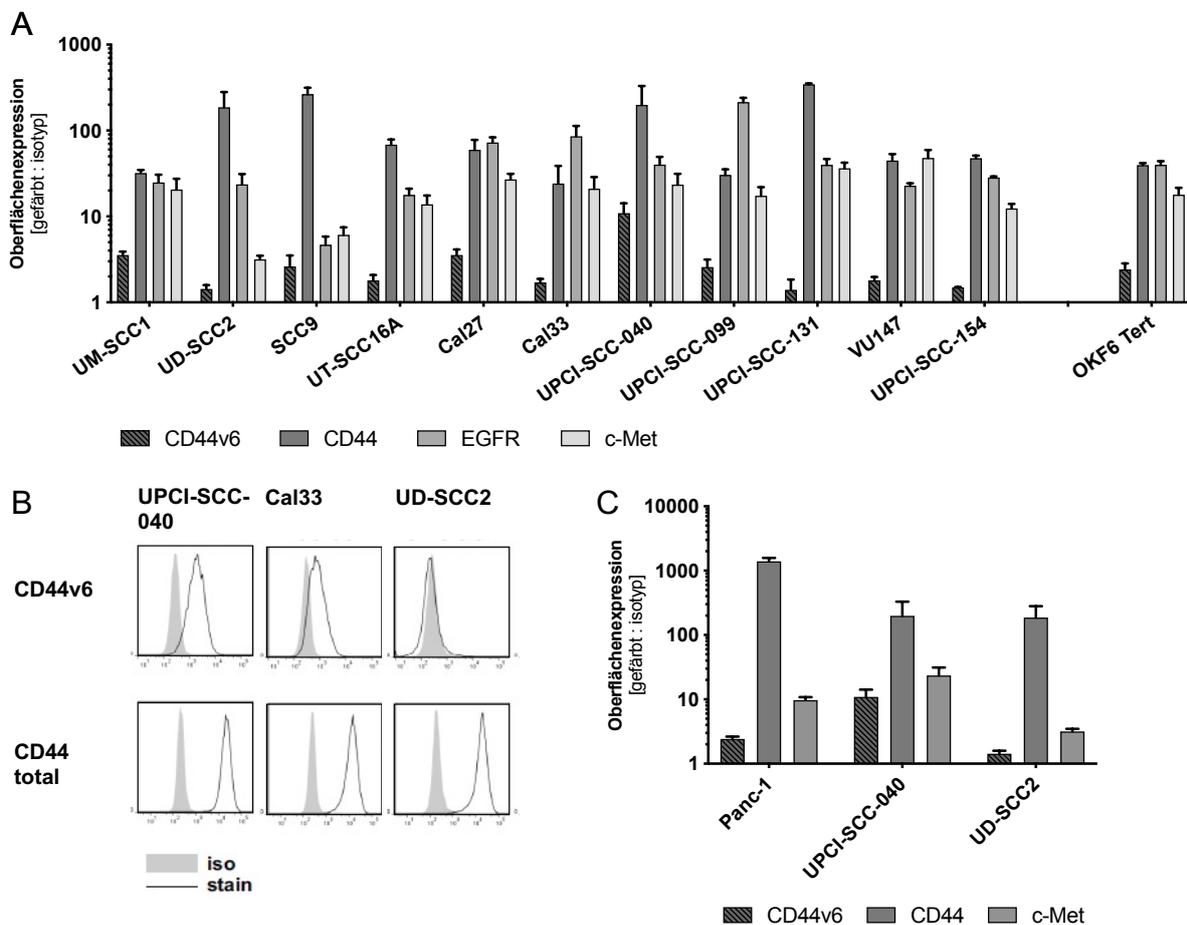


Abbildung 10: Oberflächenproteinexpression von CD44v6, CD44, EGFR und c-Met in einem repräsentativen Panel humaner HNSCC-Zelllinien. A: Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenproteinexpression von

CD44v6, CD44 (gesamt), EGFR und c-Met. Als Normalgewebekontrolle wurden immortalisierte Keratinozyten der Mundschleimhaut (OKF6) verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. **B:** Darstellung der Histogramme von CD44 und CD44v6 für durchflusszytometrische Messungen von UPCI-SCC-040, Cal33 und UD-SCC2 (Ulrike Schötz, unveröffentlichte Daten). **C:** Vergleich der Oberflächenexpression von CD44v6, CD44 und c-Met zwischen humanen HNSCC- und PDAC-Zelllinien (Panc-1). Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Von den getesteten Zelllinien zeigte die Linie UPCI-SCC-040 eine 4,5-fach höhere Expression von CD44v6 als die als Normalgewebekontrolle verwendete, immortalisierte Keratinozytenlinie OKF6 und damit wurde bei UPCI-SCC-040 die höchste Expression des gesamten Panels gemessen. Ihre Expression von CD44v6 lag 5-fach über der medianen Expression des Gesamtpanels. Zellen der Linien UD-SCC2 und UPCI-SCC-131 zeigten hingegen die niedrigste Expression von CD44v6 innerhalb des Panels. Für EGFR wurde die höchste Expression in UPCI-SCC-090-Zellen gemessen und die niedrigste in SCC9 Zellen, für c-Met die höchste in VU-147 und die niedrigste in UD-SCC2. Da keinerlei Korrelation zwischen der Genexpression von pan-CD44 und CD44v6 in dem HNSCC-Zelllinienpanel erhalten werden konnte (Pearsons $R = 0,143$, $p = 0,673$) erfolgte die Auswahl von Zelllinien für nachfolgende Experimente primär nach Expressionsstärke von CD44v6 und unter Einbeziehung von Daten aus den Vorarbeiten zu dieser Arbeit, nach CD44v6-vermittelter Radioresistenz (Abbildung 4). Da die Zelllinie UPCI-SCC-040 die mit Abstand höchste Expression von CD44v6 und ebenfalls die höchste Radioresistenz innerhalb des Panels aufwies, während die Linie UD-SCC2 nahezu keine detektierbare CD44v6-Expression zeigte und sich als radiosensitivste Zelllinie des Panels herausstellte (Abbildung 10A), wurden diese beiden Linien für nachfolgende Experimente ausgewählt. Die Zelllinie Cal33 lag sowohl was die CD44v6-Expression als auch was ihre intrinsische Radioresistenz anbetraf im mittleren Bereich des getesteten Zelllinienpanels, weshalb sie ebenfalls für die nachfolgenden Experimente ausgewählt wurde.

Zum Vergleich der Oberflächenexpression von CD44v6 in HNSCC und PDAC, wurden diejenigen Zelllinien mit der höchsten Expression ausgewählt (Abbildung 10C). Die Oberflächenexpression von CD44v6 in Panc-1 war gegenüber der für UPCI-SCC-040 erhaltenen Expression deutlich reduziert, wohingegen die Expression von Gesamt-CD44 in Panc-1 Zellen gegenüber UPCI-SCC-040 erhöht war. Die c-Met Expression war in UPCI-SCC-040 zwar 2,4-fach so hoch wie in Panc-1, jedoch war die Ratio der Expression von c-Met zu CD44v6 bei Panc-1 4:1, während diese bei UPCI-SCC-040 nur bei 2:1 lag. Als Vergleichspunkt diente somit die pankreatische duktales Adenokarzinomzelle Panc-1, die von allen neun PDAC-Zelllinien die höchste

Oberflächenexpression von CD44v6 aufwies. Zusätzlich konnten Orian-Rousseau et. al. in dieser Zelllinie die Inhibition von Proliferation, Migration und Invasion durch das CD44v6-sepizifische Peptid zeigen [61].

9.2 Evaluierung von CD44v6-kompetitierenden Peptiden im Rahmen einer kombinierten Radiochemotherapie in HNSCC-Zellen

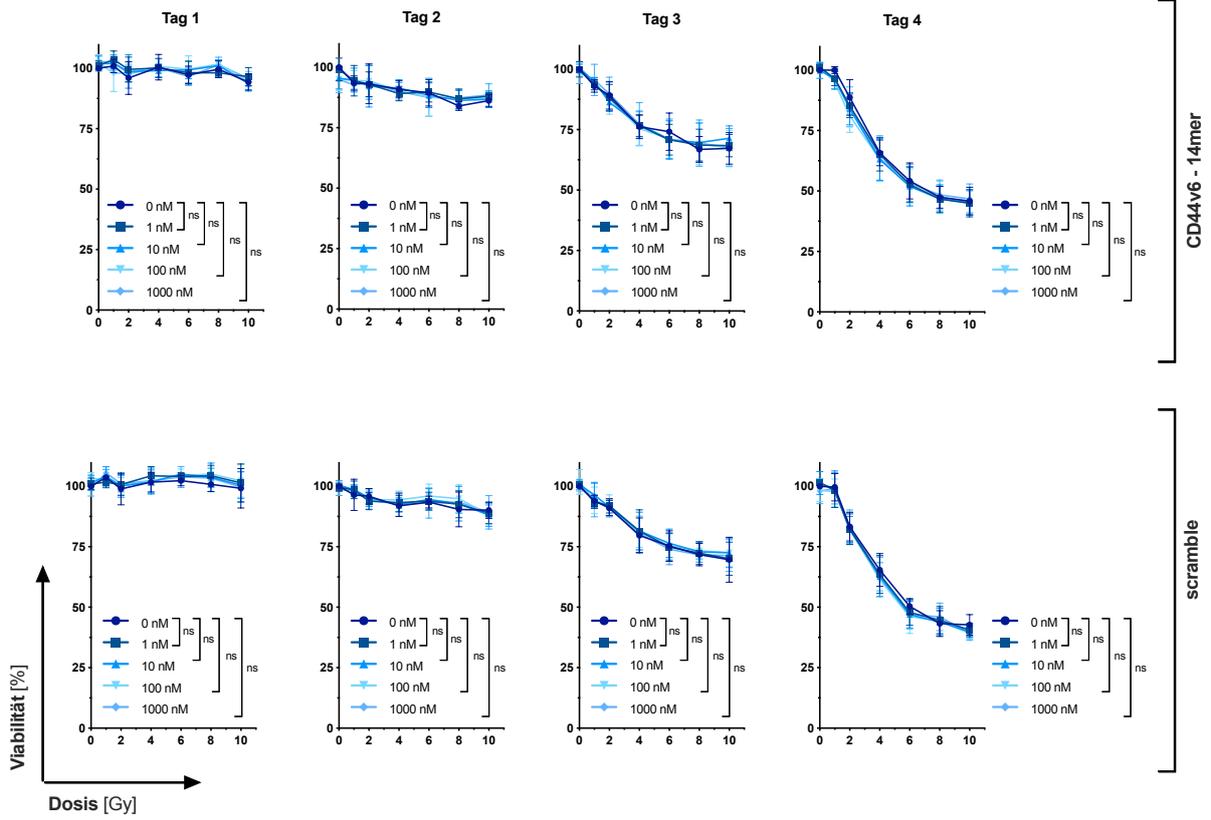
In den nachfolgenden Experimenten wurde der Effekt einer kombinierten Radiochemotherapie, bestehend aus der Verabreichung eines CD44v6-kompetitierenden Peptids und Bestrahlung, an den zuvor festgelegten HNSCC-Zelllinien evaluiert. Dazu wurden die Endpunkte Viabilität, klonogenes Überleben, Proliferation, Zellzyklus, Seneszenz und Apoptose analysiert.

9.2.1 CD44v6-kompetitierende Peptide haben keinen Einfluss auf die Viabilität von HNSCC-Zellen nach Bestrahlung

Nach der Auswahl der Zelllinien (UPCI-SCC-040, Cal33, UD-SCC2) wurde als erstes die Viabilität dieser Linien nach der Behandlung mit dem CD44v6-spezifischen Peptid (14mer) und Bestrahlung untersucht. Dazu wurden UPCI-SCC-040- und Cal33-Zellen mit Konzentrationen des Peptids von 0, 1, 10, 100 oder 1.000 nM über 4 d hinweg behandelt und mit Dosen von 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt. Für beide Zelllinien wurde eine Abnahme der Viabilität in Abhängigkeit von der Strahlendosis, nicht aber in Abhängigkeit der Peptidbehandlung festgestellt (Abbildung 11A). So betrug die Abnahme der Viabilität in UPCI-SCC-040-Zellen an Tag 4 nach 10 Gy 55 % für das CD44v6-14mer-Peptid und 60 % für das Kontrollpeptid. Demzufolge hatte die Behandlung mit CD44v6-spezifischem Peptid keinen Einfluss auf die Viabilität, zumindest in der CD44v6-überexprimierenden Zelllinie UPCI-SCC-040. Aus diesem Grund wurde daher das Experiment mit der moderat CD44v6-exprimierenden Zelllinie Cal33 wiederholt. Dabei konnte ebenfalls kein Effekt des CD44v6-kompetitierenden Peptids festgestellt werden (Abbildung 11B). Auf die Wiederholung des Experiments unter Verwendung der dritten Zelllinie (UD-SCC2) wurde verzichtet, da aufgrund deren minimaler CD44v6-Expression keine durch das CD44v6-kompetitierende Peptid bedingten Effekte zu erwarten waren. Für weiterführende Experimente wurde fortan

eine Peptidkonzentration 100 nM verwendet, da diese Konzentration gemäß der erhaltenen Daten (Abbildung 11) keine eigenständige Toxizität zeigte. Im Übrigen wurden ähnliche Konzentrationen des CD44v6-kompetitierenden Peptids (100 ng/ml \approx 50 nM bzw. 0,025 - 0,05 μ M = 35 - 50 nM) bereits in anderen Studien erfolgreich eingesetzt, allerdings mit Fokus auf anderen Endpunkten, wie Inhibition der Migration, Gefäßaussprossung, Tumervaskularisierung sowie Tumorwachstum und Metastasierung in vivo [60], [61].

A UPCI-SCC-040



B Cal33

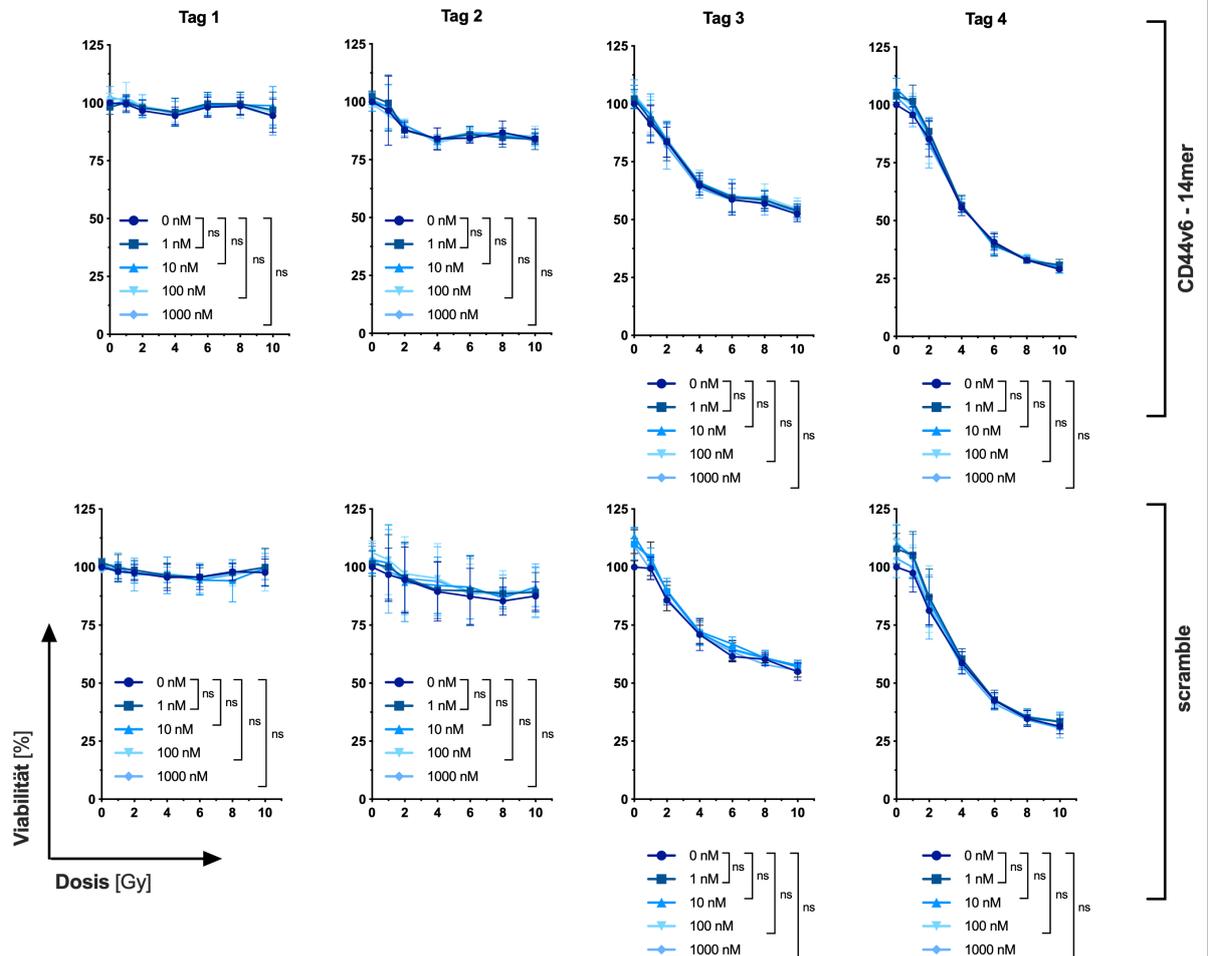


Abbildung 11: CD44v6-kompetitierende Peptide beeinflussen die Viabilität der HNSCC-Zelllinien UPCI-SCC-040 und Cal33 nach Bestrahlung nicht. **A:** UPCI-SCC-040-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen CD44v6-kompetitierenden Peptids oder Kontrollpeptids behandelt und mit Dosen von 0 - 10 Gy bestrahlt. Die Viabilität wurde mittels Alamar Blue® Assay in Intervallen von 24 h über 4 d hinweg gemessen. Die Ergebnisse wurden auf unbehandelte Zellen (100 % Viabilität) kalibriert und als Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die p-Werte wurden für die Mittelwerte des Wertebereichs von 1 - 10 Gy durch 2-way-ANOVA mit Bonferroni-Holm-Korrektur berechnet. **B:** Cal33-Zellen wurden analog wie für UPCI-SCC-040 beschrieben, behandelt und über 4 d hinweg analysiert. Die Auswertung erfolgte wie in A beschrieben.

9.2.2 Proliferation und klonogenes Überleben werden nicht durch CD44v6-kompetitierende Peptide beeinflusst

Als Nächstes wurde die Proliferation der CD44v6-überexprimierenden Zelllinie UPCI-SCC-040 nach einer Behandlung mit dem CD44v6-kompetitierendem Peptid oder dem Kontrollpeptid untersucht. Dazu wurde in zeitlich definierten Abständen die Anzahl der Zellen in einem definierten Volumen mittels Neubauer Zählkammer bestimmt (Abbildung 12A). Die gemessenen Verdopplungszeiten lagen nach der Behandlung mit CD44v6-kompetitierendem Peptid bei 24 h, für das Kontrollpeptid wurden 25 h gemessen; für die Abwesenheit beider Peptide wurde eine Verdopplungszeit von 23 h erhalten. Es konnte kein wesentlicher Einfluss der beiden Peptide auf die Proliferation von UPCI-SCC-040-Zellen festgestellt werden, weder für das CD44v6-spezifische Peptid, noch für das Kontrollpeptid (Abbildung 12A). Auf die Wiederholung der Analyse in den beiden anderen Zelllinien wurde daher verzichtet, da in diesen aufgrund der deutlich niedrigeren CD44v6-Expression mit keinem höheren Effekt der Peptide zu rechnen war.

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob die Applikation des CD44v6-kompetitierenden Peptids die intrinsische Radioresistenz der CD44v6-überexprimierenden HNSCC-Zelllinie UPCI-SCC-040 beeinflusst. Die Analyse des klonogenen Überlebens dient der Vorhersage der Strahlenantwort und wird durch den jeweiligen intrinsischen Grad der Radioresistenz einer Zell-/Tumorentität bedingt [80], [81]. UPCI-SCC-040-Zellen wurden hierzu mit 100 nM CD44v6-spezifischem Peptid oder Kontrollpeptid vorbehandelt, mit verschiedenen Strahlungsdosen (0 - 10 Gy) bestrahlt und nach einer 11-tägigen Inkubation das klonogene Überleben der Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 12B gut zu erkennen ist, konnte eine klare Reduktion von klonogenem Überleben durch die Bestrahlung per se erhalten werden, ein merklicher Einfluss der untersuchten Peptide konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 12B).

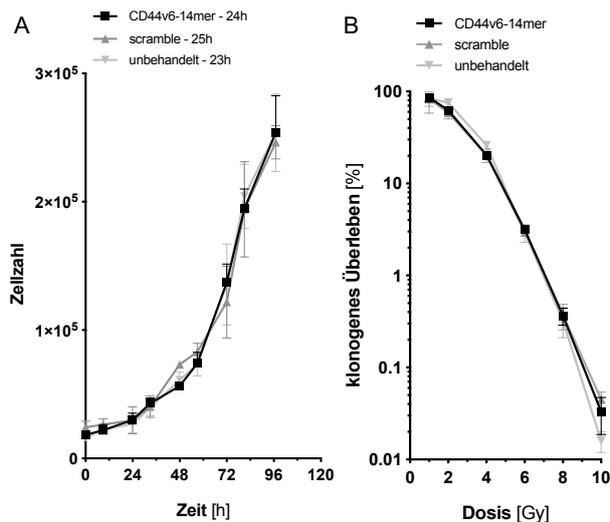


Abbildung 12: Proliferation und klonogenes Überleben von UPCI-SCC-040-Zellen nach Bestrahlung werden durch das CD44v6-kompetitierende Peptid nicht beeinflusst. **A:** Proliferation. UPCI-SCC-040-Zellen wurden mit CD44v6-kompetitierendem Peptid oder Kontrollpeptid in einer Konzentration von 100 nM behandelt und in Intervallen von 10 - 12 h mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachwerten mit Standardabweichung. Die Berechnung der Verdopplungszeiten (24 h, 25 h, 23 h) bei unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten (scramble, 14mer und unbehandelt) erfolgte aus der Steigung der Kurve. **B:** Klonogenes Überleben nach Bestrahlung. UPCI-SCC-040-Zellen wurden nach 4-stündiger Adhärenzzeit bestrahlt (0 - 10 Gy) und über einen Zeitraum von 5 d täglich mit CD44v6-kompetitierendem Peptid oder Kontrollpeptid in einer Konzentration von 100 nM behandelt. Nach 11 d Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Kolonien mittels eines Stereomikroskops gezählt. Die Berechnung der Überlebensfraktionen erfolgte durch Normalisierung auf die unbestrahlte Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Zwei- bis Dreifachwerten mit Standardabweichung.

9.2.3 CD44v6-kompetitierende Peptide haben keinen Einfluss auf den Zellzyklus CD44v6-überexprimierender HNSCC-Zellen

Um den möglichen Einfluss des CD44v6-kompetitierenden Peptids auf die Zellzyklusverteilung CD44v6-überexprimierender Zellen zu untersuchen, wurden UPCI-SCC-040-Zellen einer Kombinationsbehandlung aus unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und Gabe des entsprechenden Peptids unterworfen und diejenigen Zellen, die sich in der G2/M-Phase des Zellzyklus befanden, quantifiziert. Als Kontrollen dienten sowohl unbehandelte Zellen als auch Zellen, die mit dem Kontrollpeptid behandelt worden waren. Dabei zeigte sich, dass mit steigender Strahlendosis in einem Zeitfenster von 6 - 36 h nach Bestrahlung der Anteil an Zellen in G2/M-Phase zunimmt (Abbildung 13). Der Anteil von G2/M-Zellen innerhalb der Gesamtpopulation erreichte 24 h nach Bestrahlung besonders bei höheren Strahlendosen (6 – 10 Gy) sein Maximum, danach nahm dieser Anteil wieder ab. Bei niedrigeren Strahlendosen (2 und 4 Gy) lag das Maximum hingegen schon nach 12 h vor und nahm danach wieder ab. Wie schon in den vorausgegangenen Versuchen konnte für die zu untersuchten Peptide kein messbarer Effekt, in diesem Fall auf die Zellzyklusprogression nach Bestrahlung, nachgewiesen werden.

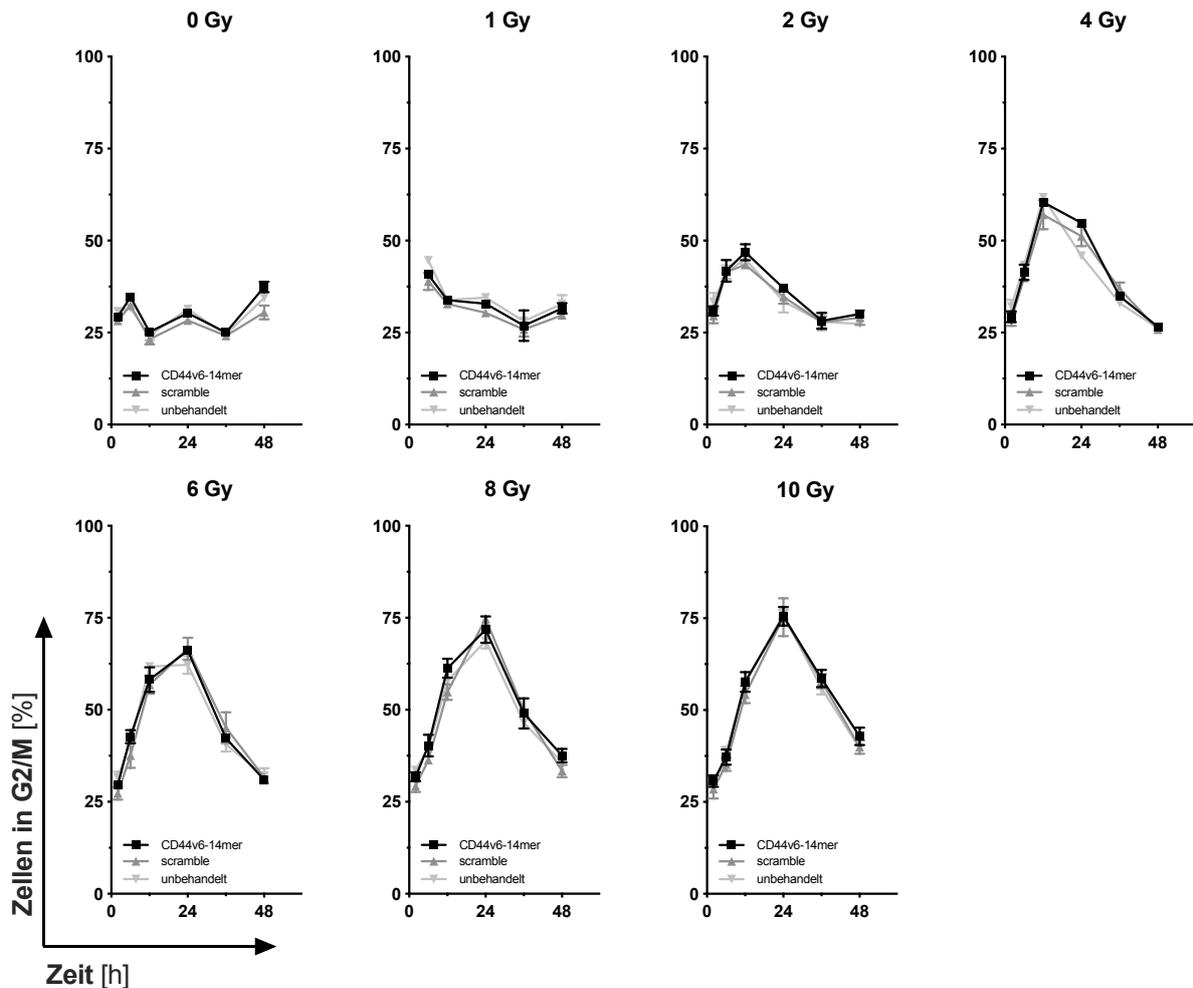


Abbildung 13: Zellzyklusprogression von UPCI-SCC-040-Zellen nach Bestrahlung in Gegenwart und Abwesenheit CD44v6-kompetitierender Peptide. UPCI-SCC-040-Zellen wurden mit Dosen von 0 - 10 Gy bestrahlt und mit dem CD44v6-kompetitierenden Peptid (14mer; 100 nM) oder dem Kontrollpeptid behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und ihr DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind Prozentsätze der Zellen in G2/M-Phase als Mittelwerte aus Zwei- bis Dreifachwerten mit Standardabweichung.

9.2.4 Strahlungsinduzierte Apoptose und – Seneszenz werden nicht durch CD44v6-kompetitierende Peptide beeinflusst

Ionisierende Strahlung induziert Schäden auf der DNA, die von der sogenannten DNA-Schadensantwort (DNA Damage Repair, DDR) erkannt und repariert werden, und bei größerem Ausmaß zu Zellzyklusarrest, Seneszenz und/oder programmiertem Zelltod (Apoptose) führen [82].

Um diese Reaktionen auf die strahlungsinduzierte Schädigung der DNA in UPCI-SCC-040-Zellen in Gegenwart CD44v6-kompetitierender Peptide zu analysieren, wurden Apoptose und Seneszenz nach entsprechender Behandlung durchflusszytometrisch über vier Tage hinweg gemessen (Abbildung 14), wobei mit Kontrollpeptid behandelte Zellen sowie unbehandelte Zellen als Kontrollen verwendet wurden. Dabei konnte eine

gleichermaßen zeit- sowie dosisabhängige Zunahme von Zellen mit einem subdiploiden DNA-Gehalt (SubG1) und damit von apoptotischen Zellen gezeigt werden (Abbildung 14A). So betrug der Anteil apoptotischer Zellen am vierten Tag nach alleiniger Bestrahlung etwa 50 %, eine Steigerung dieses Werts durch die Behandlung mit CD44v6-kompetitierendem Peptid konnte jedoch nicht erreicht werden (Abbildung 14A). Ein weitgehend analoges Ergebnis wurde für die Bestimmung seneszenten Zellen erhalten (Abbildung 14B). Auch hier konnte keine Steigerung des Anteils seneszenten Zellen durch die Behandlung mit dem CD44v6-kompetitierenden Peptid beobachtet werden (Abbildung 14B). Somit muss zusammenfassend festgestellt werden, dass eine Behandlung der CD44v6-überexprimierenden HNSCC-Zelllinie UPCI-SCC-040 mit CD44v6-kompetitierendem Peptid zu keiner Modulation der strahlungsbedingten Induktion von Apoptose und Seneszenz in dieser Zelllinie führt, was die zur Viabilität und Klonogenität erhaltenen Ergebnisse (Abbildung 11 und Abbildung 12) ergänzt und teilweise erklärt.

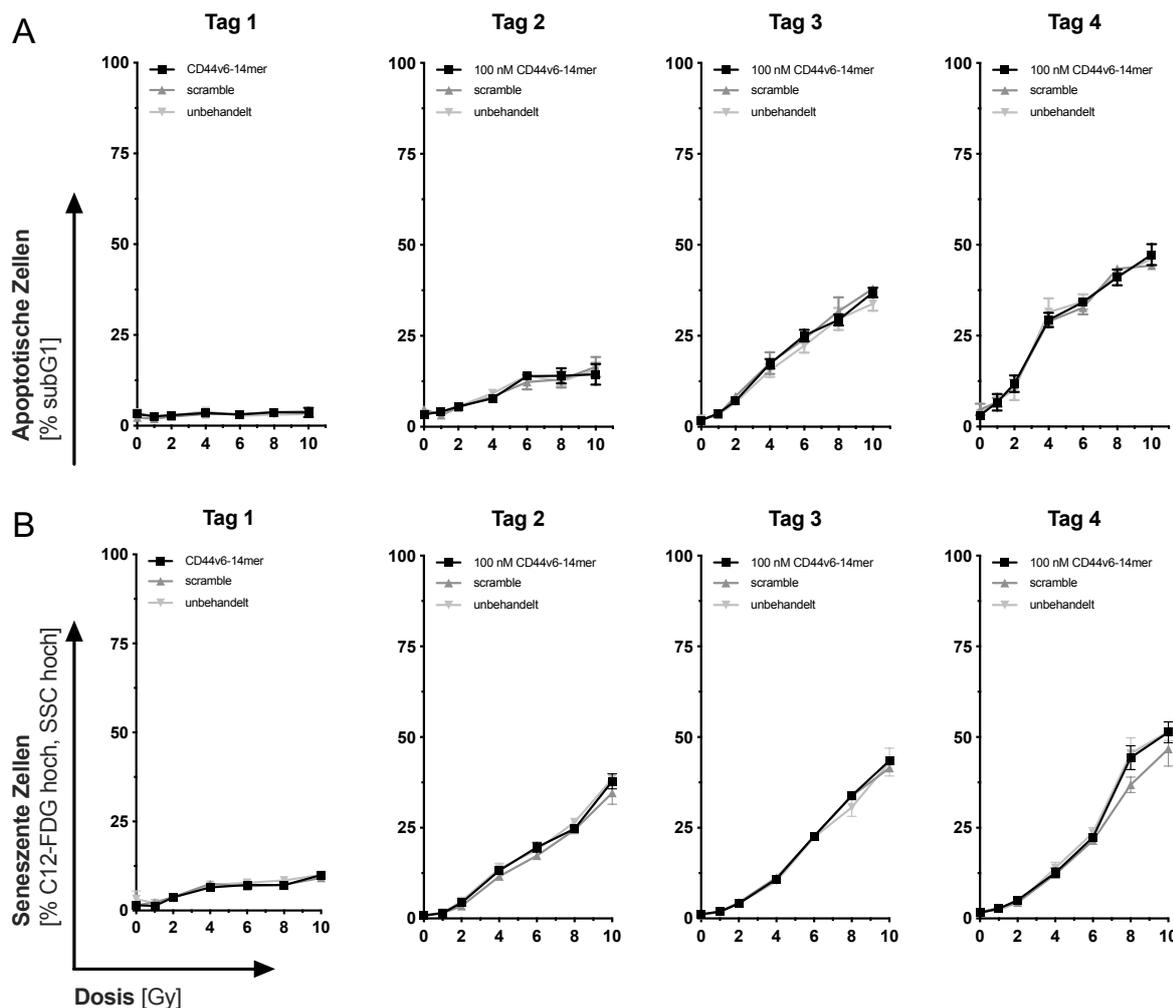


Abbildung 14: Induktion von Apoptose und Seneszenz in UPCI-SCC-040-Zellen nach Bestrahlung und Behandlung mit CD44v6-kompetitierendem Peptid. **A:** Apoptose-(SubG1-)Induktion. UPCI-SCC-040-Zellen wurden mit 0 - 10 Gy bestrahlt und mit CD44v6-kompetitierendem Peptid oder Kontrollpeptid (jeweils 100 nM) behandelt. Apoptotische Zellen wurden mittels PI-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Angegeben sind Prozente subdiploider (SubG1) Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung. **B:** Seneszenz-Induktion. Seneszenten Zellen wurden mittels enzymatischer Umsetzung von C12FDG und Durchflusszytometrie bestimmt. Angegeben sind die Prozente von Zellen mit hohen Signalintensitäten im C12FDG-/SSC-Kanal. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

9.3 Etablierung spezifischer CD44v6-Aptamere

Nachdem die Applikation CD44v6-kompetitierender Peptide für keinen der untersuchten Endpunkte (Viabilität, Zellproliferation, Klonogenität, Apoptose, Seneszenz) relevante Effekte zeigte, wurden als nächstes RNA-Aptamere, die aufgrund ihres Designs spezifisch an CD44v6 binden sollten, hinsichtlich ihrer Wirkung auf HNSCC-Zellen in Kombination mit Bestrahlung untersucht. Die dafür verwendeten Aptamere wurden in Kollaboration mit der Inneren Medizin II unter Leitung von Frau Professor Dr. J. Mayerle durch *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX)* generiert. Das Ziel dieses Behandlungsansatzes war es, radiosensibilisierende Chemotherapeutika wie beispielsweise 5-Fluorouracil (5-FU) durch deren Inkorporierung innerhalb der Sequenz der Aptamere spezifisch in solche Tumorzellen einzuschleusen, die eine Überexpression von CD44v6 zeigten. Dadurch, so die Hypothese, sollte der Grad an systemischer Toxizität und der Nebenwirkungen im Vergleich zu aktuellen Behandlungsregimen (systemische Applikation entsprechender Chemotherapeutika) verringert werden [6], [83].

Die Herstellung der Aptamere erfolgte anhand His-Tag-gekoppelter Peptide, entweder dem in den vorangegangenen Experimenten verwendeten CD44v6-14mer-Peptid oder einem 42mer-Peptid, das der vollständigen Aminosäuresequenz des v6-Exons von CD44v6 entsprach. Die Aptamere bestanden jeweils aus 39 bis 58 konstanten und 25 variablen Nukleotiden, wodurch verschiedene Sekundärstrukturen erhalten werden konnten (Abbildung 15B). Um deren Spezifität und Affinität der Aptamere gegenüber CD44v6 zu verifizieren, wurde His-Tag-gekoppeltes Peptid an nickelbeschichtete Mikrotiterplatten gebunden und die Bindung von Cy3-fluorophormarkierten Aptameren durch eine Titration derselben in Form einer logarithmischen Konzentrationsreihe fluorometrisch bestimmt (Abbildung 15A). Dabei konnte für keines der getesteten Aptamere (Aptamere Nr. 1, 2, 5, 14) eine spezifische Bindung nachgewiesen werden

(Abbildung 15A). Ergänzend wurden die Aptamere hinsichtlich ihrer Aufnahme in CD44v6-überexprimierende UPCI-SCC-040-Zellen und CD44v6-defiziente UD-SCC2-Zellen mittels einer weiteren Titrationsreihe untersucht (Abbildung 15C). Dabei konnte ebenfalls keine spezifische Bindung der Aptamere nachgewiesen werden; dies wurde unter anderem daran erkennbar, dass die zu untersuchenden Peptide an UPCI-SCC-040- und UD-SCC2-Zellen trotz deren stark divergentem CD44v6-Expressionsstatus mit nahezu identischer Affinität banden, was darauf schließen lässt, dass die Bindung der Aptamere an diese Zellen nicht durch eine spezifische Bindung an auf der Zelloberfläche exponiertes CD44v6 vermittelt werden konnte (Abbildung 15C). Ferner spricht ebenfalls die Tatsache, dass für alle vier Peptide erst bei den höchsten Konzentrationen eine Bindung erhalten werden konnte, gegen eine spezifische Bindung an UPCI-SCC-040- und UD-SSC2-Zellen. Aus diesem Grund wurde eine neue Charge von Aptameren unter Verwendung des Volllängenpeptids (42mer) der in Variante 6 eingespleißten Primärsequenz generiert. Die dabei erhaltenen Aptamere (1.ml, 2.ml, 13.ms) wurden abermals mittels Festphasenbindungsassays hinsichtlich ihrer Affinität und Spezifität gegenüber CD44v6 überprüft und mit den zuvor negativ getesteten Aptameren verglichen (Abbildung 16). Leider konnte auch in diesem Fall keine spezifische Bindung der Aptamere an CD44v6-Peptide festgestellt werden, weshalb auf eine zellbiologische/funktionelle Untersuchung der Aptamere verzichtet wurde. In einem weiteren Ansatz wurde zum Zeitpunkt dieser Arbeit die Generierung neuer Aptamere anhand von rekombinant exprimiertem CD44v6 geplant; eine biochemische/zellbiologische Evaluierung dieser Aptamere war jedoch im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht mehr möglich.

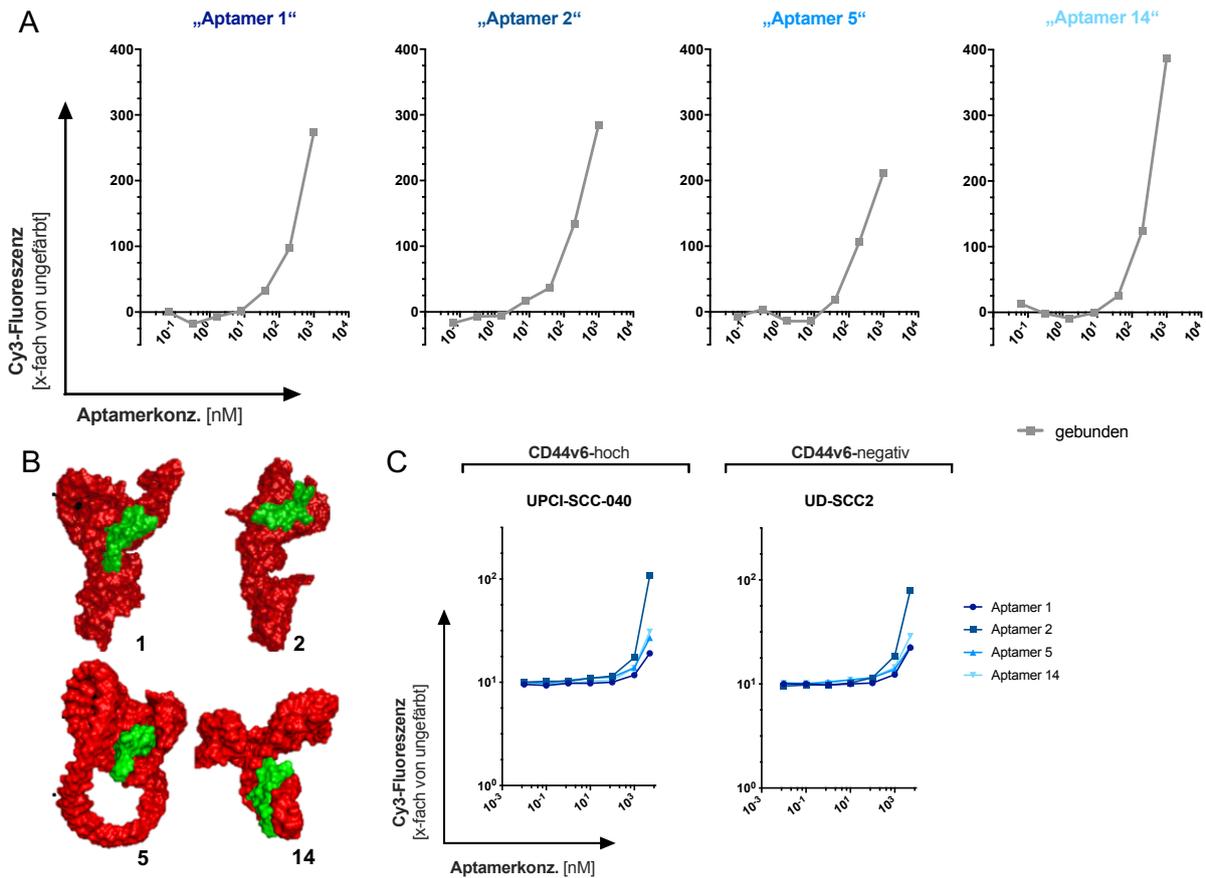


Abbildung 15: Bindungseigenschaften von Aptameren, die mittels SELEX anhand des CD44v6-14mer-Peptids generiert worden waren. A: Festphasenbindungsassay. Eine nickelbeschichtete 96-well-Mikrotiterplatte wurde zunächst mit His-Tag-gekoppeltem CD44v6-Peptid (14mer) beschichtet und danach mit Cy3-markierten Aptameren (Aptamere Nr. 1, 2, 5 und 14) in einer absteigenden Konzentrationsreihe (1,0 μ M – 64 pM) für 2 h bei Raumtemperatur behandelt. Die Fluoreszenz gebundener Aptamere wurde mittels eines Fluoreszenzplattenlesegeräts gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte technischer Replikate. **B:** *In-silico*-Modellierung der Aptamere Nr. 1, 2, 5 und 14 mit deren jeweiliger CD44v6-Binderegion (dargestellt in grün). **C:** Aufnahme der Aptamere Nr. 1, 2, 5 und 14 durch HNSCC-Zellen. UPCI-SCC-040- (hohe CD44v6-Expression) und UD-SCC2-Zellen (CD44v6-Expression unterhalb der Nachweisgrenze) wurden mit Cy3-gekoppelten Aptameren in absteigender Konzentration (5,0 μ M - 10 pM) für 30 min bei Raumtemperatur behandelt und danach durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Cy3-Fluoreszenz analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachwerten des Medians der jeweiligen Cy3-Fluoreszenzintensität.

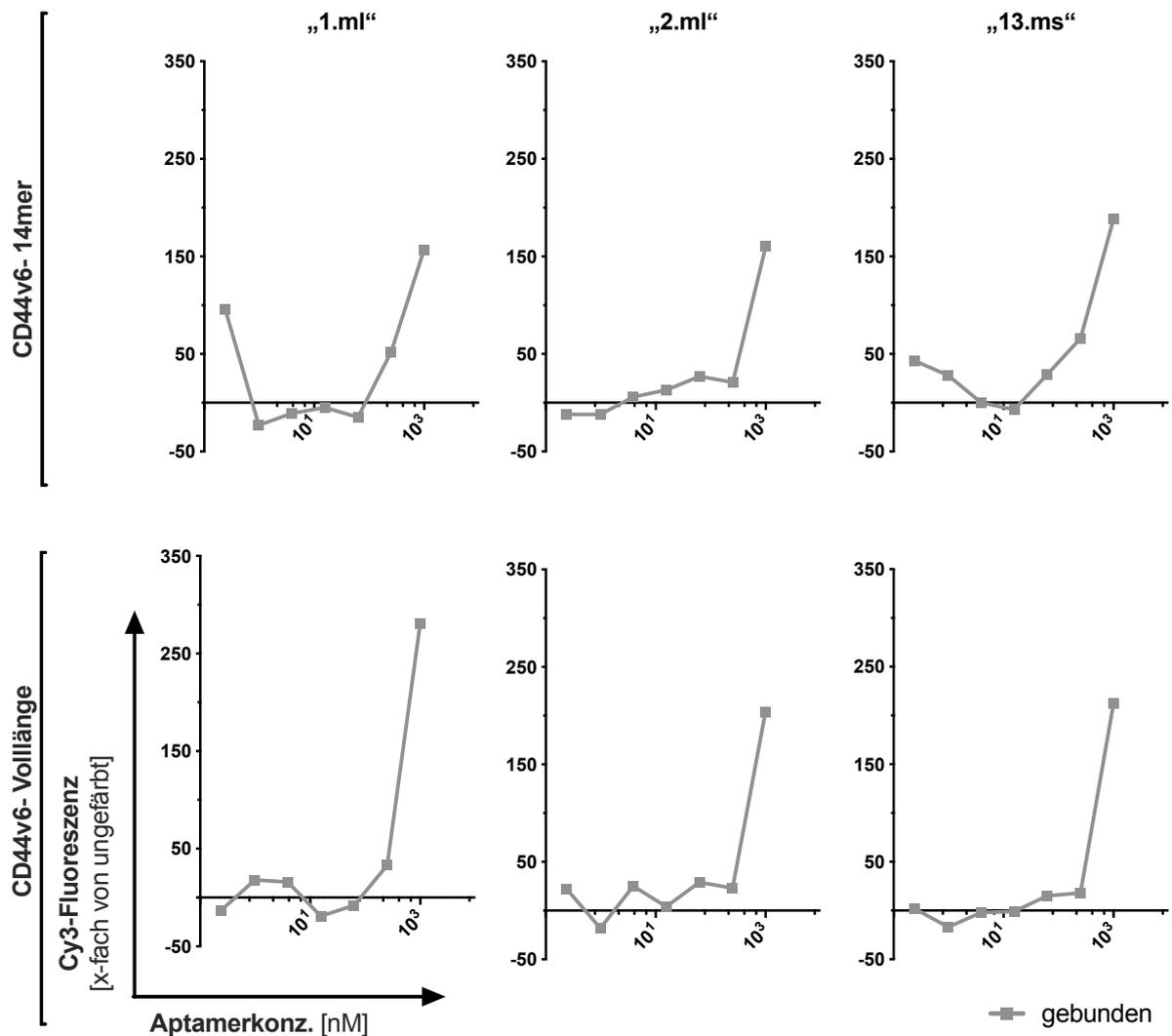


Abbildung 16: Bindungseigenschaften von Aptameren, die anhand des CD44v6-14mer-Peptids (oben) oder des v6-Volllängenpeptids generiert worden waren. Analog zu Abbildung 15 wurden His-Tag-gekoppelte CD44v6-14mer- und CD44v6-42mer-Peptide an nickelbeschichtete 96-well-Mikrotiterplatten gebunden und diese anschließend mit Cy3-gekoppelten Aptameren (1.ml, 2.ml, 13.ms) in absteigender Konzentration (1,0 μM – 240 pM) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Gebundenes Aptamer wurde mittels eines Fluoreszenzplattenlesegeräts quantifiziert; dargestellt sind die Mittelwerte technischer Duplikate.

9.4 CD44v6-Genexpression kann indirekt durch Modulation des TGF β -Signalwegs reguliert werden

Aufgrund der bisher erhaltenen negativen Ergebnisse für direkt auf CD44v6 ausgerichtete Therapieansätze (Behandlung mit CD44v6-spezifischen Peptiden und/oder Aptameren) sollte nun die Möglichkeit einer indirekten Interferenz mit der Funktion von CD44v6 durch Inhibition der Signalwege, die CD44v6 vorangeschaltet sind, getestet werden. Der *Transforming Growth Factor β* (TGF β) ist in der Literatur als Aktivator der

Genexpression von CD44v6 beschrieben [48], [52]. Aus diesem Grund sollte die pharmakologische Inhibition seines Rezeptors, des TGF β -Rezeptors I (TGF β -RI), eine alternative Strategie darstellen, um mit der Expression von CD44v6 – und damit mit der durch CD44v6 vermittelten Radioresistenz zu interferieren.

9.4.1 TGF β -Rezeptorstatus in HNSCC-Zelllinien

Um diese Möglichkeit zu testen, wurde zunächst die basale mRNA-Expression von TGF β 1, TGF β -RI, TGF β -RII, CD44, CD44v6, CD44v3-10, EGFR und c-Met mittels qRT-PCR in dem ursprünglich verwendeten Panel von HNSCC-Zelllinien analysiert (Abbildung 17). Anhand der erhaltenen Daten wurde anschließend eine Clusteranalyse vorgenommen. Diese erlaubte jedoch nur eine Diskriminierung zwischen HNSCC-Zelllinien mit einer hohen Expression von CD44 und/oder CD44v6 und Zelllinien mit einer niedrigen (Abbildung 17A, untere 3 Zeilen). Im Gegensatz wurden für TGF β und seine Rezeptoren ebenso wie für EGFR und c-Met weitgehend homogene Verteilungen der Genexpressionen erhalten (Abbildung 17A, obere 5 Zeilen). Daher wurde die Korrelation der Expressionswerte von TGF β 1/ TGF β -RI/ TGF β -RII und CD44/CD44v6 untersucht (Abbildung 17B); es konnten jedoch nur schwache Korrelationen identifiziert werden, wie beispielsweise zwischen CD44v6 und TGF β -RII (R = 0,44; gering) oder zwischen c-Met und TGF β -RI (R = 0,54; mittel).

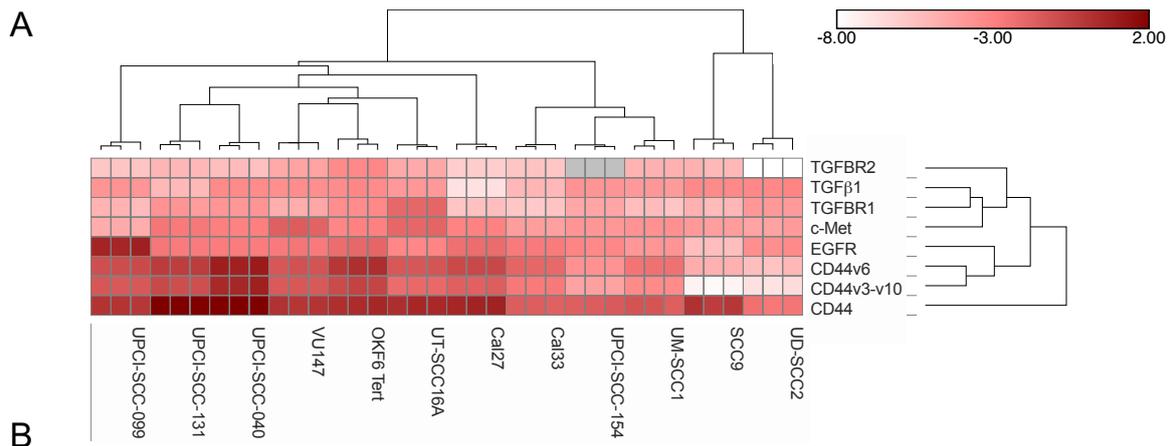


Abbildung 17: Analyse der mRNA-Expression von TGFβ1, TGFβRI, TGFβRII, c-Met, EGFR, CD44, CD44v6 und CD44v3-10 in humanen HNSCC-Zellen und Korrelation dieser Expressionswerte. A: Hierarchische Clusteranalyse der mRNA-Expression von TGFβ1, TGFβRI, TGFβRII, c-Met, EGFR, CD44, CD44v6 und CD44v3-10 in humanen HNSCC-Zelllinien, gemessen mittels qRT-PCR und normalisiert auf die Expression von 18S rRNA, β₁-Mikroglobulin und δ-ALAS. Dargestellt sind drei Replikate je Zelllinie. **B:** Pearson's Korrelation der Genexpressionswerte von TGFβ1, TGFβRI, TGFβRII, c-Met, EGFR, CD44, CD44v6 und CD44v3-10 in humanen HNSCC-Zelllinien.

Parallel wurde die Oberflächenproteinexpression der Rezeptoren TGFβ-RI und TGFβ-RII gemeinsam mit den bereits zuvor charakterisierten Rezeptoren (CD44, CD44v6, EGFR, c-Met) durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnte für alle zwölf zu untersuchenden Zelllinien eine positive Oberflächenexpression von TGFβ-RI nachgewiesen werden, während die Expression für TGFβ-RII in allen zwölf Zelllinien zwischen niedrig und nicht detektierbar schwankte (Abbildung 18). Dennoch wurde analog der Beschreibung für die mRNA-Expression eine Korrelationsanalyse vorgenommen, um Korrelationen in den Oberflächenexpressionen der getesteten Rezeptoren zu detektieren (Abbildung 18B). Dabei konnte jedoch lediglich für TGFβ-RII und c-Met eine statistisch signifikante Korrelation (p-Wert < 0,05) der Oberflächenprotein-expressionen festgestellt werden (R = 0,72, p = 0,009). Schließlich wurden die Proteinexpressionen der einzelnen Rezeptoren mit deren jeweiligen mRNA-Expressionswerten korreliert (Abbildung 18C), wobei nur im Fall von EGFR und c-Met (R = 0,88, R = 0,65) Korrelationskoeffizienten R > 0,6 zwischen mRNA- und Proteinexpression beobachtet wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde

entschieden, für nachfolgende Experimente auf das bis dato verwendete Panel an HNSCC-Zelllinien, bestehend aus UPCI-SCC-040, Cal33 und UD-SCC2, zurückzugreifen.

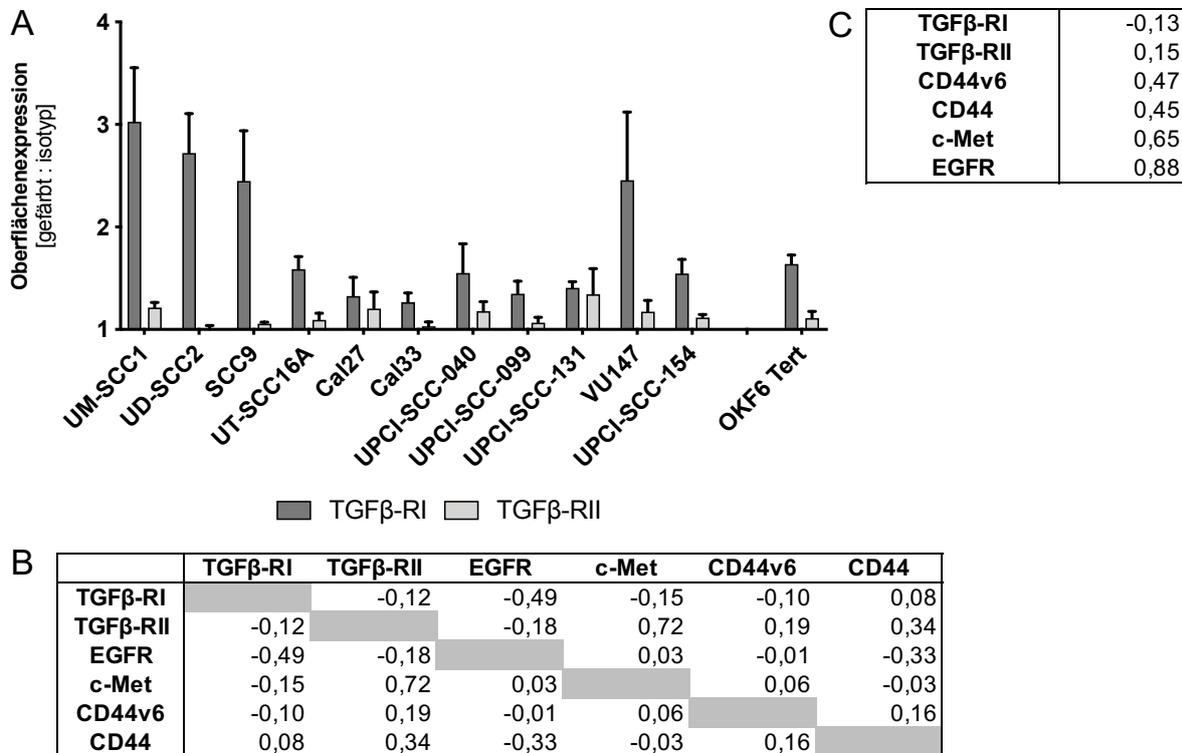


Abbildung 18: Oberflächenproteinexpressionen von TGFβRI und TGFβRII in HNSCC-Zelllinien und deren Korrelation mit den Expressionswerten von CD44, CD44v6, EGFR und c-Met. **A:** Die Oberflächenproteinexpressionen von TGFβRI und TGFβRII wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. **B:** Pearson's Korrelation der Oberflächenproteinexpressionen von TGFβ-RI/TGFβ-RII, CD44/CD44v6, EGFR und c-Met. **C:** Pearson's Korrelation der mRNA- und Oberflächenexpression von TGFβ-RI, TGFβ-RII, CD44, CD44v6, EGFR und c-Met.

9.4.2 Stimulation mit rekombinantem TGFβ1 erhöht die Oberflächenproteinexpression von CD44v6, aber wirkt radiosensibilisierend in HNSCC-Zellen

In der Literatur ist für TGFβ eine induzierende Funktion bezüglich der Expression von CD44v6 beschrieben, d.h. bei einer Behandlung von Zellen mit rekombinantem TGFβ sollte die Genexpression von CD44v6 ansteigen [48], [52]. Dieser funktionelle Zusammenhang zwischen TGFβ und CD44v6 sollte zunächst in HNSCC-Zelllinien bestätigt werden, weshalb die Oberflächenproteinexpression von CD44 und CD44v6 nach Behandlung mit rekombinantem TGFβ1 in den Zelllinien UPCI-SCC-040, Cal33 und UD-SCC2 über einen Zeitraum von 72 h hinweg durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Von den getesteten Zelllinien zeigte lediglich UPCI-SCC-040 einen statistisch signifikanten Anstieg der CD44v6-Oberflächenexpression ($p_{24h} = 0,0368$, $p_{72h} =$

0,0033) nach TGF β 1-Behandlung (Abbildung 19A), während für die Zelllinien Cal33 und UD-SCC2 kein statistisch signifikanter Anstieg in den CD44v6-Oberflächenexpression zu beobachten war. Im Gegensatz zu CD44v6 konnte für pan-CD44 in keiner der untersuchten Zelllinien eine Induktion der Genexpression nach Behandlung mit TGF β 1 erhalten werden, was nahelegt, dass der expressionsinduzierende Effekt von TGF β 1 zumindest in den untersuchten Zelllinien spezifisch für CD44v6 ist. Der induzierende Effekt auf die Genexpression von CD44v6 erreichte in UPCI-SCC-040-Zellen seine Sättigung bereits bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml TGF β 1 und 24-stündiger Behandlungsdauer (Abbildung 19A). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen TGF β 1-induzierter CD44v6-Expression und Radioresistenz in HNSCC-Zellen zu untersuchen, wurde das klonogene Überleben von UPCI-SCC-040-Zellen nach der Behandlung mit TGF β 1 und Bestrahlung untersucht (s. Abbildung 19B). UPCI-SCC-040-Zellen wurden für 48 h mit 1 ng/ml TGF β 1 behandelt, bestrahlt und nach einer Inkubationszeit von 13 d wurde das klonogene Überleben analysiert. Überraschenderweise wiesen die mit TGF β 1 behandelten – und somit mutmaßlich CD44v6 überexprimierenden Zellen ein niedrigeres klonogenes Überleben und damit eine geringere Radioresistenz auf als unbehandelte Kontrollzellen (Abbildung 19A). Dieses Ergebnis widerspricht augenscheinlich den Daten der eigenen Vorarbeiten sowie den Daten der Literatur über die Funktion von CD44v6 innerhalb der DNA-Schadensantwort nach Bestrahlung, da die erhöhte Expression von CD44v6 eigentlich mit erhöhter Radioresistenz einhergehen sollte [25], [27]. Allerdings hat die Stimulation mit TGF β 1 mehr Effekte als nur die beobachtete Induktion von CD44v6, die für diese Veränderungen verantwortlich sein können.

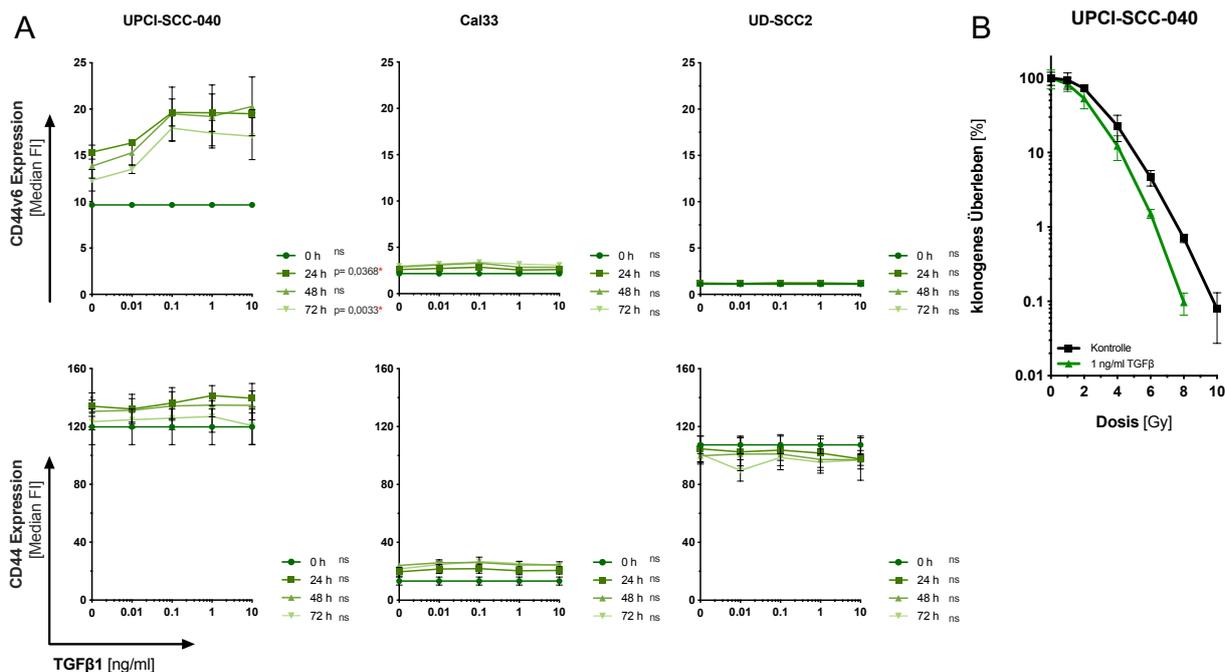


Abbildung 19: Die Behandlung mit TGFβ1 erhöht zwar die Oberflächenproteinexpression von CD44v6, führt jedoch zur Radiosensibilisierung von UPCI-SCC-040-Zellen. A: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD44/CD44v6-Oberflächenproteinexpression in HNSCC-Zellen nach Behandlung mit TGFβ1. UPCI-SCC-040-, Cal33- und UD-SCC2-Zellen wurden mit TGFβ1 in unterschiedlicher Konzentration stimuliert und die Oberflächenexpression von CD44v6 und CD44 in Intervallen von 24 h durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mediane der Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zur jeweiligen Isotypenkontrolle sowie Mittelwerte aus zwei (gekennzeichnet mit *) bis drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung; p-Werte wurden durch 1-way ANOVA bestimmt. **B:** Klonogenität von UPCI-SCC-040-Zellen nach 48 h Vorinkubation mit TGFβ1 (1 ng/ml) und Bestrahlung. Die Berechnung der Überlebensfraktionen erfolgte durch Normalisierung auf unbestrahlte Kontrollzellen (100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachwerten mit Standardabweichung.

9.4.3 Inhibition des TGFβ-RI reduziert die Oberflächenproteinexpressionen von CD44 und CD44v6, aber wirkt radioprotektiv in HNSCC-Zellen

Nachdem im vorigen Abschnitt die Induktion der Expression von CD44v6 durch TGFβ1 beobachtet werden konnte, wurde als nächstes überprüft, ob reziprok die Expression von CD44v6 durch die Modulation des TGFβ-Signalwegs als Folge pharmakologischer Inhibition des TGFβ-Rezeptors I (TGFβ-RI) mittels eines niedermolekularen Inhibitors (LY364947) in HNSCC-Zellen reduziert werden kann. Hierzu wurden UPCI-SCC-040- und Cal33-Zellen über 72 h hinweg mit LY364947 behandelt und die Oberflächenexpression von CD44 und CD44v6 durchflusszytometrisch analog der oben beschriebenen Vorgehensweise (Abbildung 19) bestimmt. Für UPCI-SCC-040-Zellen konnte, wie erwartet, eine dosisabhängige, statistisch signifikante Reduzierung der Oberflächenexpression von CD44v6 und CD44 beobachtet werden, während für Cal33 nur eine geringfügige Änderung der CD44/CD44v6-Expression beobachtet werden konnte (Abbildung 20A). Um wiederum einen Zusammenhang zwischen reduzierter

CD44v6-Expression aufgrund der Inhibition von TGF β -RI und CD44v6-vermittelter Radioresistenzbildung im HNSCC zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt UPCI-SCC-040-Zellen über 48 h hinweg mit LY364947 behandelt (500 nM), bestrahlt und nach einer Inkubationszeit von 15 d wurde das klonogene Überleben analysiert (Abbildung 20B). Überraschenderweise zeigte sich hierbei für die Inhibition von TGF β -RI eine radioprotektive – anstelle der eigentlich erwarteten radiosensibilisierenden Wirkung (Abbildung 20B); dieser Effekt war allerdings nicht merklich.

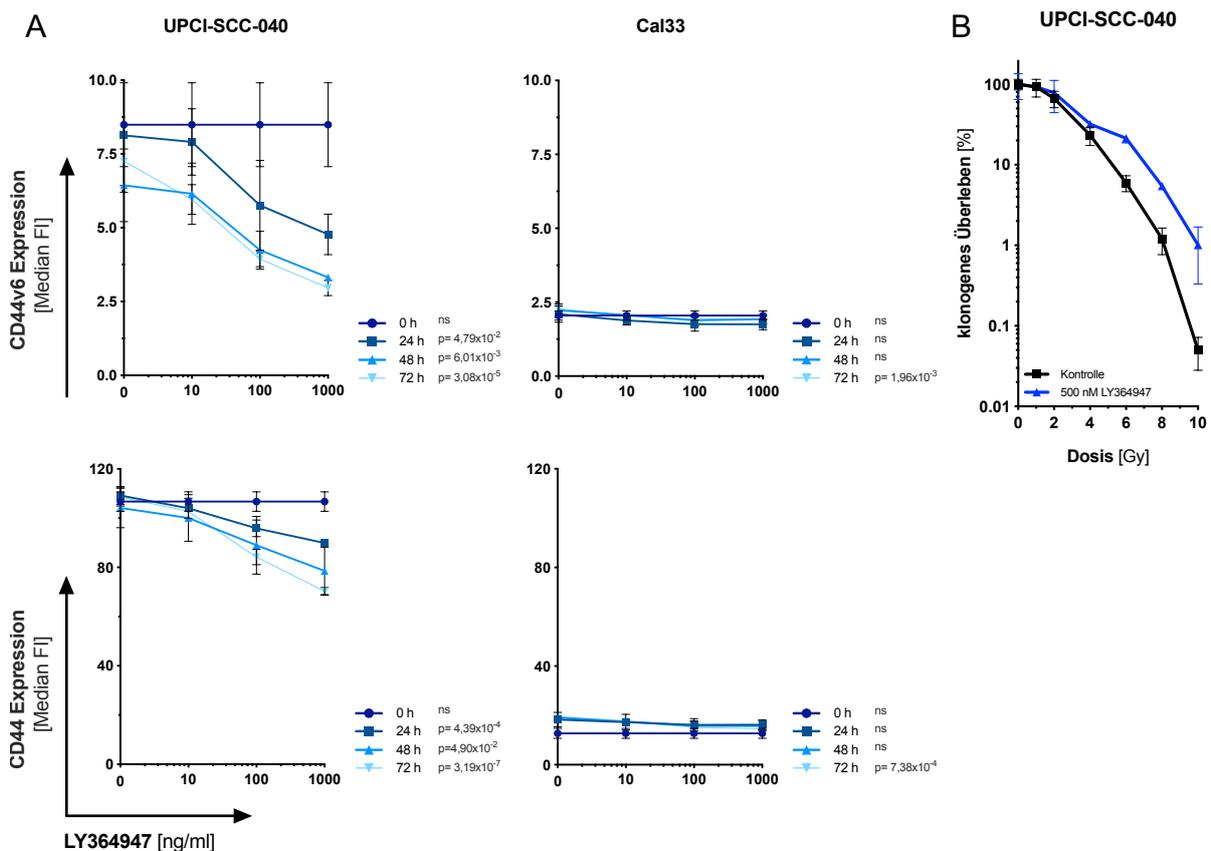


Abbildung 20: Die pharmakologische Inhibition von TGF β 1-RI reduziert die Oberflächenexpression von CD44v6 und CD44, führt aber zur Radioprotektion in UPCI-SCC-040-Zellen. A: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD44/CD44v6-Oberflächenproteinexpression in HNSCC-Zellen nach TGF β -RI-Inhibition. UPCI-SCC-040- und Cal33-Zellen wurden mit LY364947 behandelt und die Oberflächenexpression von CD44v6 und CD44 in Intervallen von 24 h durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mediane der Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zur jeweiligen Isotypenkontrolle (Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung); p-Werte wurden durch 1-way ANOVA bestimmt. **B:** Klonogenität von UPCI-SCC-040-Zellen nach 48 h Vorinkubation mit LY364947 (500 nM) und Bestrahlung. Die Berechnung der Überlebensfraktionen erfolgte durch Normalisierung auf unbestrahlte Kontrollen (100 %). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachwerten mit Standardabweichung.

10 Diskussion

Die Expressionsvariante 6 (v6) des Zelloberflächenrezeptors CD44 (CD44v6) wird im Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) sowie in verschiedenen anderen Tumorentitäten zuweilen stark überexprimiert [25], [35], [36], [37], [84]. Dieser Zustand ist für gewöhnlich mit klinisch nachteiligen Eigenschaften wie erhöhter Invasivität, erhöhter Metastasierungstendenz sowie verstärkter Tendenz zur Bildung von Therapieresistenzen assoziiert, und demzufolge häufig mit verkürztem Gesamtüberleben der Patient*innen assoziiert [27], [33], [41], [42], [43], [44]. Leider ist es bis heute nicht gelungen, eine gezielte, gegen CD44v6 ausgerichtete Therapieform für die Krebstherapie im Allgemeinen und die Therapie des HNSCC im Speziellen in der klinischen Anwendung zu etablieren.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher neuartige, spezifisch gegen CD44v6-Isoformen gerichtete Therapiestrategien in Kombination mit Bestrahlung, einer zentralen Behandlungsmodalität in der modernen Krebsmedizin, an kultivierten Zelllinien des humanen Plattenepithelkarzinoms der Kopf-Hals-Region (HNSCC) präklinisch untersucht werden. In einem ersten Ansatz wurden CD44v6-kompetitierende Peptide für die Modulation CD44v6-assoziiertes, onkogenes Signaltransduktionspfade in Kombination mit Bestrahlung getestet. Nachdem für diese kein verbessertes Therapieansprechen gegenüber den entsprechenden Monotherapien gezeigt werden konnte, wurden in einem zweiten Ansatz spezifisch gegen die Variante 6 von CD44 (CD44v6) generierte Oligonukleotide, sogenannte Aptamere, die als *Carrier* für radiosensibilisierende Chemotherapeutika, im vorliegenden Fall 5-Fluorouracil (5-FU), fungieren sollten, in Kombination mit Bestrahlung getestet. Schließlich wurde versucht, die Genexpression von CD44v6 durch pharmakologische Blockierung der TGF β nachgeschalteten Signalkaskade, eines mit CD44v6 assoziierten Pfads der onkogenen Signaltransduktion, zu inhibieren, um damit die Auswirkung reduzierter CD44v6-Expression auf die Radioresistenz von HNSCC-Zellen zu bestätigen. Letztendlich konnte für keinen dieser drei Ansätze eine gesteigerte anti-tumorale Wirksamkeit gegenüber den Monotherapien nachgewiesen werden.

10.1 Keine radiosensibilisierende Wirkung von CD44v6-kompetitierenden Peptiden auf CD44v6-überexprimierende HNSCC-Zellen in vitro

In den Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von CD44v6 in squamösen, humanen Krebszellen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) mit erhöhter Resistenz gegenüber Bestrahlung (Radioresistenz) einhergeht, einer der wichtigsten Faktoren für das fehlende Therapieansprechen von Tumoren auf Strahlentherapie und der damit häufig schlechten Prognose von HNSCC-Patient*innen (Abbildung 6). In der vorliegenden Arbeit sollte daher die radiosensibilisierende Wirkung von Oligopeptiden, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und ihrer räumlichen Konformation (Sekundär- und Tertiärstruktur) die Wechselwirkung des CD44v6-Oberflächenrezeptors mit anderen Oberflächenrezeptoren proto-onkogener Signalwege, wie beispielsweise dem EGFR nachgeschalteten Mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg, unterdrücken können, untersucht werden. Dazu wurde ein Panel humaner HNSCC-Zelllinien hinsichtlich ihrer intrinsischen Genexpressionslevel von CD44v6 analysiert (Abbildung 10) und auf Basis der erhaltenen Daten drei Zelllinien (UPCI-SCC-040, Cal33, UD-SCC2) ausgewählt. Anschließend wurde der Einfluss der zu testenden Peptide auf verschiedene zelluläre Endpunkte nach Bestrahlung, unter anderem auf das klonogene Überleben, die Viabilität, die Proliferation, die Zellzyklusverteilung sowie auf die Induktion von Apoptose und Seneszenz hin untersucht. Leider konnte für keinen dieser Endpunkte eine statistisch signifikante Einflussnahme der untersuchten Peptide alleine und/oder in Kombination mit Bestrahlung nachgewiesen werden. Ein Vergleich zwischen Ergebnissen dieses Projekts, laboreigener Vorarbeiten wie auch aktueller wissenschaftlichen Literatur ist nur bedingt aussagekräftig, da entweder andere Endpunkte (Gefäßaussprossung, Migration, Invasion, usw.) betrachtet oder sonstige Therapiemodalitäten (siRNA) verwendet wurden. Somit zeigen sich divergente Ergebnisse bezüglich der Funktion von CD44v6-Transkripten [60], [61], [85].

10.1.1 Mögliche Ursache für die fehlende Radiosensibilisierung durch CD44v6-kompetitierende Peptide: Wirkmechanismus des CD44v6-spezifischen 14mer-Peptids in HNSCC-Zellen

Die Diskrepanz zwischen den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen und den in der Fachliteratur veröffentlichten Daten zur anti-tumoralen Wirksamkeit CD44v6-spezifischer Oligopeptide könnte durch deren Wirkmechanismus erklärt werden [22], [60], [61], [86], [87].

Der Einfluss von CD44v6 auf die Radiosensibilität der HNSCC-Zelllinien stellte in diesem Projekt einen zentralen Endpunkt dar. Bereits in Vorarbeiten von Schötz et. al. konnte durch CD44v6-Knockdown mittels siRNA gezeigt werden, dass eine niedrige Rezeptorexpression mit einer hohen Radiosensibilisierung einhergeht und umgekehrt. Im Gegensatz dazu konnte die Konkurrenz zwischen Peptid und CD44v6 die intrinsische Radioresistenz der HNSCC-Zelllinien nicht modulieren. Somit scheint für die Strahlenantwort vielmehr die Stärke des Expressionsgrades von CD44v6 von zentraler Bedeutung zu sein als die (nachfolgende) Wechselwirkung von CD44v6 mit dem Signalnetzwerk. Zusätzlich sind die bislang betrachteten Endpunkte von Orian-Rousseau et. al. wie Migration, Gefäßausprossung, Metastasierung, usw. mechanistisch von der Radiosensibilität abzugrenzen [60], [61]. Die Überprüfung additiver oder synergistischer Wechselwirkungen zwischen entsprechenden Peptiden und anderen Behandlungsmodalitäten wie Bestrahlung war nicht Gegenstand der Studien von Orian-Rousseau et al., sodass der Effekt des CD44v6-spezifischen Peptids nicht distinkt auf andere Endpunkte wie der Radiosensibilität übertragen werden kann.

Außerdem könnte die funktionelle Charakterisierung der verschiedenen v6-Transkripte bei der Kontrolle unterschiedlicher Eigenschaften relevant sein. Dadurch lässt sich auch die Wirksamkeit der CD44v6-siRNAs bezüglich der Modulation der Radiosensibilität erklären, da diese im Vergleich zum v6-Peptid offensichtlich ein anderes Spektrum an v6-Isoformen depletieren. Während das Peptid nur den Bereich des v6-Exons blockiert, schalten die siRNAs neben v6 zusätzlich noch weitere Exons ab, insbesondere die Exons v3-10. Diese Transkripte scheinen hauptverantwortlich für die Kontrolle der Strahlenantwort, da diese zum einen am häufigsten in der TCGA- und LMU-internen Kohorte exprimiert wurden und im Zusammenhang mit verringerten Gesamtüberleben stehen (s. Abbildung 6D); zum anderen enthalten diese CD44v-Transkripte die Exone v8-10, die die Redox-Entgiftung von Tumorstammzellen zu

steuern scheinen und so die Regulation der Radiosensibilität erklären könnte [28], [88]. In gastrointestinalen Tumorstammzellen interagiert und stabilisiert CD44v8-10 zum einen xCT, eine Untereinheit des Cystin-Glutamat-Antiporters, der die intrazelluläre Cystin-Verfügbarkeit reguliert und so die GSH-Syntheserate determiniert und zum anderen reguliert CD44v auch direkt die GSH-Synthese [28], [89]. Diese Mechanismen tragen maßgeblich zur verstärkten Abwehr von ROS bzw. Resistenz gegenüber oxidativem Stress bei und vermitteln dadurch Therapieresistenz. Diese scheinen gerade in Kombination mit Radiatio, die durch ROS-Produktion zu oxidativem Stress führen, ein interessanter Therapieansatz zu sein. So könnten CD44v6-siRNAs, wie in Vorarbeiten zu dieser Arbeit verwendet, Transkripte herunterregulieren, die auch die Domänen v8-10 umfassen, und die dadurch beobachtete Radiosensibilisierung durch Modulation der antioxidativen Kapazität erklären. Somit erklärt sich auch die fehlende radiosensitiserende Wirkung des CD44v6-14mer-Peptids, da dieses lediglich die v6-Domäne adressiert, die wiederum für die Regulation anderer Endpunkte verantwortlich ist. Ein spezifisches Peptid, das auch die Domänen v8-10 blockiert, könnte hingegen in die Regulation der Strahlenantwort eingreifen.

10.1.2 Mögliche Ursachen für die fehlende Radiosensibilisierung durch CD44v6-kompetitierende Peptide: Spezifität und Stabilität des CD44v6-spezifischen 14mer-Peptids

Neben mechanistischen Ursachen der fehlenden Wirksamkeit von CD44v6-spezifischen Peptiden sind auch unzureichende pharmakologische Eigenschaften der hier getesteten Peptide wie beispielsweise eine zu niedrige Bindungsspezifität oder –affinität zu diskutieren.

Als Ursache für eine zu geringe Bindungsspezifität kommt bei der Verwendung von Oligopeptiden vor allem die unspezifische Adsorption der Peptide an Oberflächen wie die Zelloberfläche oder auch die Oberfläche von Zellkulturmaterialien aufgrund hydrophober Wechselwirkungen in Frage [90]. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, käme neben der einfachen Erhöhung der *in vitro* verwendeten Peptidkonzentration auch eine chemische Modifizierung des Peptids oder dessen Kopplung an spezifisch durch die Zelle via Endozytose aufgenommene Partikel, beispielsweise Nanopartikel, in Frage, wie es in einem Artikel von Li et al. beschrieben wurde [91]. Schließlich wäre noch eine

Verkleinerung der Adsorptionsfläche denkbar, zum Beispiel durch Blockierung selbiger mit unspezifisch bindendem Protein/Peptid (beispielsweise Albumin).

Da die Spezifität der Peptidbindung an Tumorzellen maßgeblich von der verwendeten Peptidkonzentration abhängt, wurde diese zu Beginn der Arbeit möglichst genau bestimmt [91]. Hierzu wurden Konzentrationen von 0 bis 1000 nM des zu testenden Peptids hinsichtlich ihrer Wirkung auf die zelluläre Viabilität von HNSCC-Zelllinien nach einer Bestrahlung hin untersucht (Abbildung 11), wobei für keine der verwendeten Konzentrationen eine gegenüber der Kontrolle (0 nM) veränderte (reduzierte) Viabilität nachgewiesen werden konnte. Dies spricht sowohl gegen die spezifische Bindung des zu untersuchenden Peptids an HNSCC-Zellen als auch gegen eine anders geartete (unspezifische) Bindung und somit Aufnahme des Peptids durch diese Zellen. Ferner spricht dieser Befund, sollte dennoch eine Aufnahme des Peptids durch die Tumorzellen erfolgt sein, gegen eine anti-tumorale Wirkung des Peptids, insbesondere in der Kombination mit Bestrahlung. Ebenfalls einen Faktor in diesem Zusammenhang stellt die Serumstabilität des Peptids dar, da auf fötalem Kälberserum basierende Zellkulturmedien Proteasen enthalten, die freie Peptide unspezifisch abbauen können [58]. Die Serumstabilität des hier verwendeten CD44v6-14mer-Peptids wurde im Rahmen der Arbeiten von Matzke-Ogi et al. analysiert, wobei eine Halbwertszeit von lediglich 11 min beobachtet wurde [61]. Nach 55 min konnten bei dieser Studie bereits Abbauprodukte des Peptids im Zellkulturmedium nachgewiesen werden, was zeigt, dass die Halbwertszeit des Peptids in serumbasierten Zellkulturmedien außerordentlich gering ist. Um dieser Degradation des Peptids entgegen wirken zu können, wurde in den Experimenten dieser Arbeit, bei denen CD44v6-spezifische Oligopeptide zur Anwendung kamen, die Konzentration des fötalen Kälberserums von 10 % auf 2,5 % reduziert und gleichzeitig das Peptid in 24 h-Intervallen neu zugesetzt.

Zur Bestimmung optimaler Peptidkonzentrationen orientierten wir uns an Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Orian-Rousseau et al., in denen zumeist mit der Peptidkonzentration von 100 ng/ml gearbeitet wurde [22], [60], [61], [86], [87]. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden 100 nM des Peptids verwendet, was bei einem Molekulargewicht des 14mer-Peptids von 1.893 g/mol einer Peptidmassenkonzentration von 189 ng/ml und somit knapp dem doppelten der von den Kolleg*innen verwendeten Konzentration (100 ng/ml) entspricht. Da für höhere Konzentrationen in keinem der durchgeführten Experimente eine Verstärkung der

Effekte festgestellt werden konnte (Abbildung 11), wurde diese Konzentration als „effektive“ Konzentration eingestuft und für weitere Experimente herangezogen.

Ein weiteres Problem bei der Herstellung hochspezifisch bindender Peptide gegen ein Oberflächenprotein wie CD44v6 stellt das Fehlen struktureller Informationen dar, die eine solche Herstellung maßgebend erleichtern würden. Gegenwärtig sind von CD44 beziehungsweise CD44v6 lediglich die Röntgenkristallstrukturen der Hyaluronsäurebindedomänen und der zytoplasmatischen Bindestelle für ERM-Proteine bekannt [92], [93], [94]. Vor allem jedoch fehlen bis zum heutigen Tag wichtige Informationen bezüglich etwaiger struktureller Veränderung von CD44 durch das Einspleißen von Exons der v6-Variante. Zwar konnten Chen et al. kürzlich anhand von molekular dynamischen Simulationen einen Einblick in die strukturellen Unterschiede der Stammregionen von CD44 und CD44v6 liefern, eine Aussage bezüglich der Gesamtstruktur beider Proteine ist aufgrund dieser Daten jedoch nach wie vor nicht möglich [95]. Infolgedessen konnte bisher die Wechselwirkung des hier verwendeten CD44v6-spezifischen 14mer-Peptids mit CD44v6 auf struktureller Ebene nicht klar gezeigt werden. Jung et al. stellten die Hypothese auf, dass das Peptid mit der extrazellulären Domäne von CD44v6 direkt wechselwirkt, dadurch die Bindung von Liganden wie beispielsweise dem hepatozytären Wachstumsfaktor (HGF) an CD44v6 kompetitiv verhindert, und so die Aktivierung CD44v6-assoziiierter, pro-tumorigener Rezeptoren an der Zelloberfläche wie beispielsweise c-Met blockiert [86], [87]. Gegenwärtig ermöglicht jedoch keine dieser Studien eine Aussage bezüglich der exakten „Natur“ der Wechselwirkung zwischen dem Peptid und CD44v6; diese wäre jedoch besonders wichtig, unter anderem da die Variante 6 (v6) von CD44 durch das Einspleißen entsprechender Exons um lediglich 42 Aminosäuren elongiert ist, was bei einer Gesamtlänge der Standardform von 429 Aminosäuren etwa 10 % des Gesamtproteins entspricht. Einen eventuell vielversprechenderen Ansatz zur Identifikation neuer, CD44v6-spezifischer Peptide könnte die Methode des sogenannten Phagen-Displays darstellen; ein entsprechender methodischer Ansatz wurde erst kürzlich veröffentlicht [96], [97].

10.1.3 Mögliche Ursachen für die fehlende Radiosensibilisierung durch CD44v6-kompetitierende Peptide: Re-Evaluierung des gewählten Modellsystems

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Forschungsergebnisse zur Wirksamkeit des CD44v6-kompetitierenden 14mer-Peptids differieren zu den in der Literatur

veröffentlichten Daten [22], [60], [61], [86], [87]. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass die veröffentlichten Daten zum überwiegenden Teil an Tumorzellkulturen und Mausmodellen des pankreatischen duktales Adenokarzinoms (PDAC) erhoben worden sind während in der vorliegenden Arbeit mit Plattenepithelkarzinomzellen der Kopf-Hals-Region gearbeitet worden ist [60], [61], [86]. Die Auswahl der zur Testung des CD44v6-kompetitierenden 14mer-Peptids verwendeten HNSCC-Zelllinien erfolgte aufgrund der durch qRT-PCR bestimmten Genexpressionslevel von CD44v6 (Kapitel 9.1) sowie den unterschiedlichen Graden der Radioresistenz (Abbildung 3). Aus diesem Grund wurde die Zelllinie UPCI-SCC-040, die die höchste Expression von CD44v6 und die höchste Radioresistenz aufwies, für diese Experimente verwendet. Von daher kann es nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die nicht nachweisbare anti-tumorale Wirkung des CD44v6-spezifischen 14mer-Peptids auf eine Eigenschaft dieser Zelllinie zurückzuführen ist, und dass es der Testung weiterer HNSCC-Zelllinien mit nachweisbarer CD44v6-Expression bedarf, beispielsweise UM-SCC1 oder Cal27 (Abbildung 10), um eine abschließende Aussage bezüglich der Wirksamkeit des untersuchten Peptids in CD44v6-überexprimierenden HNSCC-Zellen treffen zu können. Allerdings konnte für Cal33 Zellen, eine HNSCC-Zelllinie mit niedriger, aber nachweisbarer CD44v6-Expression ebenfalls kein Effekt des Peptids auf die Viabilität nach Bestrahlung und Peptid-Behandlung nachgewiesen werden (Abbildung 11).

Weiterhin ist die Funktion von CD44v6 als funktionelle Komponente innerhalb eines Gesamtsignalnetzwerkes zu betrachten (vergleiche Kapitel 5.2.2 und 10.4). So wurde das CD44v6-spezifische Peptid in den Arbeiten der Gruppe von Prof. Orian-Rousseau stets in Verbindung mit Liganden CD44v6-assoziiierter Rezeptortyrosinkinasen (z.B. HGF bei c-Met) eingesetzt [22], [60], [61]. Die Ektodomäne von CD44v6 aktiviert zum einen diese Kinasen, während die zytoplasmatische Domäne von CD44v6 ERM und Zytoskelett an die Zellperipherie rekrutiert und dadurch die Weiterleitung der Signale der RTKs unterstützt [17], [22]. So bindet HGF beispielsweise an c-Met und an CD44v6 und bewirkt so die Bildung des ternären Komplexes und dadurch die Aktivierung von c-Met [86]. Gleichzeitig induziert HGF die Genexpression von c-Met und CD44v6, was die positive *feedback loop*-Regulation entsprechender Signalkaskaden erkennen lässt [98]. Um eine anti-tumorale Wirkung der untersuchten Peptide zu erhalten, ist es somit notwendig, dass Zellen, in denen das Peptid wirkt, nicht nur eine Überexpression von CD44v6, sondern auch von dessen assoziierten RTKs und/oder deren entsprechender Liganden aufweisen müssen. Diese Voraussetzung wäre bei der verwendeten Zelllinie

UPCI-SCC-040 eventuell nicht gegeben, da diese neben der im Vergleich zur Normalgewebeskontrolle (OKF6) um den Faktor 4,5 gesteigerten CD44v6-Expression nur eine um den Faktor 1,3 erhöhte Expression von c-Met aufweist (Abbildung 10). Die hypothetische Voraussetzung einer entsprechenden Co-Überexpression von CD44v6 und assoziierter RTKs zur Wirksamkeit CD44v6-spezifischer Peptide würde deren Anwendungsspielraum erheblich einschränken und sollte daher durch Reanalyse von positiv getesteten Zelllinien, wie beispielsweise den in den Arbeiten von Prof. Orian-Rousseau verwendeten pankreatischen Krebszelllinien, untersucht werden. Eine entsprechende Testung wurde an neun humanen Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt, wobei die höchste Expression von CD44v6 in Panc-1 Zellen gemessen werden konnte (Abbildung 10C). Eine Zelllinie, in der auch Orian-Rousseau et al. die Modulation verschiedener Endpunkte durch das Peptid zeigten [61]. Ein Vergleich der Entitäten PDAC (Panc-1) vs. HNSCC (UPCI-SCC-040) zeigte sowohl eine unterschiedliche absolute Oberflächenexpression von CD44v6 als auch Expressionsmuster (Ratio CD44v6:c-Met). Die Tatsache, dass das 14mer-Peptid gemäß den Ausführungen von Orian-Rousseau et. al. dennoch die Proliferation, die Migration und die Invasivität von Panc-1 Zellen zu inhibieren vermag, ist daher möglicherweise mit gewebetypischen Unterschieden der beiden Zellkultursysteme (HNSCC vs. PDAC) zu erklären [61].

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Ausbleiben radiosensibilisierender Effekte nach der Behandlung mit CD44v6-spezifischen Peptiden und dem somit bestehenden Gegensatz zu früheren Experimenten, bei denen gegen CD44v6 gerichtete *small interfering RNAs* (siRNAs) zur Anwendung kamen (Schötz et al., unveröffentlichte Daten), könnte im Vorliegen sogenannter Off-Target-Effekte der verwendeten siRNAs bestehen, das heißt, die verwendeten Oligonukleotide würden neben der mittels Durchflusszytometrie dokumentierten Reduktion der Expression von CD44v6 auch andere Gene der Zelle in ihrer Expression beeinträchtigen. Sollte dies der Fall sein und sollten sich innerhalb der betroffenen Gene auch Gene mit Funktionen in der strahlungsabhängigen DNA-Schadensantwort befinden, so könnte dies eventuell die Diskrepanz zwischen den beiden Versuchsansätzen erklären. Da die damals beobachteten Effekte bezüglich Radiosensibilisierung etc. jedoch mit verschiedenen, gegen CD44v6 generierten Oligonukleotiden gezeigt werden konnten, ist diese Möglichkeit als unwahrscheinlich einzustufen. Zudem zeigten auch klinische Daten

eine Korrelation zwischen CD44v6 bzw. CD44v3-10 und verringertem Gesamtüberleben in zwei unabhängigen Kohorten (s. Abbildung 6A, B).

10.1.4 Mögliche Ursachen für die fehlende Radiosensibilisierung durch CD44v6-kompetitierende Peptide: Kompensatorische Mechanismen gegenüber der Wirkung CD44v6-kompetitierender Peptide in HNSCC-Zellen

Es konnte in diversen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem pankreatischen duktalem Adenokarzinom (PDAC), durch Applikation des CD44v6-kompetitierenden 14mer-Peptids eine Reduzierung des Tumorwachstums sowie Inhibition der Metastasierung gezeigt werden [61]. Der zugrundeliegende molekularbiologische Mechanismus ist aber nur unzureichend verstanden, sodass auch in diesem Projekt die fehlende Wirkung des Peptids in HNSCCs nicht nachvollzogen werden kann. Bislang ist unklar, ob alleinig das Exon v6 für die Interaktion mit Peptiden verantwortlich ist oder jegliche Isoforme, die v6 enthalten. Zusätzlich sind die zahlreichen Interaktionen von CD44v6 mit anderen Molekülklassen wie z.B. c-Met zu berücksichtigen [17]. Durch Ausbildung eines ternären Komplexes mit CD44v6 und HGF wird c-Met aktiviert und führt so zur Signalweiterleitung der assoziierten RTKs [22], [86]. Denkbar wäre somit die Übernahme der Funktion von CD44v6 als Co-Rezeptor durch andere Isoformen oder gänzlich andere Proteine, mit dessen Hilfe die Signale anderer Oberflächenrezeptoren (wie beispielsweise c-Met) effektiver in die Zelle weitergeleitet werden können. Dadurch könnte c-Met in HNSCC-Zellen durch alternative Mechanismen und einem „Ersatzprotein“ aktiviert werden und somit die Integrität der Signalkaskade dennoch sichergestellt werden, die u.a. auch für die Radioresistenz in HNSCCs verantwortlich ist.

Eine Studie von Matzke et. al. zeigte, dass CD44^{-/-}-knockout-Mäuse lebensfähig sind und nur geringe Defekte aufweisen [99]. Offensichtlich können auch andere Proteine die Funktion von CD44 *in vivo* übernehmen und damit könnte auch die Wirkung des v6-Peptids aufgehoben werden [22].

CD44v6 scheint in diverse Signalkaskaden durch molekulare Interaktionen einzugreifen und somit multivalente Funktionen zu vermitteln. Daher müssen auch andere Proteine und v6-Isoformen als Ersatzproteine für CD44v6 in Betracht gezogen werden, die bei Applikation des CD44v6-14mers die Funktion des eigentlich

blockierten CD44v6 übernehmen und somit die Radioresistenz in HNSCCs aufrechterhalten.

10.2 CD44v6-spezifische Aptamere als zielgerichtete Therapiestrategie im HNSCC

In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit sollte die radiosensibilisierende Wirkung von spezifisch gegen CD44v6 gerichteten Oligonukleotiden (sogenannten Aptameren) an CD44v6-überexprimierenden, radioresistenten HNSCC-Zellen getestet werden. Aptamere wurden ursprünglich als mögliche Alternative zu den klassischen, auf Antikörpern basierenden Diagnose- und Therapieverfahren der modernen Onkologie entwickelt. Da Aptamere Antikörpern gegenüber in einigen Eigenschaften überlegen sind, stellen sie eine äußerst vielversprechende Alternative für molekular zielgerichtete Interventionen dar: Zum einen wird durch ihre hohe Spezifität gegenüber ihren Zielstrukturen die Toxizität gegenüber dem Normalgewebe im Vergleich zu Antikörpern deutlich reduziert [100]. Zum anderen führt ihr hoher Grad an Modifizierbarkeit zu zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten, sowohl im diagnostischen Bereich (beispielsweise bei der Bildgebung im Rahmen der Positronen-Emissionstomographie (PET) aufgrund von Kopplung mit Radionukliden oder Fluoreszenzmarkern), als auch im therapeutischen (und somit im „theranostischen“) Bereich [42], [65], [101].

In der Therapie von lokal fortgeschrittenen und metastasierten Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs kommen häufig relativ aggressive Behandlungsregime zum Einsatz, die neben einer Bestrahlung zumeist auch eine begleitende Chemotherapie mit Taxanen, Cisplatin und/oder 5-Fluorouracil beinhalten und dadurch wiederum häufig mit starken Nebenwirkungen assoziiert sind [6], [83]. Um eine Reduzierung dieser Nebenwirkungen in der Klinik zu erreichen, sollten daher CD44v6-spezifische Aptamere als potenzielles Vehikelsystem für eine zielgerichtete Verabreichung radiosensibilisierender Chemotherapeutika, wie beispielsweise 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Bestrahlung, evaluiert werden [102]. Der Arbeitshypothese folgend sollte durch den Einsatz CD44v6-spezifischer Aptamere, in deren Nukleotidsequenz 5-FU inkorporiert ist, eine deutlich gezieltere Verabreichung von 5-FU an CD44v6-überexprimierende Tumorzellen gegenüber einer systemischen Applikation erreicht

werden, weshalb von einer deutlich niedrigeren systemischen Toxizität auszugehen wäre [100].

Mechanistisch werden 5-FU-gekoppelte Aptamere zunächst rezeptorvermittelt via Endozytose internalisiert [66]. Nach dem Abbau der primären Nukleotidsequenzen wird freies 5-FU im Zellinneren freigesetzt wo es dann mit der Reparatur der DNA nach Bestrahlung interferiert und somit zu erhöhter Sensitivität der Zellen gegenüber Bestrahlung führt [103], [104], [105]. So konnte im PDAC gezeigt werden, dass EGFR-spezifische Peptide, die mit 5-FU gekoppelt sind, zu einer signifikanten Radiosensibilisierung führen [106]. Weiterhin sollte durch diese Methode eine Umgehung der in CD44v6-überexprimierenden Tumorzellen beobachteten Resistenzbildung gegenüber 5-FU durch Aktivierung der PI3K/Akt – und MAPK/Erk Signalkaskaden sowie der EMT erreicht werden können [107].

Aufgrund fehlender Spezifität und Affinität der in diesem Projekt verwendeten Aptamere gegenüber CD44v6 konnte das oben erläuterte Therapieprinzip in HNSCC-Zellen noch nicht etabliert werden. Ähnlich wie unter 10.1.2 beschrieben, stellte sich auch in diesem Ansatz die enorme Strukturvielfalt von CD44(v6) sowie die Peptidlänge (14mer bzw. 42mer vs. 429 AS) als Ausgangsstruktur für die Aptamerherstellung als Hauptproblem dar.

Die Optimierung der CD44v6-spezifischen Aptamere ist essentiell für den Erhalt zukünftiger Behandlungserfolge

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, spezifisch gegen CD44v6 gerichteten Aptamere wurden mittels *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) Methode in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums der LMU München generiert. Die dadurch erhaltenen Aptamere wurden zunächst mittels eines Festphasenbindungsassays unter Verwendung Ni-NTA-beschichteter 96-well-Platten, an die His-Tag-gekoppelten CD44v6-Peptide (entweder das 14mer-Peptid oder das 42mer-Peptid) gebunden worden waren, hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft. Bei dieser Analyse konnte für keines der getesteten Aptamere eine spezifische Bindung an ein Peptid von CD44v6 beobachtet werden (Abbildung 15 und Abbildung 16), weder an das 14mer-Peptid, noch an das 42mer-Peptid. Als Ursachen hierfür kommen neben der unzureichenden Nachahmung der Oberflächenstruktur der 429 Aminosäuren (AS) umfassenden v6-Domäne von CD44v6, durch die als Bindematrix verwendeten Peptide (14mer und 42mer,) auch eventuell auftretende polare Wechselwirkungen

zwischen den Ni-Ionen der Platte und dem Phosphatrückgrad der Aptamermoleküle beziehungsweise des verwendeten Cy3-Fluorophors in Frage. Diese könnten eventuell durch eine vorherige Blockierung der Platte, ähnlich eines ELISAs oder Western Blots, beispielsweise mit bovinem Serumalbumin (BSA) unterdrückt und damit die Spezifität der untersuchten Aptamere für CD44v6 nachgewiesen werden. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass der Befund einer von CD44v6 unabhängigen und somit unspezifischen Bindung der getesteten Aptamere auch bei nachfolgend durchgeführten, durchflusszytometrischen Analysen aptamerbehandelter HNSCC-Zelllinien mit unterschiedlichem CD44v6-Expressionsstatus erhalten werden konnte.

Eines der Hauptprobleme bei der hier durchgeführten Synthese von Aptameren stellt die Verwendung von verhältnismäßig kurzen Peptiden (14mer und 42mer) anstelle von Vollängenproteinen oder zumindest Domänen von CD44v6 (zum Beispiel der 429 AS langen v6-Domäne) dar. CD44 stellt ein strukturell extrem vielseitiges Oberflächenprotein dar, das durch alternatives Splicing in einer Vielzahl verschiedener Isoformen vorliegen kann, von denen die Variante 6 (v6) lediglich eine Untergruppe darstellt [108], [109]. Zusätzlich wird die Heterogenität von CD44 durch verschiedene posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen erhöht [16]. Dies sowie die Tatsache, dass die räumliche Struktur eines Proteins (Tertiärstruktur) nur in ganz wenigen Fällen durch ein einzelnes Peptidfragment korrekt abgebildet werden kann, lässt den hier gewählten Ansatz zur Synthese der Aptamere als hochgradig fehleranfällig („*error-prone*“) erscheinen. Gleichzeitig muss aber angemerkt werden, dass strukturelle Informationen zu CD44v6 rar sind und es beispielsweise keine Röntgenkristallstruktur von CD44, CD44v6 oder einer anderen Isoform dieser Proteinfamilie gibt. Um diesen Sachverhalt kompensieren zu können, sollten in einem neuen Versuchsaufbau Aptamere anhand von rekombinant in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293T) exprimiertem Vollängen-CD44v6 generiert werden; eine Analyse bzw. Evaluierung dieser Aptamere war im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeitlich jedoch nicht mehr möglich.

Ein weiteres erfolgsversprechendes Verfahren könnte die Generierung von Aptameren in einem *whole cell*-basierten SELEX-Verfahren sein. Dadurch könnten Nachteile des herkömmlichen SELEX-Verfahrens, insbesondere die strukturellen Herausforderungen von CD44v6 bewältigt werden [110]. Aptamere könnten so selektiv an ihr in nativer Konformation vorliegendes Zielprotein binden. Für die Generierung CD44v6-

spezifischer Aptamere müsste hierfür zunächst eine natürlich CD44v6 exprimierende Zelllinie ausgewählt werden, wie beispielsweise UPCI-SCC-040 oder eine Zelllinie, in der CD44v6 transient und stabil überexprimiert wird. Zur Kontrolle der Spezifität entsprechend erzeugter Aptamere würde hingegen eine CD44v6-negative Zelllinie, in der beispielsweise CD44v6 mittels CRISPR/Cas9 deletiert worden ist, verwendet werden. Nichtsdestotrotz ist anzumerken, dass eine erfolgreiche Aptamer-Generierung mittels dieser Methode in weniger als 30 % der Fälle erreicht wird und dass die Methode bei „schwierigen“ Proteinen zuweilen gänzlich versagt [111]. Dies ist oft auf den Mangel an struktureller Vielfalt von Nucleinsäuren zurückzuführen, die nur Kombinationen der vier Basen ermöglichen. In krassem Kontrast dazu steht die extrem stark ausgeprägte Diversität der v6-Isoformen, insbesondere durch deren posttranslationale Modifikation, die zuweilen in verschiedenen Sekundär- und Tertiärstrukturen münden.

10.3 Auf Umwegen zu CD44v6 – die TGF β -Signalkaskade im HNSCC

Nachweis einer funktionellen Interaktion zwischen CD44v6-abhängiger – und TGF β -abhängiger Signaltransduktion bei adversen Antwortverhalten auf strahlungsinduzierte DNA-Schädigung

Nachdem für direkt auf CD44v6 ausgerichtete Therapieansätze keine Einflussnahme auf das Ansprechverhalten gegenüber einer strahlentherapiebasierten Behandlung im HNSCC nachgewiesen werden konnte, wurde in einem weiteren Ansatz eine indirekte pharmakologische Intervention durch Modulation des TGF β -Signalwegs untersucht. Dieser Signalweg ist normalerweise für die Aufrechterhaltung der epithelialen Homöostase verantwortlich. Da er in HNSCC-Tumoren jedoch häufig inaktiv oder dereguliert ist kommt es dort zur Hyperproliferation der Tumorzellen, erhöhter genomischer Instabilität bei gleichzeitig reduzierter Zelltodtendenz sowie aufgrund erhöhter TGF β -Produktion von TGF β -Signal-defizienten Tumorzellen zu verstärkter Angiogenese und Inflammation [51], [54], [112].

Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit gezeigt, dass zwischen dem CD44v6- und dem TGF β -Signalweg funktionelle Wechselwirkungen bestehen [35], [48], [52], [70], [113], [114]. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Stimulation von HNSCC-Zellen mit

rekombinantem TGF β 1 zu einer Induktion der Expression von CD44v6 führt, während die pharmakologische Inhibition des TGF β -Rezeptors I (TGF β -RI) zu einer Reduzierung der Expression von CD44v6 und Gesamt-CD44 führte. Ähnliche Ergebnisse wurden in Studien berichtet, die an Prostatakarzinomzellen und primären Lungenfibroblasten durchgeführt worden waren [113], [114]. In diesen Studien konnte ebenfalls eine mit TGF β assoziierte Induktion von CD44v6 und umgekehrt eine Reduktion der Expression von TGF β nach Depletion von CD44v6 beobachtet werden [25], [115]. Im metastasierten Mammakarzinom konnte gar eine direkte physikalische Wechselwirkung zwischen der CD44-Variante 3 (CD44v3) und TGF β -RI nachgewiesen werden, die durch TGF β getriggert werden konnte [48]. Diese Befunde, die in ihrer Gesamtheit zeigen, dass zwischen der CD44-abhängigen Signaltransduktion und dem von TGF β -abhängigen Signalweg funktionelle Verbindungen bestehen, sollten im Folgenden näher untersucht werden.

Zur Ermittlung der Eignung der bis dato im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Modellzelllinien wurde zunächst die Expression der TGF β -Rezeptoren I und II sowie von TGF β selbst überprüft. Dabei konnte sowohl für TGF β als auch für TGF β -RI eine Expression auf der mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Ebenso konnte für TGF β -RI eine Oberflächenproteinexpression detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden für TGF β -RII sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene nur minimale oder gar keine Expression gefunden, was im Einklang steht mit anderen Studien [116], [117]. Um die funktionelle Wechselwirkung zwischen CD44v6 und der TGF β -Signalkaskade und damit die vermeintliche Beeinflussung der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung und damit auf die CD44v6-vermittelte Radioresistenz in HNSCC-Zellen zu untersuchen, wurden solche zunächst mit rekombinantem TGF β 1 stimuliert. Dabei konnte lediglich für die CD44v6 basal überexprimierende Zelllinie UPCI-SCC-040 eine dosis- sowie zeitabhängige weitere Zunahme der CD44v6-Expression nach Behandlung mit TGF β 1 beobachtet werden, während diese in Zelllinien mit einer niedrigeren basalen CD44v6-Expression (Cal33, UD-SCC2) nicht zu beobachten war (Abbildung 19); die Expression von CD44 hingegen war in allen drei Zelllinien unabhängig von TGF β 1. Neben der Stimulation der TGF β -Kaskade wurde auch eine Inaktivierung dieser durch einen niedermolekularen Inhibitor von TGF β -RI (LY364947) auf ihr Vermögen hin, die Genexpressionslevel von CD44v6 abzusenken und dadurch eine Radiosensibilisierung

CD44v6-überexprimierender HNSCC-Zellen zu erreichen, untersucht. Tatsächlich konnte dabei eine zeit- und dosisabhängige Reduzierung der CD44v6-Oberflächenproteinexpression erreicht werden, jedoch abermals nur in der basal CD44v6 überexprimierenden Zelllinie UPCI-SCC-040, während der Effekt in den anderen Zelllinien (Cal33, UD-SCC2) deutlich geringer ausgeprägt war.

Nachdem ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Aktivität der TGF β -Signaltransduktionskaskade und der Genexpression von CD44v6 in UPCI-SCC-040-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde als nächstes die Beeinflussung der Resistenz dieser Zellen gegenüber strahlentherapeutischer Intervention untersucht. Gemäß dem Modell, dass die Radioresistenz dieser Zellen maßgebend durch CD44v6 beeinflusst beziehungsweise gesteuert werden würde, ist in diesem Fall davon ausgegangen worden, dass eine Induktion von CD44v6-Expression durch TGF β (oben) mit einem Anstieg der Radioresistenz und damit mit gesteigertem, klonogenen Überleben der Zellen nach Bestrahlung einhergehen müsste. Umgekehrt müsste die Blockierung der CD44v6-Expression durch Inhibition von TGF β -RI zu einer verstärkten Radiosensitivität dieser Zellen führen und damit mit reduziertem Überleben einhergehen. Überraschenderweise resultierte die Behandlung entsprechender Zellen mit TGF β 1 trotz einer gesteigerten CD44v6-Expression in einer Reduzierung des klonogenen Überlebens dieser Zellen (Abbildung 19B), während die Reduktion der CD44v6-Level in UPCI-SCC-040 Zellen durch Inhibition von TGF β -RI zu gesteigerter Radioresistenz und damit zu verbessertem Überleben führte (Abbildung 20B). Dieses Ergebnis widersprach somit vollständig der zugrunde gelegten Arbeitshypothese und stellt damit zumindest teilweise die Bedeutung von CD44v6 für die Radioresistenz dieser HNSCC-Zelllinie in Frage. Betrachtet man jedoch die vielfältigen Aufgaben und Funktionen, die der TGF β -Signalweg ausführt, so ergeben sich verschiedene Erklärungsansätze für die erhaltenen Daten. So induziert TGF β neben der Genexpression von CD44v6 auch die Expression diverser Zellzyklusregulatoren wie p15^{Ink4b} und p21^{Cip1} und unterdrückt dadurch die Zellproliferation [118], [119]. Umgekehrt reduziert TGF β die Expression des Onkogens c-Myc und reduziert dadurch die Expression verschiedener zur schnellen Proliferation benötigter Gene [120]. Darüber hinaus fördert TGF β die Differenzierung und verstärkt pro-apoptotische Tendenzen [121], [122], [123], [124], [125]. Dies alles kann dazu führen, dass der vermeintliche, radioresistenzvermittelnde Einfluss der CD44v6-Induktion durch die allesamt eher radiosensibilisierend wirkenden Effekte „überdeckt“ wird. Die oben angesprochenen Funktionen des TGF β -Signalwegs

können wiederum auch die Diskrepanz der erwarteten und der erhaltenen Ergebnisse zur Radioresistenz CD44v6-überexprimierender HNSCC-Zellen erklären, die bei Verwendung des TGF β -RI-Inhibitors LY364947 erhalten wurden. Dieser ATP-analoge Tyrosinkinase-Inhibitor verhindert die Signalweiterleitung des TGF β -Rezeptors I nach Ligandenbindung und blockiert damit die oben beschriebenen, anti-proliferativen Effekte in Tumorzellen, die normalerweise mit TGF β assoziiert sind. Passend zu dieser Aussage konnte schon früh gezeigt werden, dass die transkriptionelle Repression von TGF β -RI durch Promotor-Hypermethylierung im HNSCC weit verbreitet ist [126]. Im ösophagealen Karzinom konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass reduzierte TGF β RI-Oberflächenexpression mit verstärkter Invasivität und Metastasierung assoziiert ist [127]. Diese Befunde sprechen stark für eine pro-tumorale Wirkungsweise des verwendeten Inhibitors, z.B. als Folge von Repression von apoptotischem Zelltod und diese Effekte könnten in der Kombination noch stärker zum Ausdruck kommen. Eventuell spielt hier auch die untersuchte Tumorentität (HNSCC) oder die für die Experimente verwendete Zelllinie (UPCI-SCC-040) eine entscheidende Rolle, da in anderen Tumorentitäten radiosensibilisierende Effekte für LY364947 beschrieben sind [72], [73].

10.4 Von der Zielstruktur zur zielgerichteten Therapie – die zukünftige Bedeutung von CD44v6 für neuartige Therapieansätze des HNSCC

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte weiterführend erforscht werden, inwieweit die Überexpression der CD44-Variante 6 (CD44v6) die Resistenz von Plattenepithelkarzinomzellen der Kopf-Hals-Region (HNSCC) gegenüber einer Strahlenbehandlung beeinflusst beziehungsweise begünstigt, und wie diese direkt und indirekt durch therapeutische Intervention in Kombination mit Bestrahlung adressiert werden kann.

In den Vorarbeiten zu dieser Arbeit (Schötz et al., unveröffentlichte Daten) sowie in den Arbeiten anderer Gruppen konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Überexpression von CD44v6 einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation, das klonogene Überleben sowie auf die Effizienz der DNA-Reparatur ausübt [25], [70]; eine Modulation dieser Effekte durch die Verwendung der zu untersuchenden Mittel (CD44v6-spezifisches 14mer-Peptid, Aptamere, TGF β -Inhibition) in Verbindung mit

einer strahlentherapeutischen Behandlung konnte im Rahmen dieses Projekts nicht erreicht werden. Die Ursachen hierfür können vielfältiger Natur sein und sich von konzeptionellen Ursachen sowie mangelnder Spezifität oder Stabilität der getesteten Peptide und Aptamere bis hin zu aberrant veränderten Regulationsmechanismen in den verwendeten Zellsystemen erstrecken. Nichtsdestotrotz ist die Bedeutung von CD44v6 sowohl für die Ausbildung von Behandlungsresistenzen im Zusammenhang mit Strahlentherapie (Radioresistenz) wie auch für die Metastasierungstendenz von Tumoren evident, was sich in den zuweilen massiv verkürzten Gesamtüberlebensraten verschiedener Krebsentitäten mit Überexpression von CD44v6 widerspiegelt [84], [35]. Neben der therapeutischen Adressierung dieser Überexpression ist auch deren frühzeitiger diagnostischer Nachweis, beispielsweise im Rahmen bildgebender Verfahren wie Computertomographien (CT) von enormer Bedeutung, da nur durch derartige Verfahren eine frühzeitige Anpassung der Therapie möglich wird. Im Rahmen entsprechender Verfahren dürfte vor allem den in dieser Arbeit untersuchten Aptameren eine besondere Bedeutung zukommen, da diese neben der hier untersuchten, therapeutischen Anwendbarkeit auch diagnostisch eingesetzt werden können, beispielsweise in Konjugation mit radioaktiven Markern als Tracer für CT-basierte Bildgebungsverfahren [66]. Obwohl für Peptide auf den ersten Blick dasselbe gelten sollte, stellen Aptamere aufgrund ihrer höheren chemischen Stabilität vermutlich die geeigneteren Agenzien für entsprechende Anwendungen dar. Die zielgerichtete therapeutische Adressierung von CD44v6 ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht in der Klinik angekommen, auch wenn die Voraussetzungen dafür bereits weitgehend existieren. So wurde von Boehringer Ingelheim bereits 2003 ein humanisierter monoklonaler CD44v6-Antikörper erstmalig beschrieben [128]; eine nachfolgende klinische Studie, bei der ein Konjugat dieses Antikörpers mit dem Zytostatikum Mertansine getestet werden sollte, musste jedoch aufgrund massiver Nebenwirkungen frühzeitig beendet werden. Grundsätzlich stellen humanisierte Antikörper eine äußerst vielversprechende Strategie für die spezifische Adressierung pro-tumoraler Zelloberflächenrezeptoren dar. Ein gutes Beispiel hierfür stellt der monoklonale Antikörper Cetuximab dar, der gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) gerichtet ist und der die 5-Jahresüberlebensrate von HNSCC-Patient*innen in Verbindung mit einer Strahlentherapie signifikant zu verbessern vermag [57]. Peptide und Aptamere stellen in diesem Zusammenhang interessante Alternativen dar, da sie einfacher und kostengünstiger zu produzieren

sind als Antikörper und zuweilen eine bessere Penetration von Tumoren als Antikörper zeigen. Nicht zuletzt konnte die Wirksamkeit von anti-EGFR-Aptameren in PDAC *in vivo* gezeigt werden [106]. Dem entgegen steht jedoch die gegenüber Antikörpern zuweilen deutlich niedrigere chemische Stabilität dieser Therapeutika. Für das längerfristige Ziel einer kombinierten, diagnostischen und therapeutischen (theranostischen) Anwendung sollten sich dennoch alle drei Wirkstoffklassen eignen.

11 Literaturverzeichnis

<https://amcure.com> 17.11.2019, 14:05

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03009214?term=amcure&recrs=a&rank=1>,
17.11.2019, 14:05

1. Leemans, C. R., B. J. Braakhuis, and R. H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
2. Leemans, C. R., P. J. F. Snijders, and R. H. Brakenhoff, *The molecular landscape of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(5): p. 269-282.
3. Tornesello, M. L., et al., *HPV-related oropharyngeal cancers: from pathogenesis to new therapeutic approaches*. Cancer Lett, 2014. **351**(2): p. 198-205.
4. Dal Maso, L., et al., *Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models*. Eur J Epidemiol, 2016. **31**(4): p. 385-93.
5. Caudell, J. J., et al., *NCCN Guidelines® Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2022*. J Natl Compr Canc Netw, 2022. **20**(3): p. 224-234.
6. Marur, S. and A. A. Forastiere, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment*. Mayo Clin Proc, 2016. **91**(3): p. 386-96.
7. Giordano, Frank, *Kapitel 3 - HNO-Tumoren*, in *Strahlentherapie kompakt (Dritte Ausgabe)*, F. Giordano, et al., Editors. 2019, Urban & Fischer: Munich. p. 49-62.
8. Burtneß, B., et al., *Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study*. Lancet, 2019. **394**(10212): p. 1915-1928.
9. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
10. Alvi, A. and J. T. Johnson, *Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer*. Head Neck, 1997. **19**(6): p. 500-5.
11. Schöder, Heiko, *Head and Neck Cancer*, in *Nuclear Oncology: Pathophysiology and Clinical Applications*, H.W. Strauss, et al., Editors. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 269-295.
12. Kundu, S. K. and M. Nestor, *Targeted therapy in head and neck cancer*. Tumour Biol, 2012. **33**(3): p. 707-21.

13. Zoller, M., *CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?* Nat Rev Cancer, 2011. **11**(4): p. 254-67.
14. Orian-Rousseau, V., *CD44, a therapeutic target for metastasising tumours.* Eur J Cancer, 2010. **46**(7): p. 1271-7.
15. Chen, C., et al., *The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications.* J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 64.
16. Wang, Z., et al., *CD44/CD44v6 a Reliable Companion in Cancer-Initiating Cell Maintenance and Tumor Progression.* Front Cell Dev Biol, 2018. **6**: p. 97.
17. Orian-Rousseau, V. and J. Sleeman, *CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals.* Adv Cancer Res, 2014. **123**: p. 231-54.
18. Yan, Y., X. Zuo, and D. Wei, *Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target.* Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(9): p. 1033-43.
19. Noble, P. W. and D. Jiang, *Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair: the role of innate immunity.* Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(5): p. 401-4.
20. Orian-Rousseau, V. and H. Ponta, *Perspectives of CD44 targeting therapies.* Arch Toxicol, 2015. **89**(1): p. 3-14.
21. Ponta, H., L. Sherman, and P. A. Herrlich, *CD44: from adhesion molecules to signalling regulators.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 33-45.
22. Orian-Rousseau, V., et al., *CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling.* Genes Dev, 2002. **16**(23): p. 3074-86.
23. Orian-Rousseau, V., *CD44 Acts as a Signaling Platform Controlling Tumor Progression and Metastasis.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 154.
24. Orian-Rousseau, V., et al., *Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 76-83.
25. Ni, J., et al., *CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance.* Prostate, 2014. **74**(6): p. 602-17.
26. Ma, L., L. Dong, and P. Chang, *CD44v6 engages in colorectal cancer progression.* Cell Death Dis, 2019. **10**(1): p. 30.
27. Kashyap, T., et al., *Crosstalk between Raf-MEK-ERK and PI3K-Akt-GSK3beta signaling networks promotes chemoresistance, invasion/migration and stemness via expression of CD44 variants (v4 and v6) in oral cancer.* Oral Oncol, 2018. **86**: p. 234-243.

28. Ishimoto, T., et al., *CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(3): p. 387-400.
29. Muller, M., *Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(1): p. 59-98.
30. Spitz, D. R., et al., *Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology*. *Cancer Metastasis Rev*, 2004. **23**(3-4): p. 311-22.
31. Elgendy, S. M., et al., *Ferroptosis: An emerging approach for targeting cancer stem cells and drug resistance*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020. **155**: p. 103095.
32. Schoetz, U., et al., *Early senescence and production of senescence-associated cytokines are major determinants of radioresistance in head-and-neck squamous cell carcinoma*. *Cell Death Dis*, 2021. **12**(12): p. 1162.
33. Wang, S. J., et al., *CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression*. *Laryngoscope*, 2009. **119**(8): p. 1518-30.
34. Gunthert, U., et al., *A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells*. *Cell*, 1991. **65**(1): p. 13-24.
35. Todaro, M., et al., *CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis*. *Cell Stem Cell*, 2014. **14**(3): p. 342-56.
36. Afify, A., et al., *The expression of CD44v6 in colon: from normal to malignant*. *Ann Diagn Pathol*, 2016. **20**: p. 19-23.
37. Wu, X. J., et al., *Clinical significance of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in breast cancer*. *J Int Med Res*, 2015. **43**(2): p. 173-9.
38. Spiegelberg, D. and J. Nilvebrant, *CD44v6-Targeted Imaging of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Antibody-Based Approaches*. *Contrast Media Mol Imaging*, 2017. **2017**: p. 2709547.
39. Maihoefer, C., et al., *Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck - clinical results from the cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer"*. *Radiat Oncol*, 2018. **13**(1): p. 123.
40. *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas*. *Nature*, 2015. **517**(7536): p. 576-82.
41. Spiegelberg, D., et al., *Characterization of CD44 variant expression in head and neck squamous cell carcinomas*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(3): p. 2053-62.
42. Borjesson, P. K., et al., *Radioimmunodetection and radioimmunotherapy of head and neck cancer*. *Oral Oncol*, 2004. **40**(8): p. 761-72.

43. Athanassiou-Papaefthymiou, M., et al., *Evaluation of CD44 variant expression in oral, head and neck squamous cell carcinomas using a triple approach and its clinical significance*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2014. **27**(3): p. 337-49.
44. Kawano, T., et al., *Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer*. Auris Nasus Larynx, 2004. **31**(1): p. 35-41.
45. Mortensen, A. C., et al., *Preclinical evaluation of a novel engineered recombinant human anti-CD44v6 antibody for potential use in radio-immunotherapy*. Int J Oncol, 2018. **52**(6): p. 1875-1885.
46. Yang, Q., et al., *Expression of COX-2, CD44v6 and CD147 and relationship with invasion and lymph node metastasis in hypopharyngeal squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e71048.
47. De Jong, M. C., et al., *CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(21): p. 5329-38.
48. Bourguignon, L. Y., et al., *Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39703-12.
49. Pring, M., et al., *Dysregulated TGF-beta1-induced Smad signalling occurs as a result of defects in multiple components of the TGF-beta signalling pathway in human head and neck carcinoma cell lines*. Int J Oncol, 2006. **28**(5): p. 1279-85.
50. Prime, S. S., et al., *The role of TGF-beta in epithelial malignancy and its relevance to the pathogenesis of oral cancer (part II)*. Crit Rev Oral Biol Med, 2004. **15**(6): p. 337-47.
51. Pang, X., Y. L. Tang, and X. H. Liang, *Transforming growth factor-beta signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Insights into cellular responses*. Oncol Lett, 2018. **16**(4): p. 4799-4806.
52. Ghatak, S., et al., *Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) regulates CD44V6 expression and activity through extracellular signal-regulated kinase (ERK)-induced EGR1 in pulmonary fibrogenic fibroblasts*. J Biol Chem, 2017. **292**(25): p. 10465-10489.
53. Wu, F., et al., *Paradoxical roles of TGF- β signaling in suppressing and promoting squamous cell carcinoma*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018. **50**(1): p. 98-105.
54. Lu, S. L., et al., *Loss of transforming growth factor-beta type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma*. Genes Dev, 2006. **20**(10): p. 1331-42.

55. Scheel, C. and R. A. Weinberg, *Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links*. *Semin Cancer Biol*, 2012. **22**(5-6): p. 396-403.
56. Saito, S., et al., *CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 2013. **29**(4): p. 1570-8.
57. Bonner, J. A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(1): p. 21-8.
58. Fosgerau, K. and T. Hoffmann, *Peptide therapeutics: current status and future directions*. *Drug Discov Today*, 2015. **20**(1): p. 122-8.
59. Reubi, J. C. and H. R. Maecke, *Peptide-based probes for cancer imaging*. *J Nucl Med*, 2008. **49**(11): p. 1735-8.
60. Tremmel, M., et al., *A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis*. *Blood*, 2009. **114**(25): p. 5236-44.
61. Matzke-Ogi, A., et al., *Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer Models by Interference With CD44v6 Signaling*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(2): p. 513-25.e10.
62. Nozari, A. and M. V. Berezovski, *Aptamers for CD Antigens: From Cell Profiling to Activity Modulation*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017. **6**: p. 29-44.
63. Xu, W. and A. D. Ellington, *Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(15): p. 7475-80.
64. Pastor, F., et al., *CD28 aptamers as powerful immune response modulators*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013. **2**: p. e98.
65. Lao, Y. H., K. K. Phua, and K. W. Leong, *Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation*. *ACS Nano*, 2015. **9**(3): p. 2235-54.
66. Li, Q., et al., *Aptamers: a novel targeted theranostic platform for pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Radiat Oncol*, 2020. **15**(1): p. 189.
67. Somasunderam, A., et al., *Combinatorial selection of DNA thioaptamers targeted to the HA binding domain of human CD44*. *Biochemistry*, 2010. **49**(42): p. 9106-12.
68. Iida, J., et al., *DNA aptamers against exon v10 of CD44 inhibit breast cancer cell migration*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e88712.

69. Nagaraj, N. S. and P. K. Datta, *Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010. **19**(1): p. 77-91.
70. Wang, J., et al., *CD44v6 promotes beta-catenin and TGF-beta expression, inducing aggression in ovarian cancer cells*. *Mol Med Rep*, 2015. **11**(5): p. 3505-10.
71. Andarawewa, K. L., et al., *New rationales for using TGFbeta inhibitors in radiotherapy*. *Int J Radiat Biol*, 2007. **83**(11-12): p. 803-11.
72. Bouquet, F., et al., *TGFbeta1 inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and promotes tumor control by radiation in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(21): p. 6754-65.
73. Hardee, M. E., et al., *Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta*. *Cancer Res*, 2012. **72**(16): p. 4119-29.
74. Brenner, J. C., et al., *Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines*. *Head Neck*, 2010. **32**(4): p. 417-26.
75. Balló, H., et al., *Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model*. *Anticancer Res*, 1999. **19**(5b): p. 3827-36.
76. Dickson, M. A., et al., *Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(4): p. 1436-47.
77. Pekkola-Heino, K., et al., *Increased radiosensitivity is associated with p53 mutations in cell lines derived from oral cavity carcinoma*. *Acta Otolaryngol*, 1996. **116**(2): p. 341-4.
78. Hermsen, M. A., et al., *Centromeric breakage as a major cause of cytogenetic abnormalities in oral squamous cell carcinoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996. **15**(1): p. 1-9.
79. Debacq-Chainiaux, Florence, et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. *Nature Protocols*, 2009. **4**(12): p. 1798-1806.
80. Puck, T. T. and P. I. Marcus, *A RAPID METHOD FOR VIABLE CELL TITRATION AND CLONE PRODUCTION WITH HELA CELLS IN TISSUE CULTURE: THE USE OF X-IRRADIATED CELLS TO SUPPLY CONDITIONING FACTORS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1955. **41**(7): p. 432-7.
81. Brix, N., et al., *Analysis of clonogenic growth in vitro*. *Nat Protoc*, 2021. **16**(11): p. 4963-4991.

82. Lauber, K., et al., *Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy*. *Front Oncol*, 2012. **2**: p. 116.
83. Oosting, S. F. and R. I. Haddad, *Best Practice in Systemic Therapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 815.
84. Chen, J., et al., *Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 15.
85. Ni, J., et al., *CD44 variant 6 is associated with prostate cancer growth and chemo-/radiotherapy response in vivo*. *Exp Cell Res*, 2020. **388**(2): p. 111850.
86. Volz, Y., et al., *Direct binding of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor to CD44v6*. *Biosci Rep*, 2015. **35**(4).
87. Jung, C., et al., *Involvement of CD44v6 in InlB-dependent Listeria invasion*. *Molecular Microbiology*, 2009. **72**(5): p. 1196-1207.
88. Nagano, O., S. Okazaki, and H. Saya, *Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms*. *Oncogene*, 2013. **32**(44): p. 5191-8.
89. Ishii, T., Y. Sugita, and S. Bannai, *Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine*. *J Cell Physiol*, 1987. **133**(2): p. 330-6.
90. Horinek, D., et al., *Peptide adsorption on a hydrophobic surface results from an interplay of solvation, surface, and intrapeptide forces*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(8): p. 2842-7.
91. Li, L., et al., *CD44v6-Peptide Functionalized Nanoparticles Selectively Bind to Metastatic Cancer Cells*. *Adv Sci (Weinh)*, 2017. **4**(1): p. 1600202.
92. Liu, L. K. and B. Finzel, *High-resolution crystal structures of alternate forms of the human CD44 hyaluronan-binding domain reveal a site for protein interaction*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2014. **70**(Pt 9): p. 1155-61.
93. Banerji, S., et al., *Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction*. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(3): p. 234-9.
94. Mori, T., et al., *Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(43): p. 29602-12.
95. Chen, K. L., et al., *Structural Characterization of the CD44 Stem Region for Standard and Cancer-Associated Isoforms*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(1).
96. Zhang, D., et al., *Screening and identification of a CD44v6 specific peptide using improved phage display for gastric cancer targeting*. *Ann Transl Med*, 2020. **8**(21): p. 1442.

97. Khan, F., et al., *Identification of novel CD44v6-binding peptides that block CD44v6 and deliver a pro-apoptotic peptide to tumors to inhibit tumor growth and metastasis in mice*. *Theranostics*, 2021. **11**(3): p. 1326-1344.
98. Recio, J. A. and G. Merlino, *Hepatocyte growth factor/scatter factor induces feedback up-regulation of CD44v6 in melanoma cells through Egr-1*. *Cancer Res*, 2003. **63**(7): p. 1576-82.
99. Matzke, A., et al., *Haploinsufficiency of c-Met in cd44^{-/-} mice identifies a collaboration of CD44 and c-Met in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(24): p. 8797-806.
100. Tan, K. X., et al., *Towards targeted cancer therapy: Aptamer or oncolytic virus?* *Eur J Pharm Sci*, 2017. **96**: p. 8-19.
101. Zhang, Y., B. S. Lai, and M. Juhas, *Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications*. *Molecules*, 2019. **24**(5).
102. Lawrence, T. S., A. W. Blackstock, and C. Mcginn, *The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents*. *Semin Radiat Oncol*, 2003. **13**(1): p. 13-21.
103. Yoon, S., et al., *Aptamer-Drug Conjugates of Active Metabolites of Nucleoside Analogs and Cytotoxic Agents Inhibit Pancreatic Tumor Cell Growth*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017. **6**: p. 80-88.
104. Seiwert, T. Y., J. K. Salama, and E. E. Vokes, *The concurrent chemoradiation paradigm--general principles*. *Nat Clin Pract Oncol*, 2007. **4**(2): p. 86-100.
105. Dikomey, E., et al., *Chapter 11 - Radiation DNA damage and use in cancer/therapeutics-translation of radiation modifiers*, in *DNA Repair in Cancer Therapy (Second Edition)*, M.R. Kelley and M.L. Fishel, Editors. 2016, Academic Press: Boston. p. 329-352.
106. Mahajan, U. M., et al., *Tumor-Specific Delivery of 5-Fluorouracil-Incorporated Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Aptamers as an Efficient Treatment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Models*. *Gastroenterology*, 2021. **161**(3): p. 996-1010.e1.
107. Lv, L., et al., *Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(7): p. 8811-24.
108. Branco Da Cunha, C., et al., *CD44 alternative splicing in gastric cancer cells is regulated by culture dimensionality and matrix stiffness*. *Biomaterials*, 2016. **98**: p. 152-62.
109. Screaton, G. R., et al., *Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(24): p. 12160-4.

110. Zhou, J. and J. Rossi, *Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(3): p. 181-202.
111. Gold, L., et al., *Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15004.
112. White, R. A., S. P. Malkoski, and X. J. Wang, *TGF β signaling in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncogene, 2010. **29**(40): p. 5437-46.
113. Ghatak, S., et al., *Overexpression of c-Met and CD44v6 receptors contributes to autocrine TGF- β 1 signaling in interstitial lung disease*. J Biol Chem, 2014. **289**(11): p. 7856-72.
114. Shang, Z., et al., *A switch from CD44⁺ cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(2): p. 1202-16.
115. Wong, N. A. and M. Pignatelli, *Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis?* Am J Pathol, 2002. **160**(2): p. 389-401.
116. Wang, D., et al., *Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck*. Carcinogenesis, 1997. **18**(11): p. 2285-90.
117. Paterson, I. C., et al., *Decreased expression of TGF-beta cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma*. J Pathol, 2001. **193**(4): p. 458-67.
118. Seoane, J., et al., *Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation*. Cell, 2004. **117**(2): p. 211-23.
119. Gomis, R. R., et al., *C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytosstatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells*. Cancer Cell, 2006. **10**(3): p. 203-14.
120. Chen, C. R., et al., *E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression*. Cell, 2002. **110**(1): p. 19-32.
121. Kang, Y., C. R. Chen, and J. Massagué, *A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells*. Mol Cell, 2003. **11**(4): p. 915-26.
122. Yanagisawa, K., et al., *Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF-beta in human normal lung epithelial cells*. Oncogene, 1998. **17**(13): p. 1743-7.
123. Pardali, K. and A. Moustakas, *Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1775**(1): p. 21-62.

124. Sorrentino, A., et al., *The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(10): p. 1199-207.
125. Yamashita, M., et al., *TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta*. Mol Cell, 2008. **31**(6): p. 918-24.
126. Kang, S. H., et al., *Transcriptional repression of the transforming growth factor-beta type I receptor gene by DNA methylation results in the development of TGF-beta resistance in human gastric cancer*. Oncogene, 1999. **18**(51): p. 7280-6.
127. Fukai, Y., et al., *Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2003. **104**(2): p. 161-6.
128. Börjesson, P. K., et al., *Phase I therapy study with (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 2): p. 3961s-72s.

12 Anhang

12.1 Übersicht projektexterner Daten

Abbildung 1: adaptiert aus Wang et. al. [16] von Prof. Kirsten Lauber

Abbildung 2: adaptiert aus Wang et. al. [16] von Elisa Osterode

Abbildung 3: adaptiert aus Schötz et. al. [32] von Elisa Osterode

Abbildung 4: adaptiert aus Schötz et. al. (unveröffentlichte Daten). Daten wurden erhoben und ausgewertet von Dr. Ulrike Schötz.

Abbildung 5: adaptiert aus Schötz et. al. (unveröffentlichte Daten). Daten wurden erhoben und ausgewertet von Dr. Ulrike Schötz.

Abbildung 6: adaptiert aus Schötz et. al. (unveröffentlichte Daten). Auswertungen wurden durchgeführt von PD Dr. Kristian Unger.

12.2 Publikationsliste

Vorträge

Osterode E.; Evaluation of CD44v6 targeting strategies in Head-and-Neck-Squamous-Cell Carcinoma (HNSCC), Doktorandenkollegium, FöFoLe, Herrsching, Deutschland, 2019

Osterode E.; Evaluation of CD44v6 targeting strategies in HNSCC, Retreat des Helmholtz Zentrums Abteilung Zytogenetik und Klinik für Strahlentherapie AG Molekulare Onkologie, Kloster Seeon, Deutschland, 2018

Posterpräsentationen

Osterode E., Schötz U., Orth M., Selmansberger M., Schuster J., Hess J., Unger K., Zitzelsberger H., Belka C., Lauber K.; Evaluation of CD44v6 targeting strategies in HNSCCs; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie e.V. (DEGRO) 2019, Münster, Deutschland

Schötz U., Orth M., **Osterode E.**, Selmansberger M., Schuster J., Stegen B., Hess J., Unger K., Zitzelsberger H., Engenhardt-Cabillic R., Belka C., Lauber K.; Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Role of CD44v6; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (DeGBS), Frankfurt am Main, Deutschland, 2018

Passerini V., Boesl M., Silkenstedt E., **Osterode E.**, Heide M., Kridel R., Christoph Ziegenhain C., Staiger A., Ott G., Szczepanowski M., Richter J., Klapper W., Rosenwald A., Enard W., Hiddemann W., Bararia D., Zimmer-Strobl U., Weigert O.; PARP14 Is a Novel Therapeutic Target in *STAT6* mutant Follicular Lymphoma. *Blood* 2018; 132 (Supplement 1): 2842. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-118063>

Bösl MW, **Osterode E**, Bararia D, Pastore A, Staiger AM, Ott G, Szczepanowski M, Klapper W, Rosenwald A, Hiddemann W and Weigert O; *STAT6 Is Recurrently and Significantly Mutated in Follicular Lymphoma and Enhances the IL-4 Induced Expression of Membrane-Bound and Soluble CD23*, 57th Annual Meeting & Exposition of the American Society of Hematology, Orlando, USA

13 Lebenslauf

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. Kirsten Lauber, die es mir ermöglichte diese Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie durchzuführen. Für ihre zahlreichen konstruktiven Ratschläge, ihren unermüdlichen Einsatz, die hervorragende Betreuung und ihr stets offenes Ohr für alle Belange bin ich sehr dankbar.

Ebenso gilt ein großes Dankeschön den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Michael, Nikko, Roman, Samet, Heike, Jessica, Manfred und Leon für die schöne, kollegiale Zeit im Labor und ihre stetige Hilfsbereitschaft. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Michael für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die zahlreichen interessanten Diskussionen über CD44v6 & Co bedanken.

Herrn Prof. Claus Belka danke ich für die Möglichkeit der Erstellung dieser Doktorarbeit an seiner Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie, Klinikum der Universität München.

Bedanken möchte ich mich auch beim Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München unter der Leitung von Herrn Prof. Gudermann für die großartige wissenschaftliche Ausbildung und materielle Unterstützung.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine Freunde aus Regensburger Zeiten, München, Bogen und dem XLAB, die mich in allen Phasen dieser Arbeit motiviert haben.

Mein letzter und wichtigster Dank richtet sich an meine Eltern, die mich auf meinem Weg durch das Studium und dieser Arbeit stets begleitet haben.

Pura vida.

15 Eidesstattliche Erklärung

Osterode, Elisa Vanessa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Evaluierung von CD44v6 als neue molekulare Zielstruktur für multimodale Radiotherapie von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 21.11.2022

Elisa Vanessa Osterode

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin