Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
durch das Institut für Biologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Enno Hartmann

TLR3 und p38 MAP Kinase vermittelte Signaltransduktionskaskaden in Kopf-Hals-Karzinomen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von
Christine Riebe
aus Hannover

Lübeck, 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Enno Hartmann

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Barbara Wollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2009

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.02.2009

gez. Prof. Dr. Jürgen Prestin

- Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **3**
Zusammenfassung **5**
Abstract **6**
1 Einleitung **7**
1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich **7**
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren 7
1.1.2 Molekulare Mechanismen der Karzinogenese 9
1.2 Die p38 MAP Kinase **11**
1.2.1 Die Signaltransduktion von MAP Kinasen 11
1.2.2 Aufbau und Funktion der p38 MAP Kinase 13
1.2.3 Die Rolle der p38 MAP Kinase bei der Tumorigenese 14
1.3 Toll-like Rezeptor 3 vermittelte Signalwege **15**
1.3.1 Aufbau und Funktion von Toll-like Rezeptoren 15
1.3.2 Aufbau und Signaltransduktion von TLR3 16
1.3.3 Die Funktion von TLR3 bei verschiedenen Krebsentitäten 17
1.4 Fragestellung **18**
2 Ergebnisse **20**
2.1 Charakterisierung der p38 MAP Kinase in Kopf-Hals-Karzinomen **20**
2.2 PolyI:C induzierte Aktivierung von TLR3 in HNSCC **39**
3 Diskussion **48**
3.1 p38 MAP Kinase abhängige Expression von IL-6 und IL-8 in HNSCC **48**
3.2 Regulation der STAT3 Aktivität durch die p38 MAP Kinase **52**
3.3 TLR3 als wichtiger Faktor für die Progression von HNSCC **54**
4 Material und Methoden **59**
4.1 Chemikalien und Reagenzien **59**
4.2 Zelllinien **59**

4.3 Antikörper 60
4.4 siRNA 61
4.5 Zellkultur 62
4.5.1 Kultivierung von HNSCC-Zelllinien 62
4.5.2 Stimulation von Zelllinien 62
4.5.3 Bestimmung der Zellzahl 63
4.6 Transfektion von HNSCC-Zelllinien 63
4.6.1 Inhibierung ("Silencing") von Targetgenen 63
4.6.2 Transfektion 64
4.7 Durchflusszytometrie 64
4.7.1 Annexin V und Propidiumjodid (PI)-Färbung 65
4.8 Messung von Zytokinen aus Zellkulturüberständen 65
4.8.1 Flex-Set Messung im Durchflusszytometer 65
4.8.2 Messung von Zellkulturüberständen im Bioplex-Array-Reader ™ 67
4.9 Proteinbiochemie 68
4.9.1 Isolierung von Proteinrohextrakten 68
4.9.2 SDS-Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; [102]) 69
4.9.3 Western-Hybridisierung 69
4.10 ELISA 70
4.11 Proliferations-Assay (MTT-Test) 71
4.12 Proteom Profiler Array (RND SYSTEMS) 71
5 Referenzen 73
6 Anhang 82
6.1 Abkürzungsverzeichnis 82
6.2 Lebenslauf 85
6.3 Danksagung 86
6.4 Eidesstattliche Erklärung 87

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Regulation und Bedeutung TLR3 und p38 MAP Kinase abhängiger Signaltransduktionswege bei der Progression maligner Tumore des Kopf-Hals-Bereiches ("head and neck squamous cell carcinoma"; HNSCC) untersucht werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Induktion von MAP Kinase Signalwegen durch den Phorbolester PMA zu einer Erhöhung der Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und IL-8 in HNSCC führte. Die Regulation fand in einem großen Zeitrahmen von der Stimulation bis zur Interleukin-Sekretion statt. Die Zytokine IL-6 und IL-8 sind in HNSCC an Prozessen der Immunsuppression und Angiogenese beteiligt. Mit Hilfe von p38 spezifischer siRNA konnte die Beteiligung der p38 MAP Kinase an der Regulation dieser Zytokine eindeutig nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lassen darüber hinaus eine Beteiligung weiterer MAP Kinase Signalwegen bei diesen Biosynthesewegen vermuten. Die Herunterregulation des p38 MAPK Proteinlevels konnte außerdem die STAT3 Phosphorylierung am Tyrosin 705 inhibieren, hatte aber keinen Einfluss auf den Tumorsuppressor p53. STAT3 ("signal transducer and activator of transcription") Proteine sind in HNSCC überexprimiert und werden durch den autokrinen TGF-α/EGFR Signalweg aktiviert, was zu einer gesteigerten Proliferation führt. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die p38 MAP Kinase in HNSCC eine tumorinduzierende Funktion besitzt, und nicht wie in anderen Tumorentitäten gezeigt, tumorsupprimierend wirkt.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Funktion der Toll-like Rezeptor 3 vermittelten Signaltransduktion bei der Tumorprogression untersucht. Hierfür wurden HNSCC Zelllinien mit PolyI:C, dem artifiziellen Liganden von TLR3, inkubiert. Entgegen den Ergebnissen aus Studien mit Mammakarzinom Zelllinien, konnte keine PolyI:C induzierte Apoptose in HNSCC Zelllinien festgestellt werden. Die PolyI:C Stimulation führte zu einer Aktivierung der MAP Kinase ERK1/2 und induzierte die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8. Diese Ergebnisse unterstützen die bisherigen Vermutungen einer wichtigen Funktion von TLR3 bei der Tumorigenese von HNSCC und verdeutlichen die enorme Heterogenität der molekularen Mechanismen der Progression unterschiedlicher Tumorentitäten.

Abstract

In this thesis the regulation and importance of TLR3 and p38 MAP Kinase dependent signal transduction pathways in progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) were investigated. It was demonstrated that stimulation with the phorbolester PMA induced MAP Kinase activation and increased IL-6 and IL-8 levels in HNSCC supernatants. Interestingly, this upregulation of IL-6 and IL-8 occurred in a time dependent manner. The cytokines IL-6 and IL-8 are involved in immune suppression and angiogenesis in HNSCC. Silencing of p38 MAP Kinase indicated a contribution of p38 to the regulation of cytokine secretion in HNSCC, but cross-talk between several MAP Kinases is presumed. Further investigations also showed a p38 dependent STAT3 phosphorylation on Tyrosin 705 with no influence on the tumour promoting protein p53. STAT3 overexpression in HNSCC leads to an increased proliferation by autocrine activation through EGFR-TNF-α signalling.

In this thesis the role of TLR3 signal transduction in tumour progression was investigated. In HNSCC cell lines the stimulation with PolyI:C did not result in increased levels of pro-apoptotic proteins as it was suggested in recent studies on breast cancer. Furthermore, PolyI:C also induced activation of ERK1/2 MAP Kinase and led to increased levels of IL-6 and IL-8 in cell culture supernatants. This data confirm our theory of TLR3 as an important tumour promoting factor of HNSCC and underline the major heterogeneity of molecular mechanisms within progression of different tumour entities.

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Mit einer Inzidenz von rund 500˙000 jährlichen Erkrankungen handelt es sich bei den malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich um die sechsthäufigste Tumorerkrankung weltweit mit etwa 90% Plattenepithelkarzinomen ("Head and Neck Squamous Cell Carcinoma"; HNSCC) [1]. Hauptrisikofaktoren sind neben chronischem Tabak- und Alkoholkonsum [2] genetische Ursachen [3] sowie virale Erkrankungen (Epstein-Barr-Virus oder Humanes Papillomavirus [4]) und die Exposition von Stäuben und Noxen aus dem beruflichen Bereich (z.B. Asbest oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe). Auch der Nikotinkonsum im sozialen Umfeld ist bei 3% der Patienten die Ursache einer HNSCC Erkrankung [5]. Chronische Entzündungen, die vor allem durch starken Nikotin- und Alkoholkonsum hervorgerufen werden, sind für die Bildung von etwa 20% aller Malignome verantwortlich und stellen ein hohes Erkrankungsrisiko dar [6]. Das Manifestationsalter beträgt im Durchschnitt 60 +/- 15 Jahre, wobei Männer etwa viermal häufiger als Frauen betroffen sind, da sie häufiger Umgang mit den beschriebenen Noxen haben [7, 8]. Allerdings stieg die Anzahl an HNSCC erkrankten Frauen in den letzten Jahren deutlich an.

Aufgrund ihrer Lokalisation lassen sich Tumoren des Kehlkopfes, der Mundhöhle, der Nasenhaupt- und nebenhöhlen sowie des Rachens (Oro-, Hypo- und Nasopharynx) unterscheiden. Die Klassifikation der Tumorstadien erfolgt nach dem internationalen TNM-System der UICC ("Union International Contre Cancer"). Hierbei wird die Größe des Primärtumors zunehmend vom Stadium T1 bis T4, das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung zunehmend von N0 bis N3 und das Auftreten von Fernmetastasen (M0 oder M1) unterschieden. Die prognostische Einteilung der Tumoren erfolgt in Abhängigkeit der beschriebenen Tumorstadien zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in

vier Schweregrade (Tabelle 1) und wird histopathologisch gesichert. Der Differenzierungsgrad gibt Informationen über den Malignitätsgrad des Tumors ("grading") und reicht von G1 (gut oder hochgradig differenziert) über G2 (mäßig oder mittelgradig differenziert) und G3 (schlecht oder wenig differenziert) bis G4 (un- oder entdifferenziert).

Tabelle 1: UICC Klassifikation von HNCC

Stadium	**Primärtumor**	**regionäre Lymphknoten**	**Fernmetastasen**
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IV A	T4	N0, N1	M0
	jedes T	N2	M0
IV B	jedes T	N3	M0
IV C	jedes T	jedes N	M1

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im Durchschnitt 50% in allen Stadien von HNSCC bei der aktuellen Standardtherapie [9], wobei eine frühzeitige Behandlung von Lymphknotenmetastasen diese erheblich verbessert. Neben der Größe des Primärtumors ist die Prognose auch von der anatomischen Lokalisation, der lokoregionären Metastasierung von Lymphknoten, der Resektion im Gesunden und dem Vorhandensein von Fernmetastasen abhängig.

Die Diagnose von HNSCC wird häufig aufgrund später Symptome erst im fortgeschrittenen Tumorstadium gestellt. Nach dem chirurgischen Entfernen des Tumors findet eine Chemo- bzw. Strahlentherapie statt. In fortgeschrittenen Tumorstadien sind die Behandlungsmöglichkeiten derzeit begrenzt. Des Weiteren gibt

es eine hohe Rate an Zweitkarzinomen, Rezidiven und Resistenzen gegenüber den eingesetzten Zytostatika wie Cisplatin, Carboplatin und 5- Fluorouracil.

1.1.2 Molekulare Mechanismen der Karzinogenese

Tumore entwickeln mit fortschreitendem Wachstum die Fähigkeit aus bereits bestehenden Blutgefäßen neue Kapillaren durch Aussprossung zu bilden, durch die der Tumor mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt wird und die die Bildung von Metastasen ermöglichen [10]. Dieser als Angiogenese bezeichnete Prozess beginnt mit der Vaskularisierung von Tumoren durch die Produktion von Angiogenesefaktoren wie VEGF ("vascular endothelial growth factor") und bFGF ("basic fibroblast growth factor"), indem sie die Aussprossung von Mikrogefäßen aktivieren, wenn sie an benachbarte Blutgefäße gelangen. Bei Kopf-Hals-Karzinomen ist die Gefäßdichte gegenüber gesunder Schleimhaut stark erhöht und Angiogenesefaktoren wie VEGF, PDGFα/ß ("platelet derived growth factor") und GM-CSF ("granulocyte macrophage colony stimulating factor") sowie das Chemokin Interleukin-8, das die Migration von Leukozyten aus dem Blut zur lokalen Entzündung steuert, werden stark sekretiert [11].

Neben der Angiogenese spielen Onkogene bei der molekularen Pathogenese von HNSCC eine wichtige Rolle [12]. Bei Onkogenen handelt es sich um veränderte Gene, deren Funktion in der Regulation von Signaltransduktionswegen liegt, und deren Mutation entweder zur Überexpression oder fehlerhaften Funktion ihres Proteins führt. Zu den Onkogenen in HNSCC gehören Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren (z.B. EGFR; "epidermal growth factor receptor"), Mediatoren der Signaltransduktion wie STAT3 ("signal transducers and activators of transcription"), ras oder raf sowie Transkriptionsfaktoren wie myc oder Regulatoren wie Bcl-2 und Bax, die an der der Apoptose beteiligt sind [13]. Ein Beispiel für die dysregulierte Funktion von Onkogenen ist die autokrine Aktivierung von EGFR durch TGF-α, die zur STAT3 Aktivierung führt und somit unkontrolliertes Zellwachstum induziert [14]. Eine konstitutive STAT3 Aktivität ist ein frühes Merkmal der HNSCC Karzinogenese und entscheidend für eine gesteigerte Proliferation, da die Inhibierung der STAT3 Aktivität

zu verstärkter Apoptose und verminderter Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-xl führt [15]. Neben der Aktivierung durch Wachstumsfaktoren wie TGF-α kann STAT3 auch durch Zytokine der IL-6 Familie aktiviert werden. STAT3 induziert die Expression von SOCS1 und SOCS3 ("suppressor of cytokine signaling"), die durch negative Regulation in den IL-6 Signalweg eingreifen. Bei einem Drittel der Kopf-Hals Karzinome sind SOCS1 und SOCS3 durch Methylierungen gesilenced [16, 17]. Der Methylierungsstatus von SOCS1 und SOCS3 beeinflusst die STAT3 Aktivität und somit die Proliferation und wird als ein möglicher Faktor für eine pharmazeutische Behandlung von HNSCC angesehen [16].
Tumorsuppressorgene induzieren bei zellulärem Stress wie UV-Licht oder Hypoxie Zellzyklus–Arrest oder Apoptose. Auf diese Weise werden Zellschädigungen oder unkontrolliertes Wachstum geschädigter Zellen verhindert. Durch Punktmutationen oder Deletionen können Tumorsuppressorgene in ihrer Funktion gestört sein. Ein Beispiel hierfür ist *p53*, das für die Aufrechterhaltung der Genomstabilität verantwortlich ist [18]. In vielen malignen Tumoren ist *p53* mutiert und stellt die häufigste genetische Veränderung dar. Bei Kopf-Hals-Karzinomen sind *p53* Mutationen im Zusammenhang mit hohem Tabakkonsum und der daraus resultierenden hohen Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2, bei gleichzeitiger Suppression des pro-apoptotischen Proteins Bax [13].

Maligne Tumore des Kopf-Hals-Bereiches haben Strategien entwickelt, der Erkennung durch das Immunsystem auszuweichen. Dieser als "immune escape" bezeichnete Mechanismus geschieht zum einen durch die Herunterregulation von HLA I (Humanes Leukozyten Antigen Typ I) Molekülen an der Zelloberfläche und die gleichzeitige Überexpression des Fas Liganden. Auf diese Weise entzieht sich der Tumor der Erkennung durch T-Lymphozyten, da durch die Bindung von Fas an den Fas Liganden des Tumors die Apoptose bei den T-Lymphozyten induziert wird [19]. Ein weiterer Mechanismus ist die direkte Immunsuppression durch die Produktion inhibitorischer Mediatoren wie VEGF ("vascular endothelial growth factor"), PGE2 (Prostaglanding E2), TGF-ß ("tumour growth factor"-ß) oder IL-10. Diese unterdrücken die Reifung Dendritischer Zellen und blockieren somit die Antigenpräsentation für die T-Zell-

Antwort [19]. Schließlich kann der Tumor durch indirekte Immunsuppression der Immunantwort entgehen, indem er Makrophagen rekrutiert, die ihrerseits durch die Sekretion löslicher Mediatoren wie H_2O_2 die Apoptose von T-Zellen induzieren [20, 21]. Patienten mit HNSCC besitzen einen reduzierten peripheren Level an CD3, CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten und ihr Zytokinprofil zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Th2 Zytokinen aus, während die Th1 Zytokine unterdrückt werden. Diese Verschiebung des Zytokinprofils steht in Zusammenhang zu einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung [22].

1.2 Die p38 MAP Kinase

1.2.1 Die Signaltransduktion von MAP Kinasen

Die Weiterleitung extrazellulärer Signale vom Rezeptorprotein bis zu den intrazellulären Zielorten benötigt ein Netzwerk von Proteinen, die miteinander interagieren und viele verschiedene Prozesse innerhalb der Zelle regulieren. Eine wichtige Signaltransduktionskaskade verläuft über MAP-Kinasen ("mitogen activated protein"), die an vielen physiologischen Prozessen wie der Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration, Apoptose oder am Zellzyklus beteiligt sind. MAP Kinasen gehören zu einer Familie von intrazellulären Proteinkinasen, die durch Phosphorylierungen an ihrer Aktivierungsdomaine aktiviert werden. Sie aktivieren weitere Kinasen oder Proteine durch Phosphorylierungen. Auf diese Weise werden mit Hilfe von Phosphorylierungskaskaden extrazellulärer Signale vom Rezeptor in den Zellkern weitergeleitet. Am Ende werden im Zellkern Transkriptionsfaktoren aktiviert, sodass bestimmte Gene als Antwort auf das extrazelluläre Signal transkribiert werden können [23].

MAP-Kinasen werden in allen eukaryotischen Lebewesen exprimiert und sind von der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bis zum Menschen hoch konserviert [24]. Der MAP-Kinase Signalweg besteht im einfachsten Fall aus drei Proteinkinasen. Die erste Proteinkinase dieses Dreikomponenten-Moduls ist eine MAP Kinase Kinase Kinase

(MKKK), eine Serin-/Threoninkinase, die durch die Phosphorylierung durch eine übergeordnete Kinase (MKKKK), durch Interaktion mit einem GTP-bindenden Protein der Ras-/Rho-Familie, oder durch Oligomerisation aktiviert werden kann. Nach der Aktivierung erfolgt die Signalweiterleitung durch Phosphorylierung der Serin- oder Threoninuntereinheit einer MAPK Kinase (MKK). Diese erkennen und phosphorylieren dualspezifisch Threonin-/Tyrosin-Motive (Thr-X-Tyr) der untergeordneten Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), die als letzte Proteinkinasen des Dreikomponenten-Moduls aktiviert werden. Ihre Substrate sind Transkriptionsfaktoren, andere Proteinkinasen, Phospholipasen oder am Zytoskelett assoziierte Proteine und werden von der MAP Kinase an Serin- und Threoninuntereinheiten phosphoryliert [24]. Um die Spezifität und die Effizienz der Signalweiterleitung zu erhöhen, wird das MAP Kinase Modul durch so genannte "Scaffold"-Proteine im Zytoplasma zusammengehalten. Diese Proteine interagieren gleichzeitig mit mehreren Proteinsubstraten und können auf diese Weise die MAP Kinase Module und mit ihren Substraten zusammenbringen [25, 26]. Nach der Aktivierung dissoziiert die MAP Kinase von dem "Scaffold"-Protein und wandert in den Nukleus, wo die Substrate phosphoryliert werden [27]. Nachdem ihre Funktion erfüllt ist, werden die MAP-Kinasen dephosphoryliert und die Signalweiterleitung beendet [28]. Neben der Aktivierung durch eine Phosphorylierungskaskade wird bei einigen MAP Kinasen auch die Möglichkeit der Autophosphorylierung diskutiert [29].

MAP-Kinasen lassen sich bei Säugetieren in sechs Gruppen unterteilen: ERK1/2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK7/8 ("extracellular signal related kinase"), JNK1/2/3 ("Jun N-terminal kinase") und die p38 MAP Kinase [30]. Jede Gruppe der MAP Kinasen wird von unterschiedlichen Stimuli aktiviert und induziert somit unterschiedliche Zellantworten. So reguliert die ERK1/2 MAP Kinase die Proliferation und das Überleben der Zelle [31], der JNK1/2 Signalweg induziert entweder Apoptose oder Proliferation und die p38 MAP Kinase blockiert die Proliferation oder verstärkt die Apoptose [32]. In der Abbildung 1 ist schematisch die Signalkaskade von ERK1/2, p38 und JNK1/2 dargestellt.

Die MAP Kinase Signalwege können auch miteinander interagieren. So aktivieren MAPKK Kinasen wie MEKKK1/2/3 sowohl MEK1 ("raf/mitogen activated protein

/extracellular signal regulated kinase kinase 1") als auch MKK7 und stellen somit eine Verbindung zwischen ERK1/2 und JNK1/2 Signalwegen her [33].

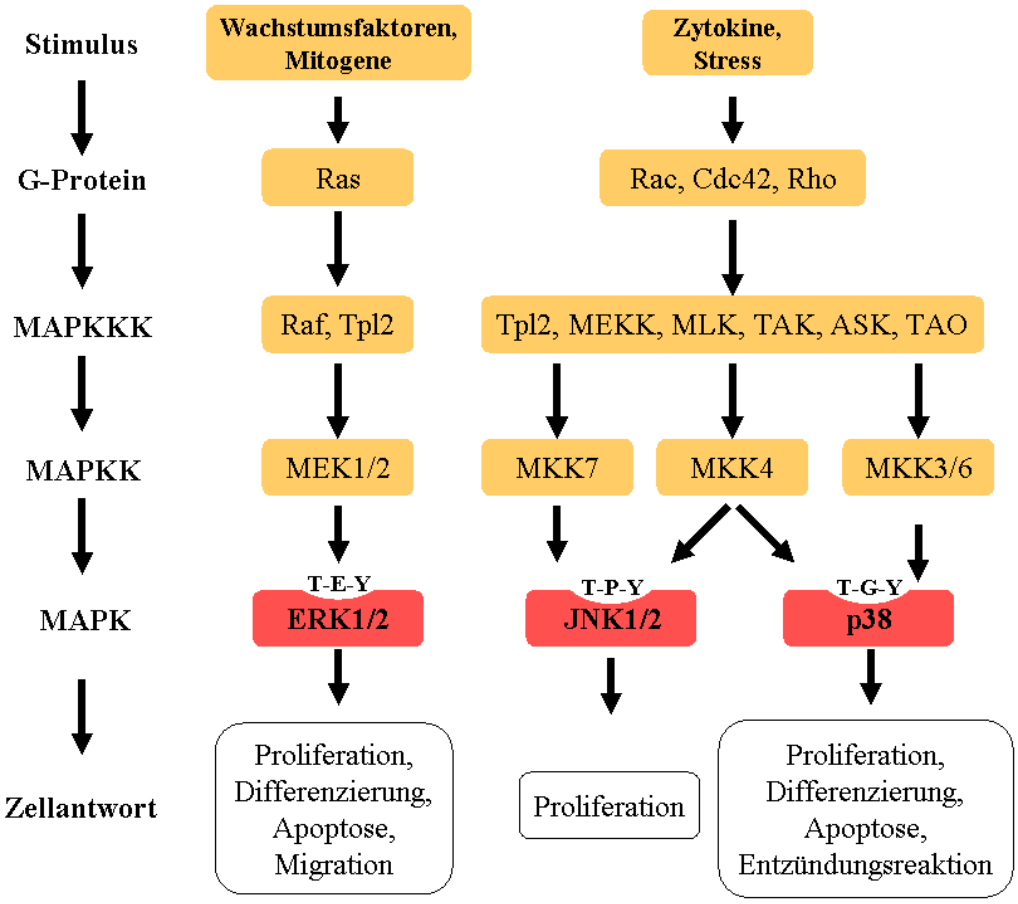


Abbildung 1: MAP Kinase Signaltransduktionswege (aus [30])
Es sind die Signalwege der MAP Kinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 mit ihren Phosphorylierungsmotiven und den Effekten auf die Zellantwort dargestellt. (Aminosäurekürzel der Phosphorylierungsmotive: T= Threonin, Y= Tyrosin, E= Glutamat, P= Prolin, G= Glycin)

1.2.2 Aufbau und Funktion der p38 MAP Kinase

Die p38 MAP Kinase besteht aus den vier Isoformen p38α, p38β, p38γ und p38δ, die durch Phosphorylierung von MKK3 und MKK6 am Threonin-Glycin-Tyrosin (TGY) - Phosphorylierungsmotiv aktiviert werden. Die Isoformen p38α und p38β werden in allen Geweben exprimiert, wogegen die p38γ vor allem im Skelettmuskel und die p38δ beispielsweise in Lunge, Niere oder Pakreas exprimiert werden [34, 35]. Die p38 MAP

Kinase gehört mit JNK1/2 zu den Stress-aktivierten MAP Kinasen und wird durch extrazelluläre Stimuli wie zum Beispiel UV-Licht, Hitze, osmotischen Schock Entzündungsreaktionen (IL-1, TNF-α) oder Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF) aktiviert. Die Aktivierung der p38α MAP Kinase ist vom Zelltyp und Stimulus abhängig. So kann beispielsweise Insulin in Mausadipozyten die p38 MAPK aktivieren und in neuronalen Zellen herunterregulieren [36]. Neben der Aktivierung durch übergeordnete MAP Kinasen kann die p38α MAP Kinase durch die Interaktion mit TAB1 ("transforming growth factor-ß-activated protein kinase 1-binding protein 1") autoaktiviert werden [37].
Nach der Aktivierung erfolgt die Translokation der p38 MAP Kinase vom Zytosol in den Nukleus, wo verschiedene Substrate phosphoryliert werden. Hierzu gehören MK2 und MK3 ("MAP kinase activated protein kinase 2/3") oder Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel AP-1 oder NFκB [36]. Die p38 MAP Kinase ist ein wichtiger Faktor bei der Entzündungsreaktion, zum einen durch die Produktion von Zytokinen wie TNF-α oder IL-1 und zum anderen durch die Regulation von Proliferation und Differenzierung von Immunzellen. Des Weiteren ist sie an der Regulation von Apoptose und Zellzyklus beteiligt [36].

1.2.3 Die Rolle der p38 MAP Kinase bei der Tumorigenese

Aufgrund der vielfältigen Dysregulationen sind Tumore vielen Stresssignalen wie Entzündungen ausgesetzt, sodass Stress-aktivierte Proteinkinasen wie JNK und p38 bei der Karzinogenese eine bedeutende Rolle spielen. Der p38 MAP Kinase wird eine Funktion als Tumorsuppressor nachgesagt, da sie an der negativen Regulation der Proliferation beteiligt ist. Dies basiert vor allem auf der Beobachtung, dass MEF ("mouse embryo fibroblasts") Zelllinien, die ein Onkogen überexprimierten, ein stärkeres Tumorwachstum zeigten, wenn zugleich p38 deletiert war, als Wildtyp Zellen mit funktionaler p38 MAP Kinase [32]. Außerdem ist die p38 MAP Kinase an der Aktivierung des Tumorsuppressors p53 und der p53 regulierten Apoptose beteiligt [38]. Die Funktion der p38 MAP Kinase in Kopf-Hals-Karzinomen ist noch weitestgehend unbekannt. Eine Inhibierung der p38 MAP Kinase in HNSCC Zelllinien inhibierte auch

die Expression von MMP-1 und MMP-13 ("matrix metalloprotease") sowie die Proliferation der Zelllinien. Dies lässt eine Beteiligung der p38 MAP Kinase an dem invasiven Wachstum und der Proliferation von HNSCC vermuten [39].

1.3 Toll-like Rezeptor 3 vermittelte Signalwege

1.3.1 Aufbau und Funktion von Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren gehören zu den "pattern recognition" Rezeptoren (PRR), die pathogene Strukturen (PAMPs; "pathogen-associated molecular patterns") wie LPS, dsDNA, CpG-Oligonukleotide oder Flagellin erkennen und binden. Die PRR werden auf der Zelloberfläche und intrazellulären Kompartimenten exprimiert oder in den Blutkreislauf und Lymphbahnen sekretiert [40]. Der Aufbau von Toll-like Rezeptoren ist vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bis zu Säugetieren hoch konserviert. Das Protein "Toll" wurde zuerst bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als ein essentieller Faktor bei der dorso-ventralen Embryonalentwicklung identifiziert. Des Weiteren zeigte sich, dass Toll negative Mutanten anfälliger gegenüber Pilzinfektionen waren [41].

Inzwischen sind bei Säugetieren 13 verschiedene Toll-like Rezeptoren bekannt, von denen 11 TLRs beim Menschen exprimiert werden [42]. Toll-like Rezeptoren gehören zur Familie der Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R), deren Mitglieder eine zytoplasmatische TIR (Toll/IL-1R) - homologe Domäne besitzen, an der die Bindung von Adaptermolekülen für die Initiation der Signalweiterleitung erfolgt. Sie besteht aus 160 Aminosäuren und lässt sich in drei Regionen, Box1 bis Box3, unterteilen (Abbildung 2). Die Ektodomäne von TLRs besteht aus Leucin-reichen Wiederholungen (LRR), die eine spezifische Bindung des Liganden ermöglichen. Innerhalb der Gruppe humaner TLRs befinden sich vier intrazelluläre TLRs, die Nukleinsäuren binden und auf endosomalen Membranen exprimiert sind. Die Ligand-bindende LRR Domäne befindet sich in dem Lumen der intrazellulären Vesikel (Abbildung 2).

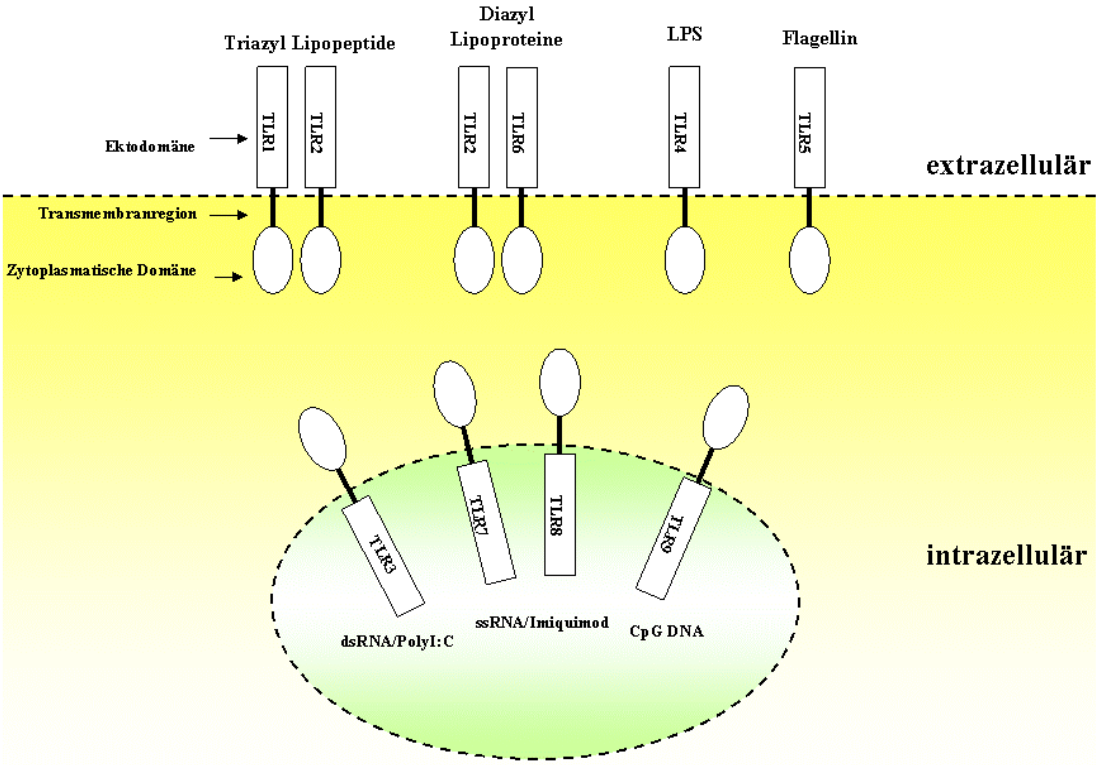


Abbildung 2: Lokalisation und spezifische Liganden humaner Toll-like Rezeptoren (nach [43])
Toll-like Rezeptoren (TLR) befinden sich aufgrund ihrer Spezifität zu ihren jeweiligen Liganden entweder auf der Zellmembran oder werden auf intrazellularen Kompartinenten wie dem Endosom exprimiert. Sie lassen sich in ihrem strukturellen Aufbau in Ektodomäne, Transmembranregion und zytoplasmatische Domäne unterteilen.

1.3.2 Aufbau und Signaltransduktion von TLR3

Der Toll-like Rezeptor 3 besitzt in der Ektodomäne 23 Leucin-reiche Wiederholungen (LRR), die eine hufeisenförmige Spule bilden und an jedem Ende weitere spezielle LRRs aufweisen (LRR-C-Terminal, LRR-N-Terminal; [44]). Obwohl die Ektodomäne als ein Monomer vorliegt, benötigt die Bindung von dsRNA die Bildung eines Dimers [45].

Humane *TLR3* mRNA konnte in der Placenta, Pankreas, Lunge, Leber, im Herz und Gehirn sowie auf Immunzellen wie Myeloide Dendritische Zellen (MDC) und Monozyten, T-, B- und NK-Zellen nachgewiesen werden. TLR3 wird durch die

Bindung doppelsträngiger RNA (dsRNA) oder durch den artifiziellen Liganden PolyI:C ("Polyinosinic acid") aktiviert. Anschließend verläuft die Signaltransduktion über einen MyD88 unabhängigen Signalweg, der durch TRIF ("TIR domain containing adapter protein inducing IFN-ß") reguliert wird [46]. Eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, AP-1 und NFκB führt schließlich zu einer Typ I Interferon Produktion, zur Expression entzündungsrelevanter Zytokine und Chemokine sowie zur Reifung von Dendritischen Zellen [47]. Somit spielt die TLR3 vermittelte Signaltransduktion eine große Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort.
Beim Transport extrazellulärer dsRNA zu den TLR3 exprimierenden Organellen ist möglicherweise CD14 durch Interaktion mit TLR3 beteiligt [48]. Auch die zytosolischen Rezeptoren RIG-1 ("retinoic-acid reducible gene 1") und MDA-5 ("melanoma differentiation associated gene 5") induzieren Produktion von INF-α/ß nachdem sie PolyI:C oder 5´-Triphosphat-haltiger ssRNA/dsRNA binden [49]. Allerdings ist der Unterschied zwischen dem RIG-1/MDA5-Signalweg zu dem TLR3-Signalweg noch weitestgehend unklar und lässt eine Beurteilung der dsRNA induzierten Immunantwort nicht zu.

1.3.3 Die Funktion von TLR3 bei verschiedenen Krebsentitäten

Auch in anderen Karzinomen ist eine TLR3 Expression festgestellt worden. In Mammakarzinomen verläuft eine PolyI:C induzierte Apoptose über TLR3 und TRIF. Wie die Neutralisation des Typ I IFN Rezeptors mit spezifischen Antikörpern zeigte, benötigt die PolyI:C induzierte Apoptose einen Typ I INF Stimulus. Des Weiteren ist die TLR3 vermittelte Zytotoxizität von NFκB abhängig und verläuft über den extrinsischen Caspaseweg [50].
Bei Prostatakarzinomen induziert eine PolyI:C Inkubation ebenfalls eine TLR3 vermittelte Apoptose. Hier ist die PKC vor den MAPK p38 und JNK vorgeschaltet. In Abhängigkeit zur untersuchten Zelllinie konnte auch eine Reduktion von MYC und eine Aktivierung der Proteine p27, p21 und von Cyclin D1 beobachtet werden [51].
Bei Analysen des TLR Profils in HNSCC konnte ausschließlich TLR3 nachgewiesen werden [52]. Die bisherigen Ergebnisse ergaben, dass die TLR3 Expression in

Zusammenhang zur Tumorigenese steht, da in der Schleimhaut gesunder Patienten TLR3 nicht nachzuweisen ist. Gleichzeitig konnte eine starke Expression von NFκB bei Tumorpatienten und bei gesunder Mucosa von starken Rauchern beobachtet werden. Möglicherweise verursacht der starke Zigarettenkonsum eine chronische Entzündung mit der daraus resultierenden NFκB Expression. Das gleiche Ergebnis zeigte die Analyse von Gewebeproben, die aus tumornahen und tumorfernen Regionen der Mucosa eines Tumorpatienten entnommen wurden. TLR3 wurde im Tumor stark exprimiert, war jedoch nicht in den umliegenden Geweben vorhanden. Dagegen konnte NFκB bei allen Gewebeproben nachgewiesen werden. Die Entstehung von HNSCC resultiert, wie zuvor erwähnt, aus chronischen Entzündungen und lässt deshalb eine TLR3 unabhängige Regulation der NFκB Aktivität vermuten. Des Weiteren kann man vermuten, dass die starke TLR3 Expression im Tumor einen zusätzlichen Stimulus für die NFκB Aktivierung fördert.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Inhibierung von TLR3 mit spezifischer siRNA die Proliferation bei HNSCC Zelllinien verringert. Da die Expression von dem Onkogen *c-myc*, das an der Regulation des Zellwachstums und des Zellzyklus beteiligt ist, durch das Silencing von TLR3 ebenfalls reduziert wird, ist eine *c-myc* abhängige Regulation des Zellwachstums bei HNSCC nicht auszuschließen. Wachstumstests mit der Mausfibroblasten Zelllinie NIH3T3, die stabil mit einem TLR3 Überexpressionsplasmid transfiziert wurde, zeigten eine stärkere Proliferation nach PolyI:C Zugabe, die durch das *c-myc* inhibitorische Peptid Int-H1-S6A inhibiert wurde.

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass in HNSCC TLR3 die NFκB Expression verstärkt und eine mögliche *c-myc* vermittelte Regulation des Zellwachstums induziert.

1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte die Rolle der p38 MAP Kinase bei der Progression maligner Kopf-Hals-Tumore untersucht werden. Mit Hilfe von siRNA Experimenten und der Stimulation von HNSCC Zelllinien mit PMA (Phorbol-myristat-acetat) wurde die allgemeine Rolle von p38 bei der Regulation zellulärer Prozesse in HNSCC analysiert.

Die TLR3 induzierte Apoptose in Mammakarzinomen widerspricht den bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur TLR3 abhängigen Proliferation. Aus diesem Grund sollte als weiteres Thema dieser Arbeit die TLR3 Regulation des Zellwachstums in HNSCC analysiert werden. Der Schwerpunkt wurde auf die Expression und Regulation von Apoptose bezogenen Proteinen gelegt. Es wurden hierfür HNSCC Zelllinien und Mammakarzinom Zelllinien mit PolyI:C als Ligand von TLR3 stimuliert und in die Expression pro-apoptotischer Proteine beider Zelllinien miteinander verglichen. Auch wurde der Zusammenhang zwischen der TLR3 Signaltransduktion und den funktionalen Untersuchungen der p38 MAP Kinase untersucht.

2 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel wird die Funktion der p38 MAP Kinase in HNSCC näher analysiert. Die einzelnen p38 Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert und induzieren eine spezifische Zellantwort durch die selektive Aktivierung ihrer Substrate. So werden die p38α und p38ß Isoformen in allen Geweben exprimiert, wogegen die Isoformen p38γ und p38δ ein eingeschränktes Expressionsprofil besitzen [34]. In dieser Arbeit wurde daher der Schwerpunkt auf die Analyse der p38α Isoform gelegt.

2.1 Charakterisierung der p38 MAP Kinase in Kopf-Hals-Karzinomen

Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase (MAPK) erfolgt durch duale Phosphorylierung des konservierten Phosphorylierungsmotivs am Threonin-180 und Tyrosin-182 durch die übergeordneten MAP-Kinasen MKK3 und MKK6 [53]. Im Folgenden wurden die Proteine von jeweils fünf verschiedenen HNSCC Zelllinien und soliden Tumoren auf ihre p38α Expression und Aktivität (P-p38α) durch Western Hybridisierung untersucht, von denen einige in Abbildung 3 beispielhaft dargestellt sind.

Die HNSCC Tumore zeigten eine deutliche Aktivierung der p38α MAP Kinase, im Gegensatz zu den untersuchten HNSCC Zelllinien. Verschiedene Stress-Stimuli in der direkten Tumorumgebung, z.B. durch Entzündungsreaktionen tumorinfiltrierender Lymphozyten, verursachen möglicherweise die konstitutive Aktivität der p38 MAP Kinase in den Tumoren.

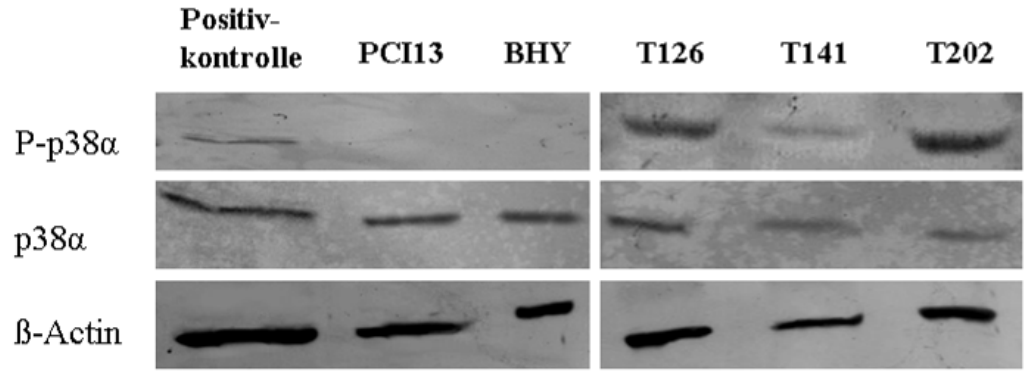


Abbildung 3: Expressionsprofil der p38α MAP-Kinase bei verschiedenen HNSCC Zelllinien und Proteinen aus soliden Tumoren
Die Expression von der nicht aktivierten MAPK p38α und aktivierten MAPK P-p38α wurde von jeweils fünf verschiedenen HNSCC Zelllinien (dargestellt: PCI13 und BHY) und Proteinen aus soliden HNSCC Tumoren untersucht (dargestellt: T126: maligner Lymphknoten; T141: Larynxkarzinom; T202: Tonsillentumor). In HNSCC Tumoren ist im Gegensatz zu den Zelllinien P-p38α konstitutiv exprimiert, da hier möglicherweise verschiedene Stimuli aus der Tumorumgebung eine Rolle spielen.

Um einen Überblick über die Expression von MAP Kinasen in HNSCC zu erhalten, wurde ein Phospho-MAPK Proteinarray (RNDSYSTEMS) durchgeführt, um die Expression bzw. den Aktivierungsstatus verschiedener MAP Kinasen und an MAPK Signalwegen beteiligten Proteinen zu untersuchen. Hierfür erfolgte die Stimulation der HNSCC Zelllinie PCI1 mit 200ng/ml PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) für 15 min mit der anschließenden Präparation der Zelllysate. Die gewonnenen Proteine wurden mit jeweils einer Membran des Phospho-MAPK Proteinarrays über Nacht inkubiert, so dass die an der Nitrozellulosemembran gespotteten Antikörper die spezifischen Proteine im Zelllysat binden konnten. Nach der Inkubation mit einem Sekundärantikörper und einer darauf folgenden Alkalischen-Phosphatase-Reaktion wurden die gebundenen Proteine in Abhängigkeit zu ihrem Expressions- bzw. Phosphorylierungslevel als dunkle Felder auf der Membran sichtbar. Als Kontrollen dienten Positivkontrollen sowie eine Negativkontrolle auf den Membranen. Die Auswertung der Arrays erfolgte mit der QuantityOne Software von BIORAD. Hierbei wurde die Pixelintensität jedes dunklen Feldes als Differenz vom Hintergrund der Nitrozellulosemembran berechnet. Dieser Wert entsprach der Expression des jeweiligen Proteins.

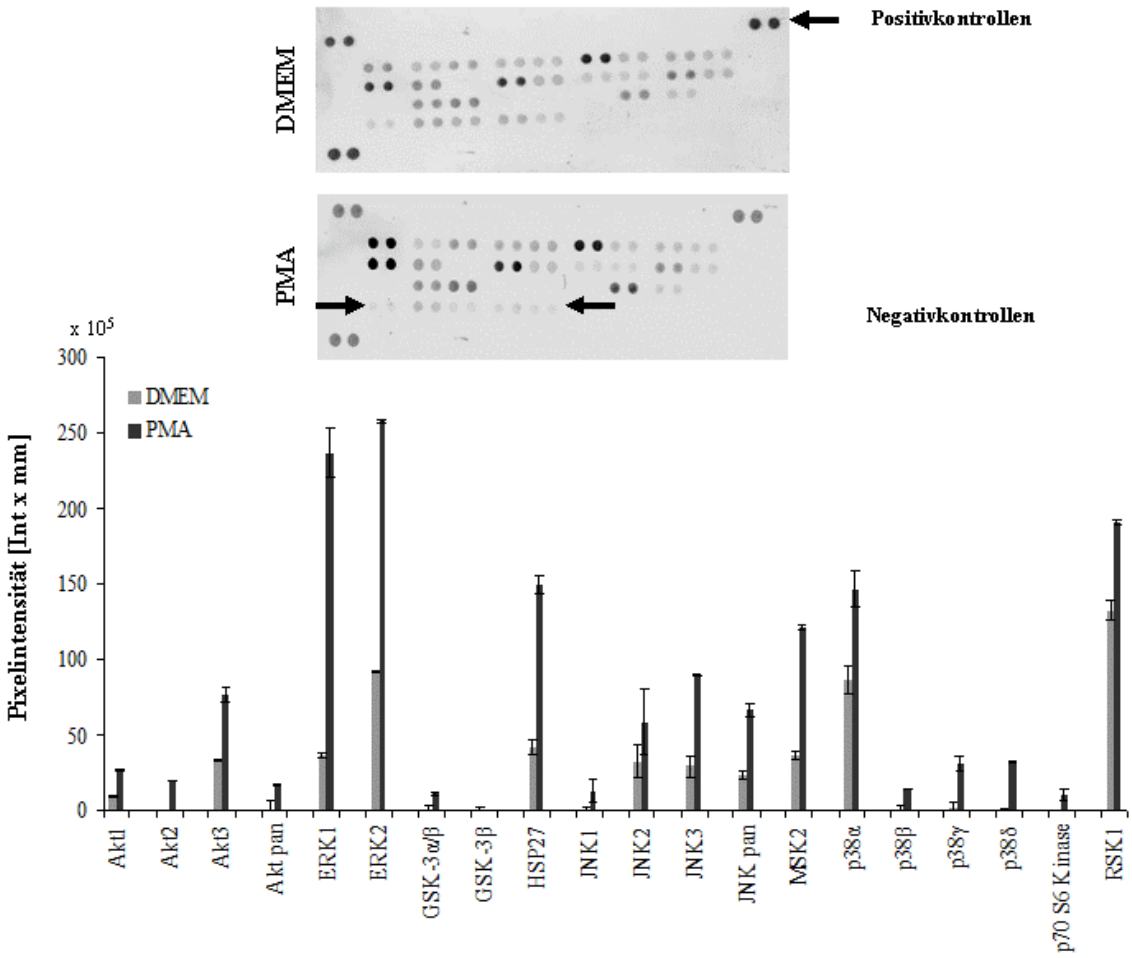


Abbildung 4: Expressions- und Aktivierungslevel verschiedener MAP-Kinasen nach PMA- Stimulation
Die HNSCC Zelllinie PCI1 wurde 15 min mit 200ng/ml PMA stimuliert. Die Zelllysate wurden mit jeweils einer Nitrozellulosemembran des Proteom Profiler Phospho-MAPK Arrays inkubiert. Die Auswertung des Protein Arrays erfolgte durch die Analyse der Pixelintensität als Differenz vom Membranhintergrund. Die Pixelintensität war abhängig von der Menge an gebundenen (Phospho)-Proteinen und ist im Diagramm im Vergleich zur Medium-Kontrolle (DMEM) dargestellt. Es zeigt, dass neben Kinasen wie Akt1-3, MSK2 und RSK1 sowie HSP27, vor allem ERK1 und ERK2, JNK1-3 und die p38 Isoformen als die wichtigsten Proteine verschiedener MAPK-Signalwege durch PMA aktiviert werden. Dargestellt ist der Durchschnitt der Pixelintensitäten von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Positiv- und Negativkontrollen sind mit Pfeilen gekennzeichnet und befinden sich entsprechend auf jeder Membran.

Die Stimulation mit PMA hatte einen sehr starken Effekt auf die Expression und Phosphorylierung der untersuchten Proteine (Abbildung 4). Vor allem die MAP Kinasen ERK1 und ERK2, JNK1-3 und die p38 MAPK Isoformen wurden deutlich

aktiviert, was auch zu der Phosphorylierung von MSK2 und RSK1, den "downstream" Kinasen von p38 und ERK1/2 [54], führte. Auch die Expression von Phospho-Akt 1-3, eine Stress-aktivierte MAPK mit Einfluss auf Proliferation und Zellwachstum [55], und die Expression des Hitzeschockproteins 27 (HSP27) wurde durch PMA verstärkt.
Da die PMA-Induktion einen besonders starken Effekt auf die ERK1 und ERK2 MAP Kinasen hatte, wurde der Aktivierungsstatus bei den zuvor erwähnten HNSCC Zelllinien und Tumoren untersucht (Abbildung 5). Im Gegensatz zur p38 MAP Kinase ist die Expression der phosphorylierten und somit aktivierten ERK1/2 MAP Kinase sowohl in den HNSCC Zelllinien als auch in den Tumoren exprimiert.

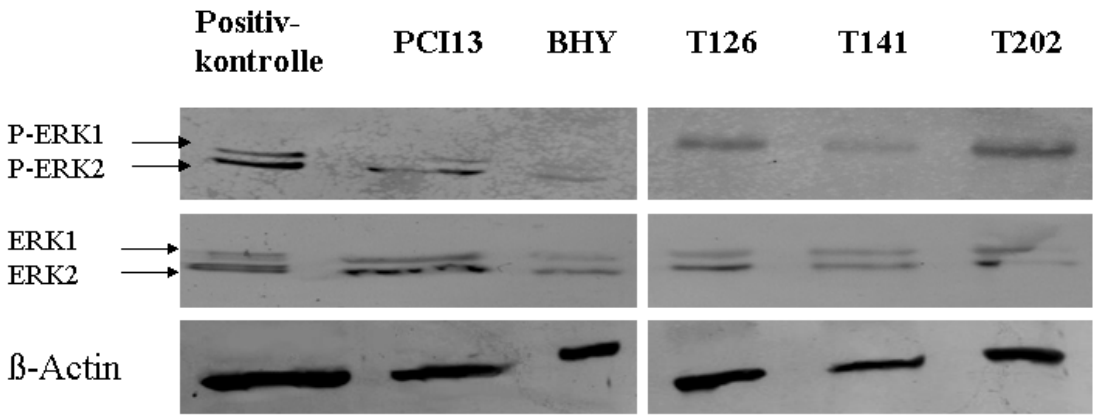


Abbildung 5: Expressionsprofil der ERK1/2 MAP-Kinase bei verschiedenen HNSCC Zelllinien und Proteinen aus soliden Tumoren
Die MAPKs ERK1 und ERK2 waren sowohl bei den HNSCC Zelllinien als auch in Tumoren konstitutiv aktiviert (P-ERK1/2). Der Nachweis erfolgte mit einem Primärantikörper gegen beide ERK Isoformen und ergab die entsprechenden Proteinbanden bei den HNSCC Zelllinien. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um eine mit 200ng/ml PMA stimulierte HNSCC Zelllinie.

Da die p38 MAP Kinase in vielen Tumorentitäten eine supprimierende Funktion besitzt [32], wurde ein Wachstumstest unter p38 inhibierenden und aktivierenden Bedingungen durchgeführt, um den Einfluss der p38 MAP Kinase auf die Proliferation von HNSCC Zelllinien zu untersuchen. Die Abbildung 6A zeigt das Wachstum der Zelllinie PCI1 über einen Zeitraum von 72h unter Zugabe von 200ng/ml PMA und 10µM SB203580, der Koinkubation mit PMA und SB203580 sowie das Wachstum nur in Medium (DMEM) als Kontrolle. In 24h Abständen wurde das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-

dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid), das von mitochondrialen Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems zu einem violetten, wasserunlöslichem Formazanderivat reduziert wird, zu den Zellen gegeben und die Dehydrogenase-Reaktion nach 1h mit einer Isopropanol-haltigen Lösung abgestoppt. Da diese Enzyme nur in vitalen Zellen aktiv sind, kann man durch diesen Test Rückschlüsse auf die Zellvitalität und Proliferation ziehen, da mit ansteigender Zellzahl die optische Dichte des Formazans proportional zunimmt [56, 57]. Die Menge des gebildeten Formazans wird bei einer Wellenlänge von 550-600nm photometrisch bestimmt, bei der das Substrat MTT nicht absorbiert. Das Pyridinyl-Imidazol SB203580 (2,4,5-Triaryl-Imidazol) ist ein Inhibitor der p38α Isoform, der durch kompetitive Hemmung der ATP-Bindedomaine die Aktivität der p38 MAPK inhibiert [21].

Es zeigte sich, dass eine PMA inhibierte Proliferation nicht durch die gleichzeitige Inkubation mit SB203580 aufgehoben werden konnte (Abbildung 6 A). Die Inhibierung der p38 MAPK durch SB203580 ohne zusätzlichen Stimulus hatte keinen Einfluss auf die Proliferation und hatte einen ähnlichen Verlauf wie die Wachstumskurve der Mediumkontrolle (DMEM).

Um eine toxische Wirkung von PMA auf die Zellen auszuschließen, wurde mit Hilfe einer Annexin V-FITC- und Propidiumjodid (PI)-Färbung im Durchflusszytometer (FACS) die Anzahl apoptotischer bzw. toter Zellen bestimmt. Ein frühes apoptotisches Merkmal ist die Translokation von Phosphatidylserin von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Plasmamembran. Hier ist es für Annexin V zugänglich, das dieses Phospholipid mit hoher Affinität bindet und somit apoptotische Zellen nachweisbar macht [58, 59]. Propidiumjodid durchdringt bei toten oder nekrotischen Zellen die Plasmamembran und wird intrazellulär nachgewiesen. Die Zahl toter oder apoptotischer Zellen entsprach auch nach einer 72stündigen Inkubation mit 200ng/ml PMA in etwa den Werten der unstimulierten Zellen vom gleichen Zeitraum (Abbildung 6 B).

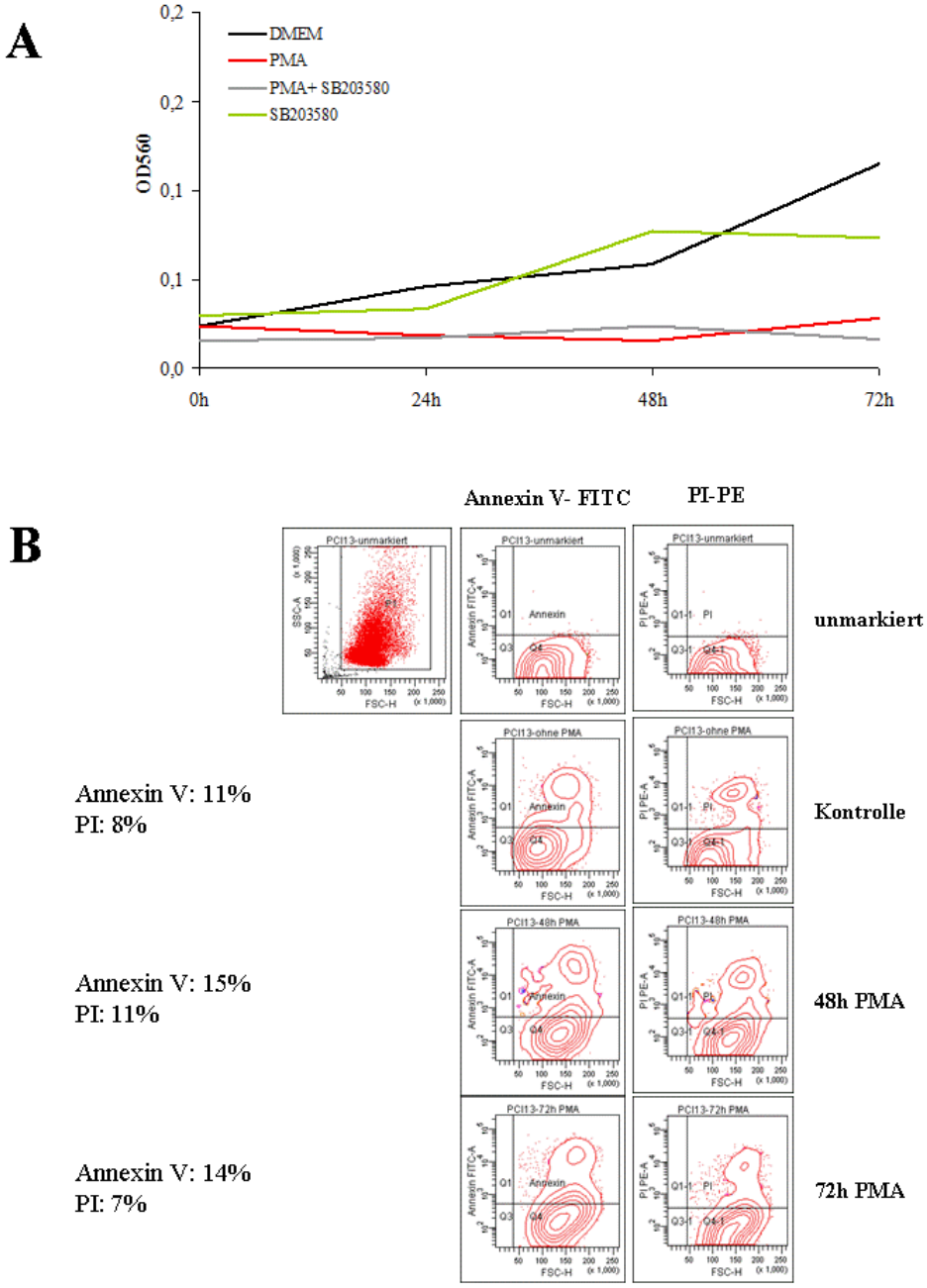


Abbildung 6: PMA inhibiert die Proliferation von HNSCC Zelllinien
A: Dargestellt ist ein repräsentativer Proliferations-Assay der Zelllinie PCI1. 2500 Zellen pro Well wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und nach 24h mit 200ng/ml PMA (rote Linie) und/oder 10µM SB203580 (grüne Linie) inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (DMEM). Das Zellwachstum wurde über den Zeitraum von 72h in 24h Abständen mittels MTT Assay bestimmt. **B:** Die Zelllinie PCI1 wurde über einen Zeitraum von 72h mit 200ng/ml PMA inkubiert und die Zahl apoptotischer und toter Zellen mittels Annexin V-FITC und PI (Propidiumjodid)-PE Färbung im FACS bestimmt. Im Vergleich zur Kontrolle (72h DMEM ohne PMA) war der prozentuale Anteil apoptotischer und toter Zellen nach 72-stündiger PMA-Inkubation etwa gleich.

Eine nähere Untersuchung der MAP-Kinasen p38α und ERK1/2 erfolgte mittels Western Hybridisierung nach der Inkubation mit dem MEK Inhibitor U0126 und SB203580 mit und ohne Zugabe von PMA bei den Zelllinien PCI1 und PCI13. Die Zelllinien wurden 20 min mit jeweils 10µM SB203580 bzw. U0126 vorinkubiert und anschließend mit 200ng/ml PMA für weitere 15 min stimuliert. Bei U0126 handelt es sich um einen allosterischen Inhibitor der MAPK Kinase MEK1, einer "upstream"-Kinase von ERK1/2, deren Aktivität nach Bindung von U0126 supprimiert wird und die somit auch ERK1/2 nicht phosphorylieren kann [60].

Es zeigte sich, dass die PMA induzierte Aktivierung von p38α und ERK1/2 nicht durch die vorherige Inkubation mit den Inhibitoren supprimiert werden konnte (Abbildung 7**)**. Da der ATP kompetitive Pyridinyl-Imidazol Inhibitor SB203580 auch beim inaktiven Enzym spezifisch an die ATP Bindedomaine der p38 MAPK bindet, wird nur die Enzymaktivität von p38 inhibiert, ohne jedoch die Phosphorylierung durch die übergeordneten MAP Kinasen zu beeinflussen [61, 62]

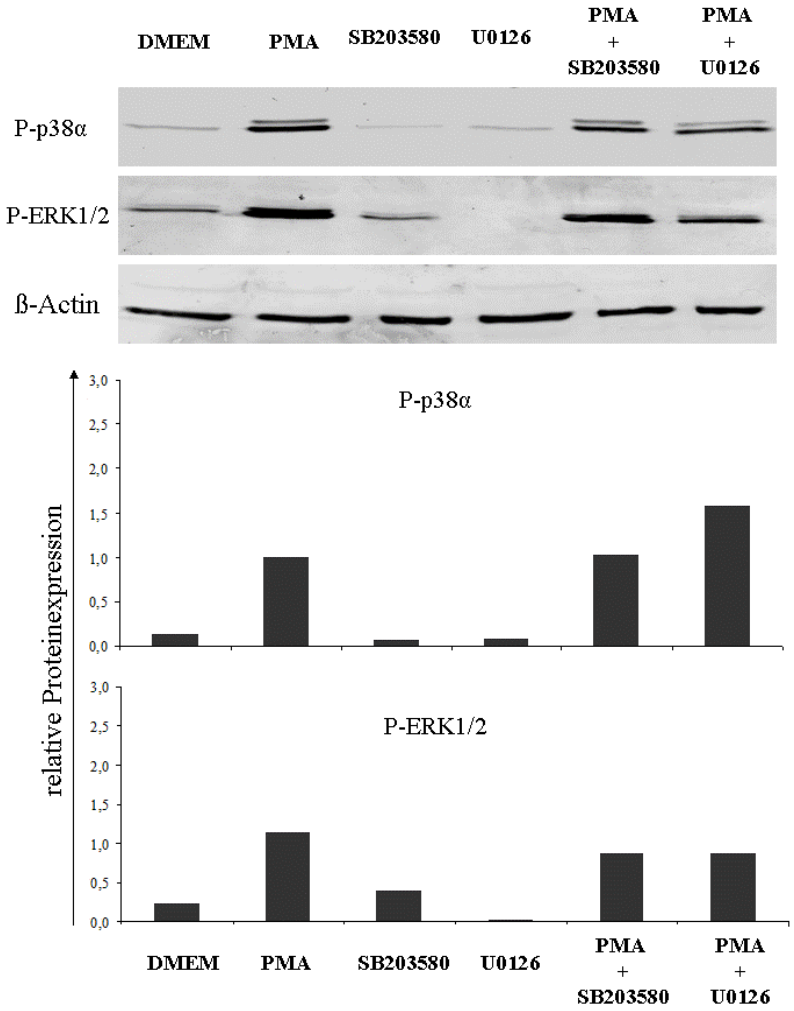


Abbildung 7: PMA aktiviert die MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 trotz der Inkubation mit den Inhibitoren SB203580 bzw. U0126
Dargestellt ist beispielhaft eine Western Hybridisierung der Zelllinie PCI1. Die Zelllinien wurden mit den Inhibitoren U0126 oder SB203580 (jeweils 10µM) für 20 min inkubiert und entsprechend der Angaben mit 200ng/ml PMA für 15 min stimuliert. Die relative Proteinexpression wurde durch den Abgleich mit der Ladekontrolle ß-Actin berechnet und ist in den Diagrammen dargestellt. Hierfür wurde die Pixelintensität jeder Proteinbande mit ß-Actin ins Verhältnis gesetzt.

Um eine indirekte Aktivierung anderer MAPK Signalwege durch den Inhibitor SB203580 auszuschließen, wurde ein Phospho-MAPK Array nach einer 20-minütigen Inkubation mit 10µM SB203580 bei der Zelllinie PCI1 durchgeführt.

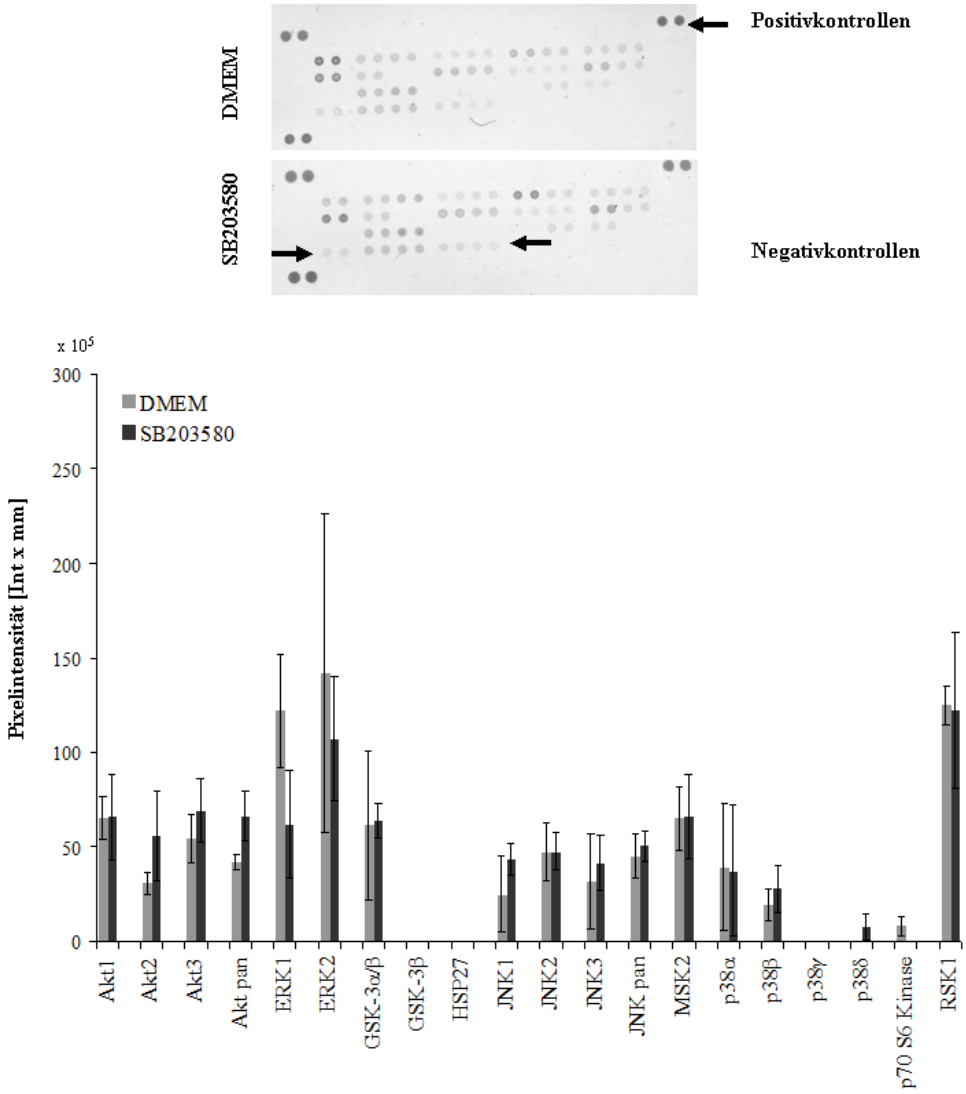


Abbildung 8: SB203580 inhibiert ERK1und ERK2 deutlich
Die HNSCC Zelllinie PCI1 wurde 20min mit 10µM SB203580 oder Medium (DMEM) inkubiert und die Zelllysate mit jeweils einer Nitrozellulosemembran des Proteom Profiler Phospho-MAPK Arrays inkubiert. Die Auswertung des Protein Arrays erfolgte durch die Analyse der Pixelintensität, die abhängig zum gebundenen Protein anstieg (QuantityOne Software; BIORAD). Die Menge an gebundenen Phospho-Proteinen ist in dem Diagramm als Durchschnitt von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Es konnte keine eindeutige Aktivierung von MAPK durch SB203580 festgestellt werden

Eine eindeutige Aussage kann hier nur bei der Inhibierung der MAPKs ERK1 und ERK2 getroffen werden. Die Aktivierung oder Inhibierung anderer MAPK, konnte hier nicht nachgewiesen werden (Abbildung 8). Da vermutet wurde, dass eine Stress-induzierte Signaltransduktionskaskade kurzfristig und in einem kurzen Zeitrahmen ablaufen muss, um schnell eine Zellantwort zu induzieren, wurde eine Zeitreihe von

15min, 30min, 45min, 1h und 24h und 48h für eine PMA-Inkubation durchgeführt (Abbildung 9).

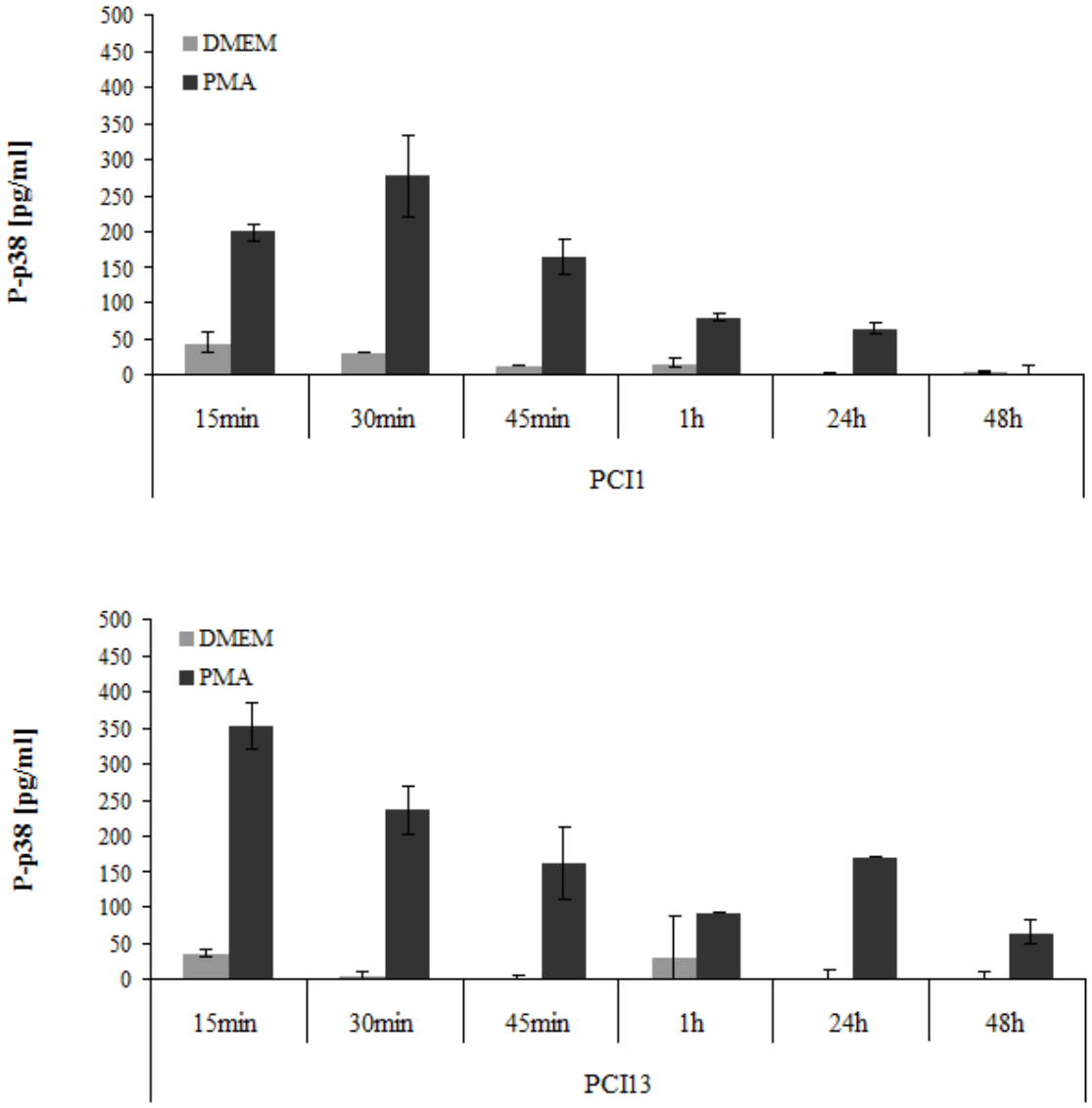


Abbildung 9: Eine PMA induzierte Aktivierung von p38α findet im kurzen Zeitrahmen statt

Die Zelllinien PCI1 und PCI13 wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit PMA stimuliert und als Kontrolle in Medium inkubiert (DMEM). Mit einem ELISA wurde die Proteinkonzentration von phosphorylierter p38α MAPK analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Nach 15 bis 30 Minuten PMA Stimulation war die Menge an aktivierter/phosphorylierter p38 MAPK am höchsten und fiel danach deutlich ab.

Die Analyse des Aktivierungsprofils der p38 MAPK mit Hilfe eines phosphospezifischen p38α ELISAs ergab, dass eine PMA Induktion der p38α Aktivität wie erwartet innerhalb kurzer Zeitabstände stattfindet (Abbildung 9). Hierbei zeigten sich bei den untersuchten Zelllinien PCI1 und PCI13 die größten p38α Aktivitäten nach 15-30 minütiger PMA-Stimulation und diese nahmen in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer wieder ab.

Tumore des Kopf-Hals-Bereiches werden von vielen Lymphozyten infiltriert, so dass die Regulation durch Zytokine seitens des Tumors bei HNSCC eine sehr wichtige Rolle spielt. Voruntersuchungen von PMA-stimulierten HNSCC-Zelllinien ergaben einen deutlichen Anstieg der Zytokine IL-6 und IL-8 im Zellkulturüberstand, wobei auch die Sekretion von IL-10, TNF-α und GM-CSF durch PMA induziert wurde (Daten nicht gezeigt). Da die Zytokine IL-6 und IL-8 an einer Vielzahl onkogener Prozesse wie Angiogenese und Metastasierung bei Kopf-Hals-Karzinomen beteiligt sind [11], wurde im Folgenden die Analyse auf die Zytokine IL-6 und IL-8 in Zellkulturüberständen beschränkt.

Die Menge an Interleukinen in den Zellkulturüberständen der PMA-Zeitreihe wurden mit einer Flex-Set Messung im Durchflusszytometer anhand der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität, die proportional zur Proteinmenge war, bestimmt. Der gewählte Zeitrahmen von einer Stunde nach PMA-Stimulation konnte keinen deutlichen Anstieg der IL-6 und IL-8 Fluoreszenzintensität zeigen. Erst die 24h Messung zeigte, dass die Menge von IL-6 und IL-8 aufgrund der PMA Zugabe sehr stark anstieg. Dieses Ergebnis lässt auf eine zeitabhängige Regulation der Zytokine IL-6 und IL-8 durch die p38 MAPK schließen (Abbildung 10).

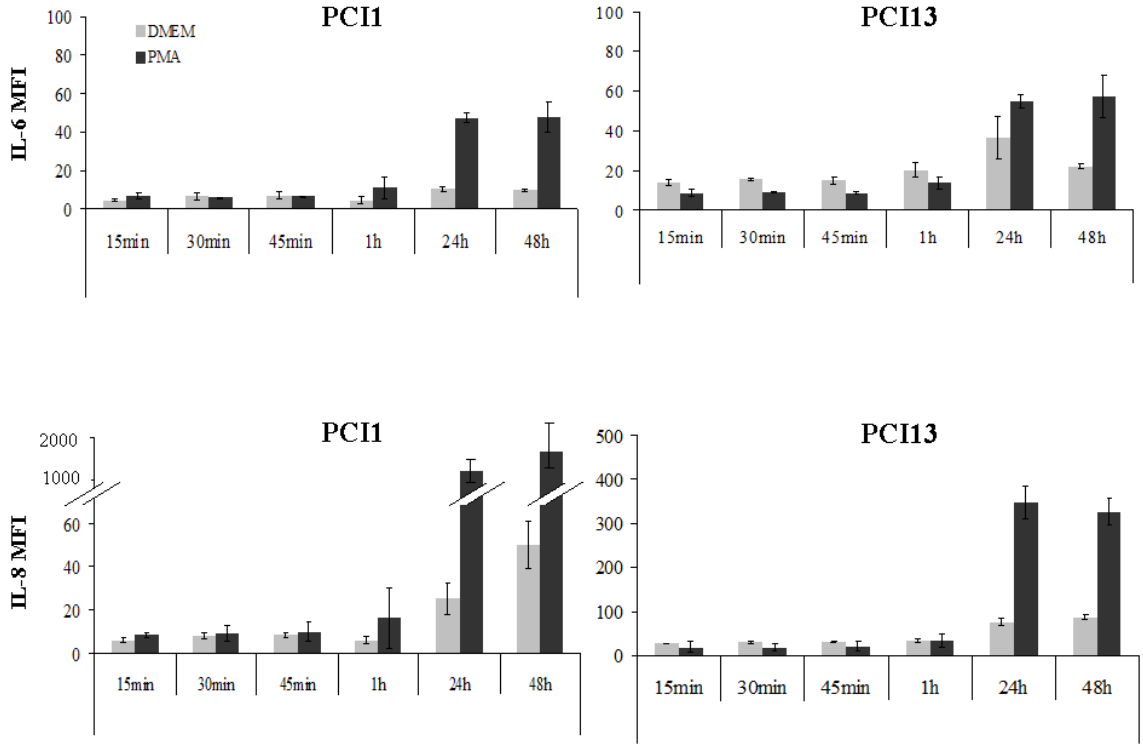


Abbildung 10: Die Induktion der IL-6 und IL-8 Sekretion durch PMA erfolgt zeitversetzt
Die Zellkulturüberstände von PCI1 und PCI13 wurden nach PMA-Stimulation zu den angegebenen Zeitpunkten mittels FlexSet Messung (BDBiosciences) untersucht. Die ermittelte Fluoreszenzintensität war proportional zur Interleukinkonzentration in den Zellkulturüberständen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Der Effekt der PMA induzierten IL-6 und IL-8 Sekretion bei der 24h Messung am deutlichsten. (MFI: "Mean Fluorescence Intensity").

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Zelllinien PCI1 und PCI13 erneut mit jeweils 10µM SB20358 und U0126 20min vorinkubiert und anschließend 24h mit PMA stimuliert, da nach diesem Zeitpunkt die höchste messbare Zytokinmenge zu erwarten war. Die Analyse der Zellkulturüberstände erfolgte mittels Flex-Set Messung. In der Abbildung 11 sind beispielhaft die Ergebnisse der Zelllinie PCI1 dargestellt. Im Vergleich zur Mediumkontrolle stieg bei der Inkubation mit SB203580 Menge an IL-6 und IL-8 nicht an, wogegen eine Inhibierung der ERK1/2 MAPK die IL-6 Sekretion leicht verstärkte und auf die IL-8 Menge keinen Effekt hatte. Interessanterweise induzierte die Koinkubation von U0126 mit PMA die Sekretion beider Zytokine deutlich im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dieser Effekt war bei der Koinkubation von SB203580 und PMA nicht zu erkennen. Hier entsprach die ermittelte

Fluoreszenzintensität von IL-6 der Fluoreszenzintensität der Mediumkontrolle, bei IL-8 konnte ein leichter Anstieg der Fluoreszenzintensität verzeichnet werden, der allerdings deutlich niedriger als bei der PMA Stimulation war.

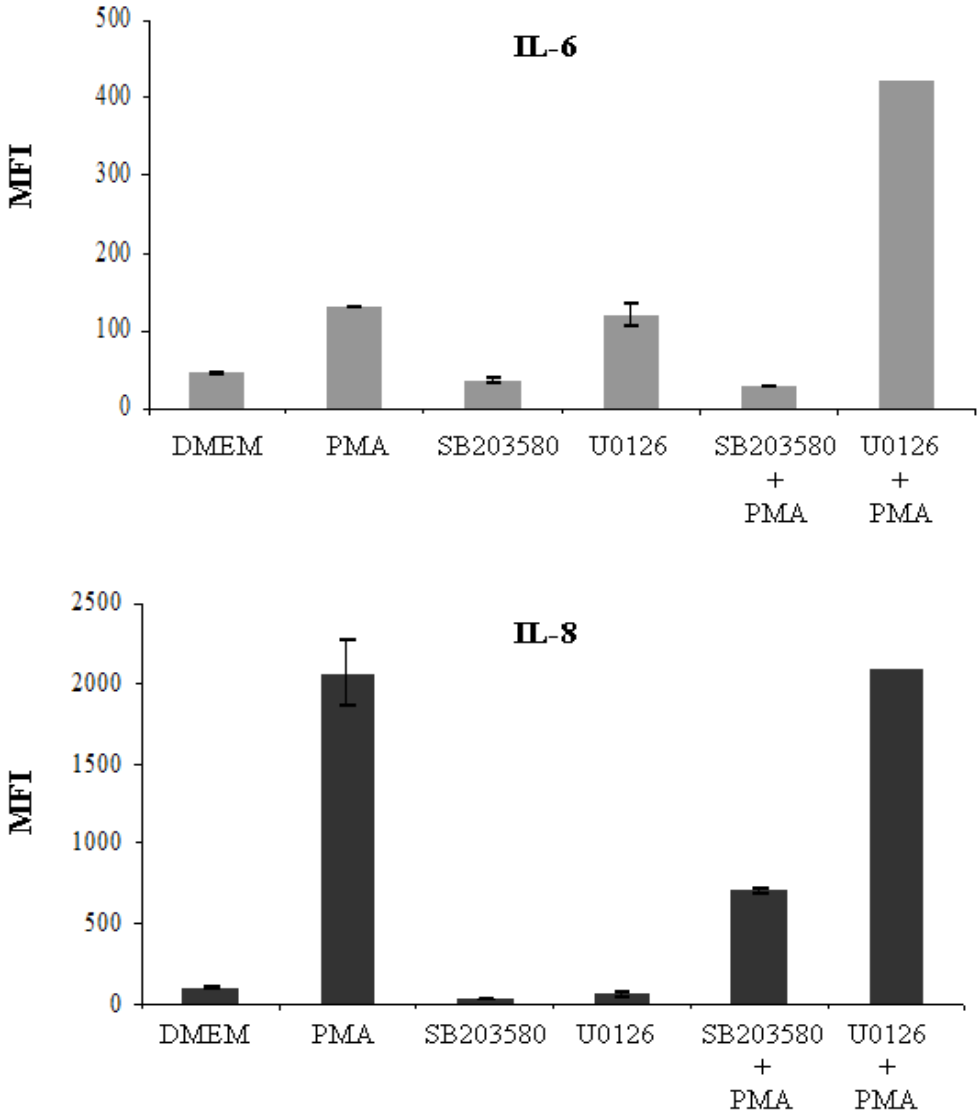


Abbildung 11: Inhibierung und Induktion der IL-6 und IL-8 Sekretion in HNSCC
Die Inkubation der Zelllinien PCI1 und PCI13 mit jeweils 10µM SB203580 und U0126 bzw. mit 200ng/ml PMA erfolgte für 20 min bzw. 15 min. Die Menge an IL-6 und IL-8 in den Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe der Flex-Set Messung bestimmt. Die ermittelte Fluoreszenzintensität war proportional zur Interleukinkonzentration in den Zellkulturüberständen. (MFI: "Mean Fluorescent Itensity"). Dargestellt ist beispielhaft die Flex-Set Messung der Zelllinie PCI1 aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Dieses Ergebnis gibt Hinweise darauf, dass die p38 MAPK in ihrer Enzymaktivität inhibiert wurde. Somit konnte die p38 MAPK ihre Substrate wie beispielsweise die Kinasen MK2 und MK3 nicht aktivieren, so dass die Regulation der Zytokine IL-6 und IL-8 in HNSCC zwar nicht ausschließlich über die p38 MAPK erfolgt, diese Kinase aber eine entscheidende Rolle spielt

Mit einer spezifischen siRNA wurde die p38 Proteinexpression herunterreguliert, um weitere funktionale Untersuchungen in Bezug auf die Regulation von IL-6 und IL-8 durchzuführen. Hierfür wurden die HNSCC Zelllinien PCI1 und PCI13 mit 25nM p38 spezifischer siRNA transfiziert (siehe auch Kapitel 4.6). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zelllinien mit einem unspezifischen GFP-gekoppelter Oligonukleotid transfiziert (BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo; INVITROGEN) und anschließend die Transfektionseffizienz quantitativ im FITC-Kanal des Durchflusszytometers sowie qualitativ im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. 72h nach der Transfektion lag die Transfektionseffizienz im Durchschnitt bei 80-90%.

Anschließend wurden die Zelllinien mit 200ng/ml PMA für 24h inkubiert, um die PMA-induzierte Interleukinsekretion nach dem "Silencing" der p38 MAPK zu untersuchen. In der Western Hybridisierung zeigte sich eine deutliche Reduktion in der Expression der p38 MAPK, die im Abgleich mit der Ladekontrolle ß-Actin bei 60-80% in Abhängigkeit zur Proteinprobe lag (Abbildung 12).

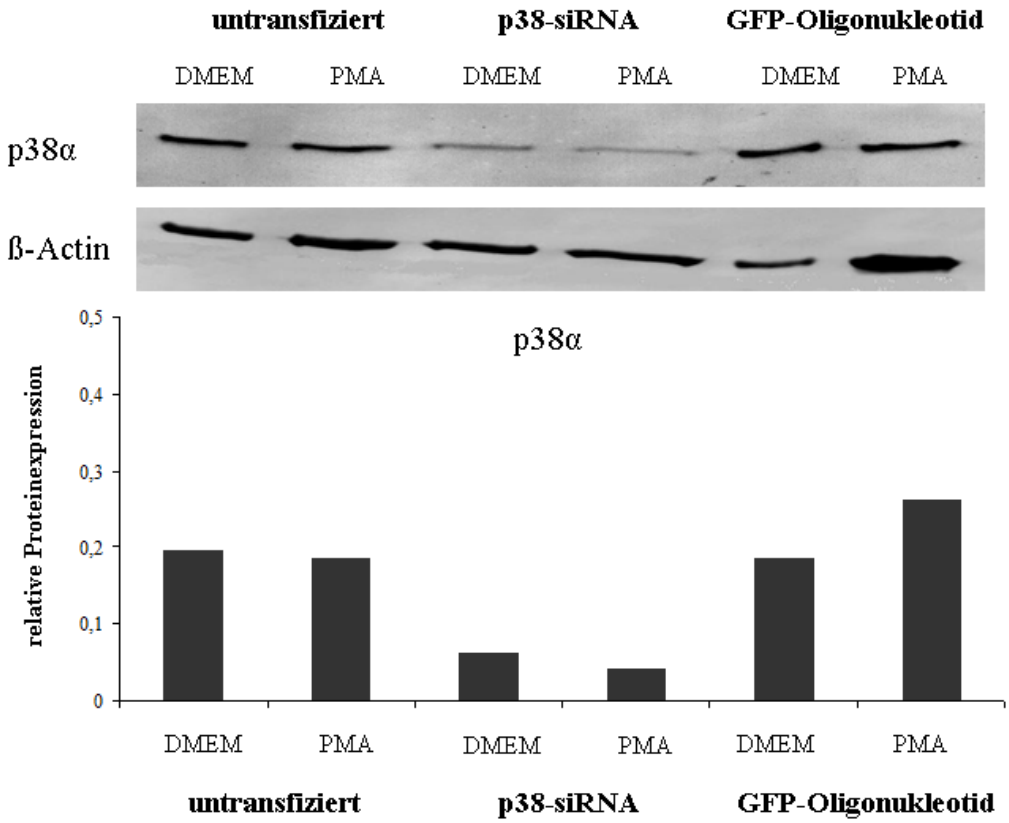


Abbildung 12: Die Proteinexpression von p38α konnte durch siRNA deutlich herunterreguliert werden
Dargestellt ist beispielhaft die Proteinexpression der p38α MAPK nach der Transfektion mit p38 siRNA der Zelllinie PCI1. Die transfizierten Zellen wurden 24h mit 200ng/ml PMA (PMA) oder nur mit Medium (DMEM) inkubiert. Die relative Proteinexpression der p38α MAPK wurde mit der Ladekontrolle ß-Actin abgeglichen und ist deutlich herunterreguliert worden.

Die anschließende Analyse der p38 und ERK1/2 Aktivität ergab wie erwartet keine Proteinexpression bei p38 und eine konstitutive Aktivität der ERK1/2 MAPK nach dem p38 "Silencing" (Abbildung 13 A). Die Analyse der Zellkulturüberstände ergab, dass durch die Herunterregulation des p38 Proteins die IL-6 und IL-8 Konzentration der Menge der Mediumkontrolle entsprach (Abbildung 13 B). Nach der PMA-Stimulation war die Zytokinkonzentration bei den p38 herunterregulierten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben deutlich geringer, entsprach aber nicht der Zytokinkonzentration unstimulierter Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass entweder die restliche Menge an p38 Protein für den Anstieg der Zytokinkonzentration verantwortlich ist, oder dass eine andere MAPK, vermutlich die ERK1/2 MAPK, an der Regulation der Zytokine IL-6 und IL-8 bei HNSCC beteiligt ist.

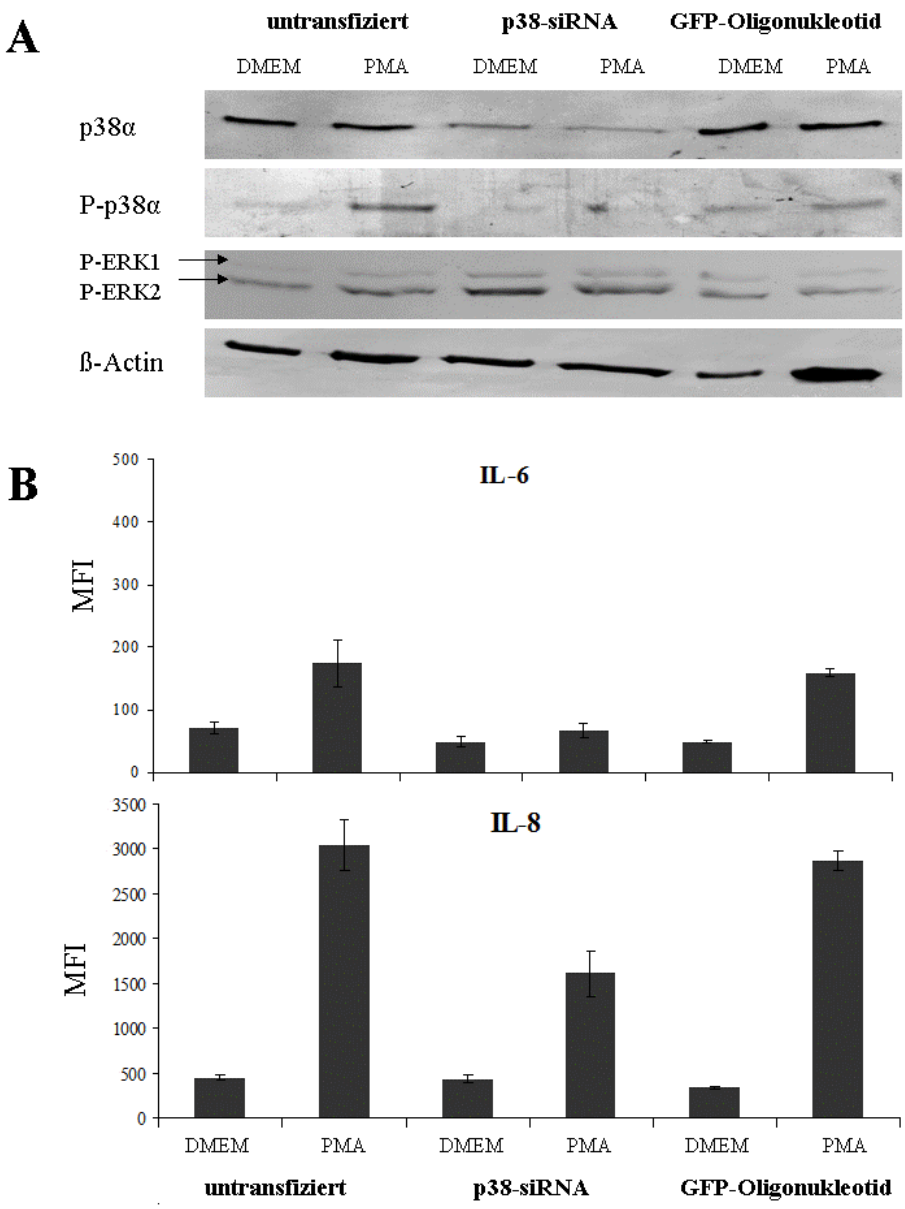


Abbildung 13: Eine Herunterregulation des p38 Proteins hat nur einen geringen Einfluss auf die PMA induzierte IL-6 und IL-8 Sekretion
A:. Die Zelllinien PCI1 und PCI13 wurden 72h nach der Transfektion mit 25nM p38-siRNA für 24h mit 200ng/ml PMA oder in Medium (DMEM) inkubiert. Die Proteinexpression von P-p38 wurde bei p38-siRNA transfizierten und nicht transfizierten sowie Kontrollzellen (GFP-Oligonukleotid) bestimmt und wurde wie erwartet nicht durch PMA verstärkt. Die ERK1/2 MAPK war konstitutiv aktiv (P-ERK1 und P-ERK2) **B:** Die Zytokine IL-6 und IL-8 der Zellkulturüberstände wurde mit der Flex-Set Messung im Durchflusszytometer bestimmt. Die ermittelte Fluoreszenzintensität war proportional zur Interleukinkonzentration in den Zellkulturüberständen. Es sind beispielhaft die Ergebnisse der Zelllinie PCI13 als Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. (MFI: "Mean Fluorescent Intensity", GFP: "Green Fluorescent Protein")

In HNSCC ist STAT3 überexprimiert und an der Regulation von Zellzyklus, Apoptose und Proliferation beteiligt [63]. Viele Studien konnten eine p38 abhängige Aktivierung von STAT3 zeigen, wie beispielsweise bei der Hepatom Zelllinie HepG2 nach einer IL-6 Stimulation [64]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob in HNSCC STAT3 ebenfalls durch die p38 MAP Kinase reguliert bzw. aktiviert wird. STAT3 wird zum einen an der Tyrosin 705 Untereinheit phosphoryliert, was vermutlich für die Bildung des STAT3-Dimers von großer Bedeutung ist, während die Phosphorylierung an der Serin 727 Untereinheit, die zumeist von MAPK induziert wird, nach der Translokation in den Nukleus vermutlich die Transkriptionsaktivität verstärkt [65].
Die Western Hybridisierung der Abbildung 14 zeigt, dass nach der Inhibierung von p38 durch siRNA die Expression von Phospho-STAT3 an der Tyrosin 705 Untereinheit deutlich reduziert wurde. Die Phosphorylierung am Serin 727 war hingegen nicht von der p38 Inhibierung beeinflusst, wurde aber durch PMA verstärkt. Die Menge an unsphosporyliertem STAT3 Protein blieb unverändert.

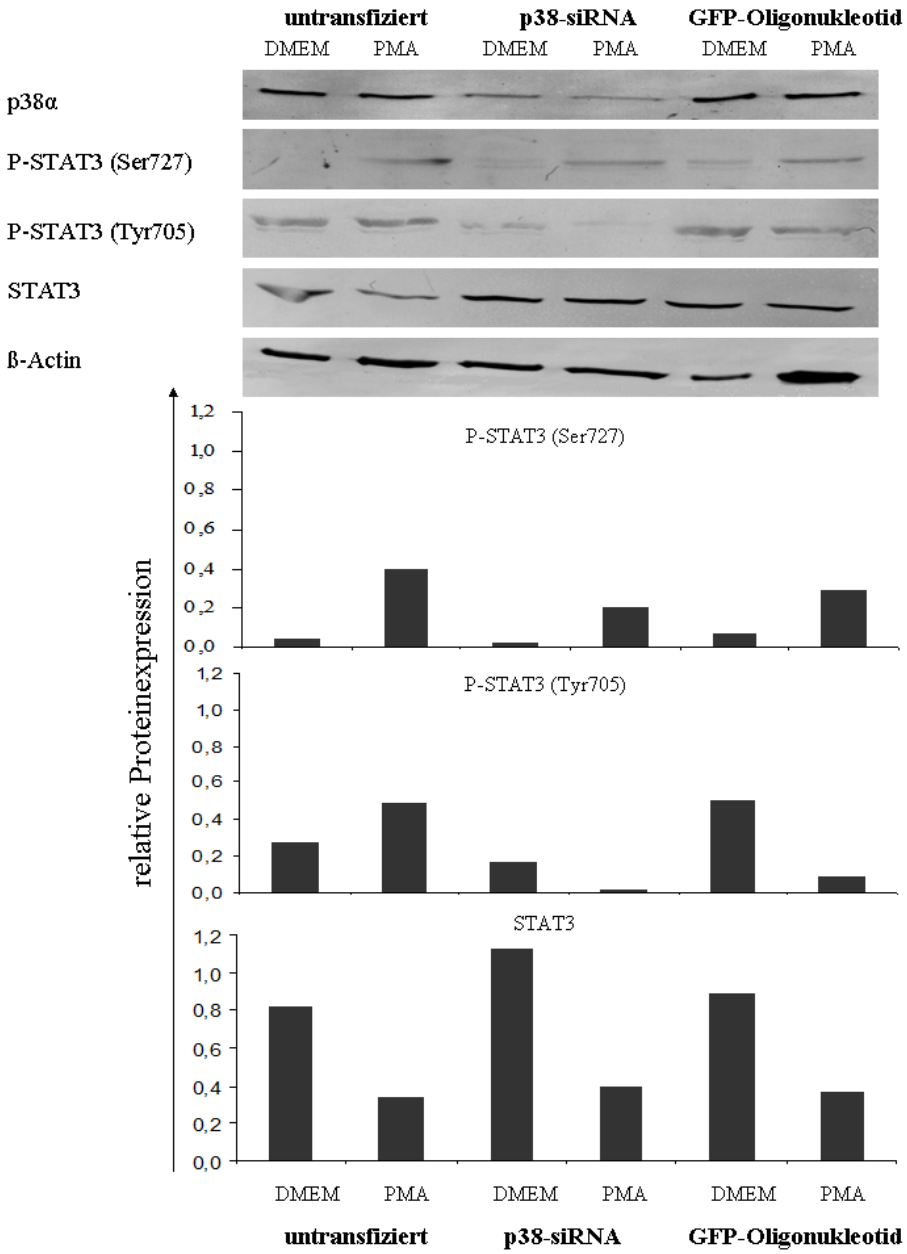


Abbildung 14: Die p38 MAP Kinase reguliert die STAT3 Phosphorylierung am Tyrosin 705 in HNSCC
Die Zelllinie PCI1 wurde nach der Transfektion mit p38-siRNA 15min mit 200ng/ml PMA inkubiert. Die Expression von Phospho-STAT3 (Tyrosin705) wurde durch die Inhibierung der p38 MAP Kinase stark verringert. Die Phosphorylierung am Serin 727 wurde durch PMA verstärkt.

Das 53kDa große, nukleäre Phosphoprotein p53 reguliert den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung, Apoptose und die DNA Reparatur und gilt als Tumorsuppressor. Die tumorsupprimierende Eigenschaft der p38 MAP Kinase, basiert vor allem auf der

positiven Regulation von p53 [32]. Allerdings ist in den meisten malignen Tumoren wie HNSCC das *p53* Gen mutiert, sodass eine Aktivierung von p53 nicht zwangsläufig tumorsupprimierend sein muss [66]. In der folgenden Western Hybridisierung wurde die Expression von p53 und die Phosphorylierungen von Serinuntereinheiten bei p53 nach p38 "Silencing" und PMA-Stimulation untersucht, um Hinweise auf die Funktion von p38 als möglicher Tumorsuppressor in HNSCC zu erhalten (Abbildung 15).

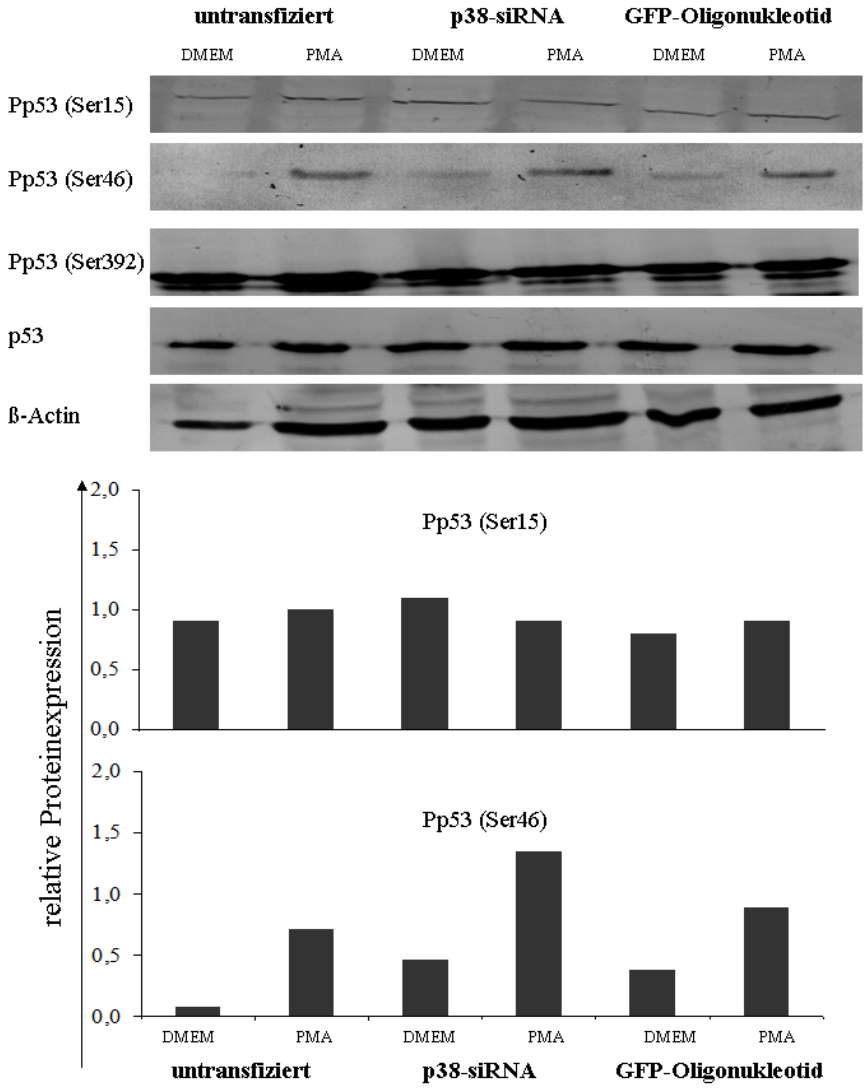


Abbildung 15: Die p53 Aktivierung wird nicht durch die p38 MAP Kinase induziert
Die Zelllinie PCI1 wurde nach der Transfektion mit spezifischer p38-siRNA 15min mit 200ng/ml PMA inkubiert. Die Aktivität von p53 unterliegt nicht einer Regulation der p38 MAPK. Die Phosphorylierung am Serin 46 wird nach PMA Zugabe deutlich erhöht, währen die Serin 15 und Serin 392 konstitutiv phosphoryliert waren.

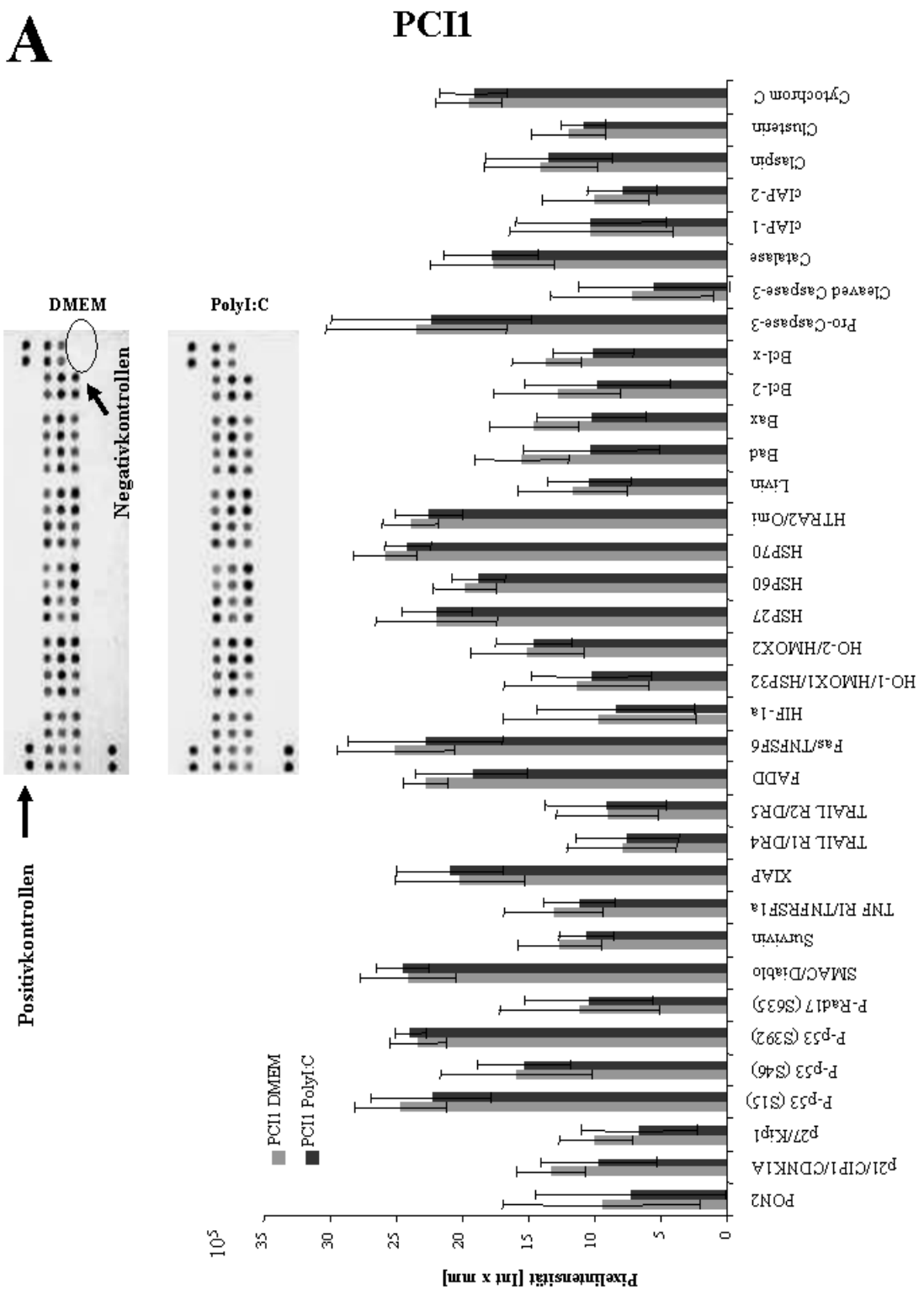
Es wird vermutet, dass Phosphorylierungen an spezifischen Serin Untereinheiten nicht nur die Stabilität des p53 Proteins fördern, sondern auch die spezifische Funktion von p53 modulieren [67-69]. Deshalb wurde die Phosphorylierung verschiedener Serinuntereinheiten von p53 untersucht. Das Ergebnis in Abbildung 15 konnte eine p38 regulierte p53 Aktivität nicht bestätigen. Die Proteinexpression der untersuchten p53 Serinuntereinheiten wurde durch die Inhibierung der p38 MAPK nicht verringert. In HNSCC ist p53 am Serin 392 und Serin 15 konstitutiv phosphoryliert. Die Phosphorylierung am Serin 46 konnte durch PMA deutlich verstärkt werden.
Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen der p38 MAP Kinase konnten keine tumorsupprimierende Eigenschaft nachweisen. Durch die Regulation der Zytokine IL-6 und IL-8 sowie von STAT3 wird die Tumorigenese von HNSCC unterstützt.
Im folgenden Kapitel sollte die Rolle des Toll-like Rezeptors 3 bei der Tumorprogression und die Funktion von TLR3 als ein möglicher Initiator der ermittelten MAP Kinase Wege untersucht werden.

2.2 PolyI:C induzierte Aktivierung von TLR3 in HNSCC

In Mammakarzinom-Zelllinien wurde postuliert, dass der synthetische Ligand PolyI:C eine TLR3-abhängige Apoptose induziert. Hierbei waren die Mediatoren IRAK-4 und NFκB maßgeblich an diesem Signalweg beteiligt [50]. Eine Studie mit murinen und humanen Krebs-Zelllinien konnte ebenfalls eine PolyI:C induzierte Apoptose nachweisen, allerdings nur bei der gleichzeitigen Verwendung des Proteinase-Inhibitors Cycloheximid [70]. Die bisherigen Untersuchungen in HNSCC zeigten jedoch eine deutliche Inhibierung des Zellwachstums nach TLR3 "Silencing", die mit einer reduzierten c-myc Expression korrelierte [52]. Der Einfluss von TLR3 auf Apoptose- und Proliferationsprozesse dieser beiden Tumorentitäten wurde im Folgenden untersucht. Hierfür wurde zuerst ein Proteom Profiler Apoptose Array (RNDSYSTEMS) durchgeführt. Die HNSCC Zelllinie PCI1 und die Mammakarzinom Zelllinie T47D wurden 72h mit 50µg/ml PolyI:C bzw. mit Medium ohne Stimulus inkubiert. Vorarbeiten hatten ergeben, dass eine PolyI:C Induktion mindestens eine Inkubationsdauer von 24h benötigte, wobei die besten Ergebnisse nach einer

72stündigen Inkubation erzielt wurden.

In Abbildung 16 ist eine Übersicht der Expression von Zellzyklus- und Apoptose regulierenden Proteinen der beiden Zelllinien PCI1 und T47D nach PolyI:C Zugabe dargestellt. Die PolyI:C Inkubation führte bei beiden Zelllinien nicht zu einer Apoptose, denn entweder wurde die Proteinexpression reduziert oder entsprach Menge der Mediumkontrolle.


A
PCI1
DMEM
PolyI:C
Negativkontrollen
Positivkontrollen
PCI1 DMEM
PCI1 PolyI:C
Pixelintensität [Int x mm]
10^5
0
5
10
15
20
25
30
35
PON2
p21/CIP1/CDNK1A
p27/Kip1
P-p53 (S15)
P-p53 (S46)
P-p53 (S392)
P-Rad17 (S635)
SMAC/Diablo
Survivin
TNF RI/TNFRSF1a
XIAP
TRAIL R1/DR4
TRAIL R2/DR5
FADD
Fas/TNFSF6
HIF-1a
HO-1/HMOX1/HSP32
HO-2/HMOX2
HSP27
HSP60
HSP70
HTRA2/Omi
Livin
Bad
Bax
Bcl-2
Bcl-x
Pro-Caspase-3
Cleaved Caspase-3
Catalase
cIAP-1
cIAP-2
Claspin
Clusterin
Cytochrom C

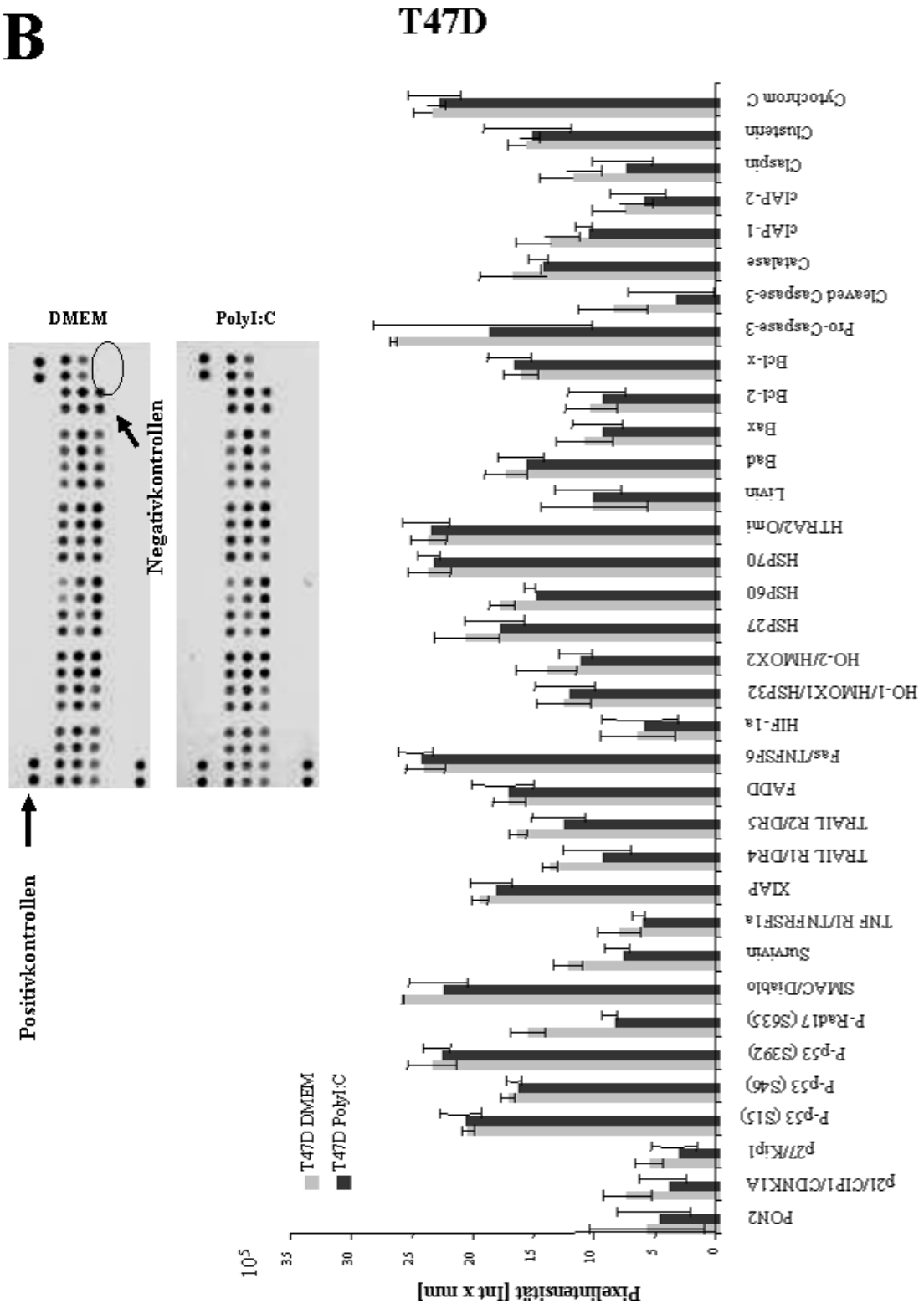

B
T47D
DMEM
PolyI:C
Negativkontrollen
Positivkontrollen
T47D DMEM
T47D PolyI:C
Pixelintensität [Int x mm]
10^5
35
30
25
20
15
10
5
0
PONX2
p21/CIP1/CDNK1A
p27/Kip1
P-p53 (S15)
P-p53 (S46)
P-p53 (S392)
P-Rad17 (S635)
SMAC/Diablo
Survivin
TNF RI/TNFRSF1a
XIAP
TRAIL RI/DR4
TRAIL R2/DR5
FADD
Fas/TNFSF6
HIF-1a
HO-1/HMOX1/HSP32
HO-2/HMOX2
HSP27
HSP60
HSP70
HTRA2/Omi
Livin
Bad
Bax
Bcl-2
Bcl-x
Pro-Caspase-3
Cleaved Caspase-3
Catalase
cIAP-1
cIAP-2
Claspin
Clusterin
Cytochrom C

Abbildung 16: Expressionsanalyse von Zellzyklus- und Apoptose regulierenden Proteinen bei HNSCC und Mammakarzinom
Die HNSCC Zelllinie PCI1 (**A**) und die Mammakarzinom Zelllinie T47D (**B**) wurden mit 50µg/ml PolyI:C oder Zellkulturmedium (DMEM) inkubiert. Nach 72h wurden Zelllysate präpariert und mit jeweils einer Nitrozellulosemembran des Proteom Profiler Array Kits (RnDSystems) inkubiert. Die Positiv- und Negativkontrollen auf den Membranen sind gekennzeichnet. Die Auswertung des Protein Arrays erfolgte durch die Analyse der Pixelintensität mit Hilfe der QuantityOne Software als Differenz vom Membranhintergrund. Die Pixelintensität war abhängig von der Menge an gebundenen Proteinen und ist im Diagramm im Vergleich zur Medium-Kontrolle (DMEM) dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit werden einige Ergebnisse dieses Proteinarrays ausführlicher beschrieben.

Ein Vergleich zwischen PCI1 und T47D zeigte keine Unterschiede in der Expression von Phospho-p53 und den p53 Ziel- Proteinen p21 und p27. Die Inkubation mit PolyI:C hatte auf die Phosphorylierung der Serinuntereinheiten von p53 jeweils keinen bedeutenden Effekt. Bei den Proteinen p21 und p27 handelt es sich um Cyclin abhängige Proteinkinase (CdK) inhibitorische Proteine (CKIs), die die Aktivität der G1/S – und S-Phase CdKs supprimieren und somit regulierend in den Zellzyklus eingreifen. Obwohl ihre Regulation der p53 Aktivität unterliegt, wurde ihre Expression durch PolyI:C stark reduziert. Die Verbindung zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg läuft über die Proteine der Bcl-2-Familie. Die Proteine Bad und Bax besitzen eine pro-apoptotische Funktion. Bad bindet und inaktiviert die pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie, während Bax die Cytochrom C Ausschüttung der Mitochondrien stimuliert. Bcl-xl und Bcl-2 inhibieren die Apoptose durch Blockade der Cytochrom C Ausschüttung und inhibieren Bax und Bad. Die pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie Bad und Bax und die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl werden in HNSCC gleich stark exprimiert. Nach der PolyI:C Inkubation wurde die Expression aller Proteinen so reduziert, dass der ausgeglichene Zustand zwischen den Proteinen wieder hergestellt wurde. Bei der Mammakarzinom Zelllinie T47D scheinen die pro - und anti-apoptotisch wirkenden Proteine jeweils einen Gegenspieler zu besitzen, da die Proteine Bad und Bcl-xl und Bax und Bcl-2 paarweise jeweils gleich stark exprimiert werden. Dieses Gleichgewicht wird nach PolyI:C Zugabe kaum verändert. Die Proteinexpression geht leicht zurück, befindet sich aber bei den Bax und

Bcl-2 auf etwa gleichem Level. Bei Bad und Bcl-xl verändert sich das Verhältnis nach PolyI:C Inkubation zu Ungunsten von Bad mit einer leicht erhöhten Bcl-xl Expression.
Die Caspase-3 sorgt für die Verstärkung der Caspase-8 und Caspase-9 Signale während der Apoptose. Caspasen sind generell als inaktives Proenzym (Pro-Caspase) in der Zelle vorhanden, das durch Proteolyse aktiviert wird ("Cleaved Caspase"). Dies begründet die hohe Proteinkonzentration der Pro-Caspase-3 bei PCI1 und T47D im Vergleich zur Proteinkonzentration der Cleaved-Caspase-3. Auffällig ist der deutliche Rückgang der Capase-3 Expression nach PolyI:C Zugabe bei T47D, während bei PCI1 nur eine sehr leichte Verminderung der Proteinmenge stattfand. Die Proteine cIAP1 und cIAP2 ("Inhibitor of Apoptosis") inhibieren die Apoptose, indem sie die Cytochrom C induzierte Aktivierung der Caspase-9 blockieren und somit die Initiation der gesamten Capase Kaskade behindern. Wie auch die Proteine Clusterin und Cytochrom C wird die Expression von cIAP1 und cIAP2 durch PolyI:C reduziert.
Die "TNF-related apoptosis inducing Ligand" (TRAIL) Rezeptoren TRAIL R1 und TRIAL R2 leiten pro-apoptotische Signale nach Ligandbindung zu NFκB weiter. Die Beteiligung des Adaptermoleküls FADD und der Caspase Kaskade sind bei diesem pro-apoptotischen Signalweg noch ungeklärt. Das Protein FADD ("Fas associated protein with Death Domain"), das durch Assoziation an den Fas Rezeptor und an andere "Death" Rezeptoren, bindet die Caspase-8 an der "Death" Domäne und trägt somit zur Bildung des DISC bei ("Death Inducing Signaling Complex"). Auch bei diesen Proteinen konnte die PolyI:C Inkubation die Expression vermindern. Rad17 als Sensorprotein für DNA-Schädigungen wurde vor allem bei T47D stark in der Expression verringert.
Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Aktivierung des TLR3 Signalweges zu einer verminderten Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen führt und die Vorarbeiten und bisherigen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bezüglich der Mammakarzinom Zelllinien nicht bestätigt werden konnten.
Um herauszufinden, über welche MAP Kinase Wege die TLR3 induzierte Tumorprogression verläuft, wurden die PolyI:C aktivierten MAP Kinasen mittels eines Phospho-MAPK Proteinarray (RNDSYSTEMS) analysiert. Hierfür wurde die Zelllinie PCI1 72h mit 50µg/ml PolyI:C inkubiert und die Zelllysate wie bereits beschrieben mit

der Nitrozellulosemembran des Proteinarrays inkubiert. Die Abbildung 17 zeigt eine Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, JNK1/2, p38α, Akt1 und 3 sowie MSK2 und GSK-3α/ß. PolyI:C stimuliert demnach ähnlich wie PMA ein breites Spektrum von MAP Kinase Kaskaden.

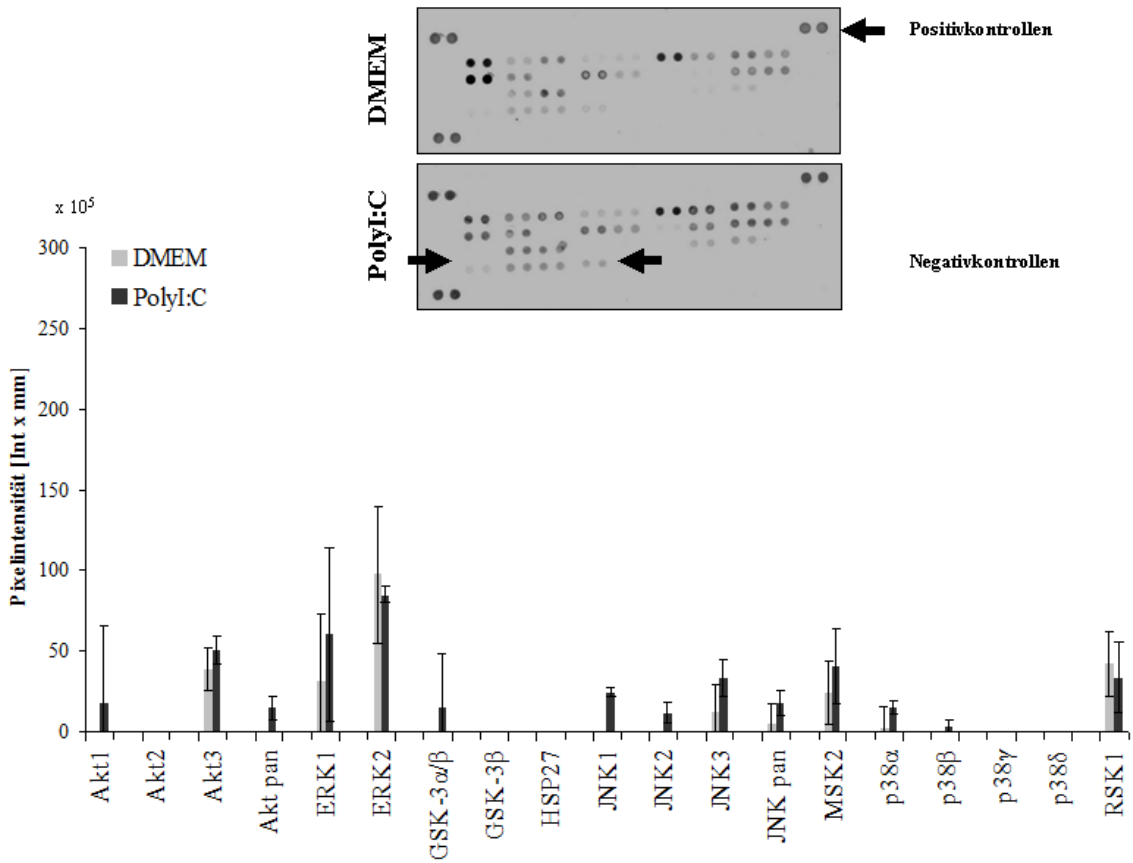


Abbildung 17: PolyI:C induzierte MAPK in HNSCC
Die HNSCC Zelllinie PCI1 wurde 72h mit 50µg/ml PolyI:C oder Medium (DMEM) inkubiert und die Zelllysate mit jeweils einer Nitrozellulosemembran des Proteom Profiler Phospho-MAPK Arrays inkubiert. Die Auswertung des Protein Arrays erfolgte durch die Analyse der Pixelintensität, die abhängig zum gebundenen Protein anstieg mit Hilfe der QuantityOne Software von BIORAD. Die Menge an gebundenen Phospho-Proteinen ist in dem Diagramm als Durchschnitt von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Die Kinasen ERK1/2, JNK1/2, p38 sowie AKT1 und AKT3 und MSK2 und GSK-3α/ß wurden durch PolyI:C aktiviert.

Da wie im vorherigen Kapitel beschrieben ein "cross-talk" zwischen den MAPK ERK1/2 und p38 in HNSCC vermutet wird, wurde die Aktivierung durch PolyI:C nochmals mittels Western Hybridisierung überprüft. Eine deutliche Aktivierung der

ERK1/2 MAPK war hier zu erkennen, wogegen die p38 MAP Kinase nicht durch PolyI:C aktiviert wurde (Abbildung 18). Obwohl im MAPK-Proteinarray ein geringer Anstieg der P-p38 Expression zu erkennen ist, scheint PolyI:C vor allem die ERK1/2 MAP Kinase zu aktivieren.

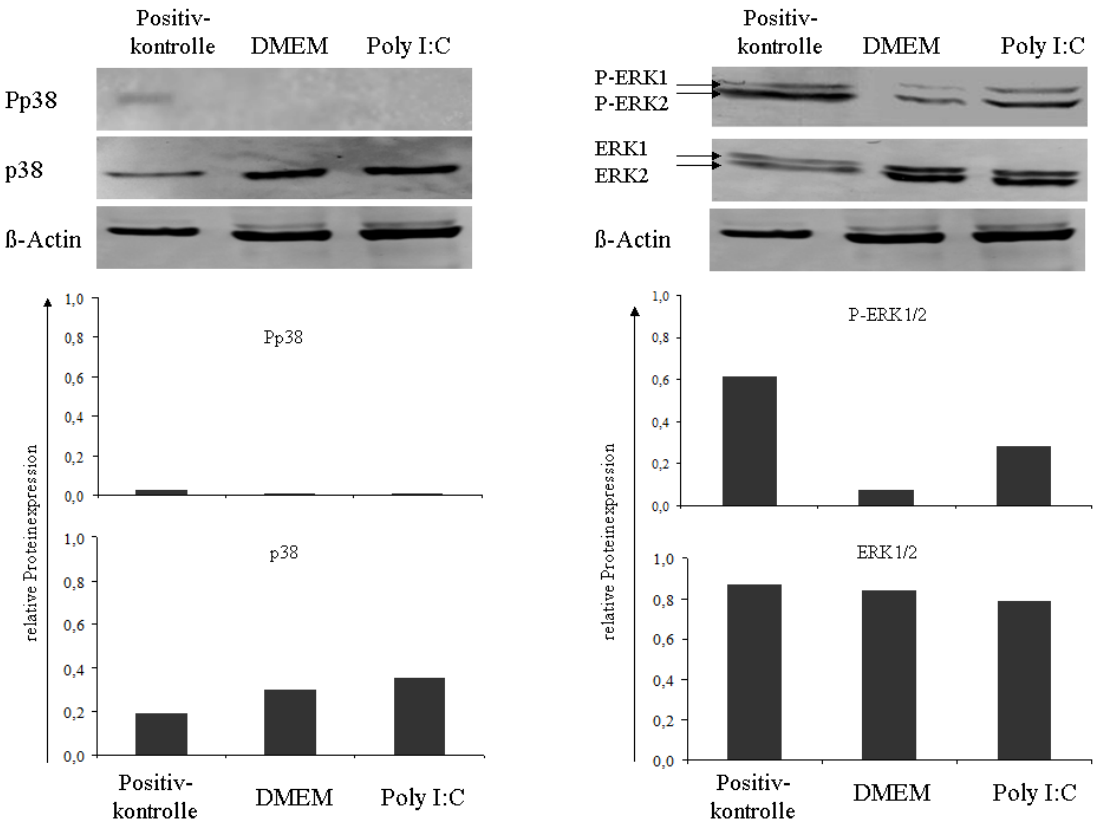


Abbildung 18: Expression von P-p38 und P-ERK1/2 nach PolyI:C Inkubation
Die Zelllinie PCI1 wurde 72h mit 50µg/ml PolyI:C inkubiert. Die relative Proteinexpression im Abgleich mit der Ladekontrolle ß-Actin zeigt, dass ERK1/2 MAPK durch PolyI:C aktiviert wurde (P-ERK1/2). Der Nachweis von ERK1/2 erfolgte mit einem Primärantikörper gegen beide Isoformen und ergab die entsprechenden Doppelbanden.

Um den Effekt der ERK1/2 Aktivierung durch PolyI:C näher zu analysieren, wurden die HNSCC Zelllinien PCI1, PCI13 und BHY 72h mit 50µg/ml PolyI:C inkubiert und die Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-8 in den Zellkulturüberständen untersucht. Im Vergleich zur Mediumkontrolle (DMEM) konnte PolyI:C die Menge an IL-6 und IL-8 im Zellkulturüberstand deutlich steigern (Abbildung 19).

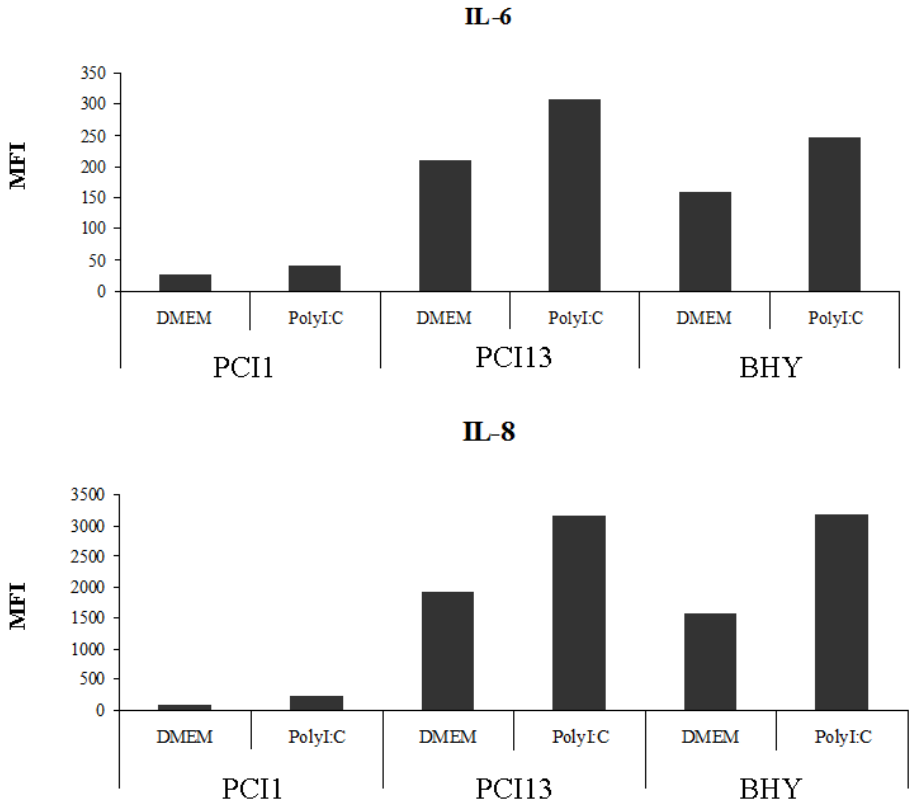


Abbildung 19: PolyI:C induzierte IL-6 und IL-8 Sekretion in HNSCC Zelllinien
Die Zelllinien PCI1, PCI13 und BHY wurden 72h mit 50µg/ml PolyI:C inkubiert und die Interleukinkonzentration der Zellkulturüberstände mittels Flex-Set Messung im FACS bestimmt. Die Fluoreszenzintensität war proportional zur Interleukinkonzentration der Zellkulturüberstände. (MFI: "Mean Fluorescence Intensity"). Es zeigte sich, dass PolyI:C die Sekretion von IL-6 und IL-8 bei allen drei Zelllinien deutlich verstärkte.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine PolyI:C induzierte Aktivierung des TLR3 Signalweges eine ERK1/2 abhängige IL-6 und IL-8 Sekretion bei den untersuchten HNSCC Zelllinien verursacht. Zusammen mit den Ergebnissen zur Regulation pro-apoptotischer Proteine wird die Vermutung der Vorarbeiten zum TLR3 Signalweg in HNSCC bestätigt, dass TLR3 als ein wichtiger Faktor bei der Tumorprogression von HNSCC angesehen werden kann.

3 Diskussion

Kopf-Hals-Karzinome entstehen aus chronischen Entzündungen, resultierend aus übermäßigem Alkohol- und Nikotinkonsum. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten sowohl eine konstitutiv hohe NFκB Expression als auch eine hohe TLR3-Expression als einzigen Toll-like Rezeptor bei HNSCC nachweisen, was auf eine dysregulierte Signaltransduktion aufgrund der permanenten Entzündungsreaktion hindeutet. Eine Beteiligung der Stress-aktivierten p38 MAP Kinase bei der Tumorigenese von HNSCC sollte untersucht werden. Als weitere Fragestellung sollte die TLR3 abhängige Regulation der HNSCC Progression analysiert und das Zusammenspiel von TLR3 und der p38 MAP Kinase bei der Signaltranasduktion in HNSCC geklärt werden.

3.1 p38 MAP Kinase abhängige Expression von IL-6 und IL-8 in HNSCC

Bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren sind erhöhte Konzentrationen der Th2 Zytokine IL-4, IL-6, IL-10 und IL-12 im Serum gemessen worden, wogegen die Expression von Th1 Zytokinen wie IFN-γ deutlich herunterreguliert ist. Diese Verschiebung von einer Th1 zur Th2 Immunantwort steht im Zusammenhang mit einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung [22, 71]. Die Th2-Zytokine begünstigen die Tumorigenese, indem sie beispielsweise immunsupprimierend (IL-4 und IL-10) oder anti-apoptotisch wirken (IL-6) [72, 73]. Chemokine wie IL-8 oder VEGF sind in HNSCC überexprimiert und maßgeblich an den Prozessen der Angiogenese, des Zellwachstums und der Metastasierung beteiligt [74].

In dieser Arbeit konnte die Regulation der Zytokine IL-6 und IL-8 unter Beteiligung der p38 MAPK innerhalb eines großen Zeitrahmens festgestellt werden. In einer Zeitreihe erfolgte eine PMA-induzierte Aktivierung der p38 MAPK bereits nach 15 Minuten, die

Messung der Zellkulturüberstände zeigte erst bei dem 24h Messwert eine stark gestiegene IL-6 und IL-8 Konzentration, die eindeutig auf die PMA-Induktion zurückzuführen ist. Eine Inkubation mit dem Inhibitor der p38 MAPK SB203580 konnte die Zytokinkonzentration bei gleichzeitiger Stimulation mit PMA verringern. Bei der Koinkubation mit MEK1 Inhibitor U0126 und PMA konnte man hingegen kaum eine Inhibierung der Zytokinsekretion beobachten, was eine p38 MAPK regulierte Zytokinsekretion vermuten ließ. Allerdings führte das "Silencing" der p38 MAPK durch spezifische siRNA nach PMA Zugabe nicht zu einer eindeutigen Reduktion der Interleukinkonzentration im Vergleich zur Mediumkontrolle, sodass diese Vermutung auf diesem Weg nicht bestätigt werden konnte. Es scheint, als ob in HNSCC Zelllinien eine PMA-induzierte IL-6 und IL-8 Sekretion sowohl über die p38 MAPK als auch über einen anderen MAPK Signaltransduktionsweg reguliert wird. Die Beteiligung der ERK1/2 MAPK liegt hierbei nahe, zumal auch in anderen Zellen ein "cross-talk" dieser MAPK in Zusammenhang einer Zytokinregulation festgestellt wurde [75]. Die MAP Kinasen ERK1 und ERK2 sind im Gegensatz zur p38 MAP Kinase sowohl in HNSCC Zelllinien als auch in Tumoren *in vivo* konstitutiv aktiviert. Dies lässt sogar vermuten, dass ERK1/2 bei zellulären Prozessen in HNSCC eine größere Rolle als die p38 MAPK spielt. Wahrscheinlich sind aber beide MAPK Signalwege miteinander verbunden, sodass bei der Inhibierung des einen Signalweges der andere Signalweg die Funktion teilweise mit übernimmt. Demnach würde die IL-6 und IL-8 Synthese nach p38 "Silencing" über ERK1/2 laufen. Die Durchführung von siRNA Experimenten mit ERK1 und ERK2 siRNA könnte hier weiteren Aufschluss über die Beteiligung von ERK Isoformen an der Regulation inflammatorischer Zytokine geben.

Die MEK1/2-ERK1/2 Signalkaskade ist entscheidend für die Zellproliferation und das Überleben von Zellen, wogegen die p38 MAPK nach Stress-induktion wie UV-Strahlungen pro-apoptotisch wirkt [76]. Eine p38 abhängige Dephosphorylierung von MEK1/2 führte in Fibroblasten zur Apoptose. Diese Dephosphorylierung konnte in verschiedenen Tumorzelllinien nicht festgestellt werden [77]. Es wird daher vermutet, dass ein wesentlicher Faktor der malignen Transformation die Suppression der p38 MAPK ist. Dies könnte auch eine Erklärung für die konstitutive ERK1/2 Aktivierung in den HNSCC Zelllinien sein.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Expression verschiedener phosphorylierter MAP Kinasen in HNSCC zeigte eine PMA-induzierte Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, JNK1/2, der p38 Isoformen und Akt mit den jeweiligen "downstream" Kinasen bzw. Substraten MSK2, RSK1, GSK-3α/ß, p70 S6 Kinase sowie HSP70. Es wird somit deutlich, dass das Phorbolester PMA mehrere Signalwege gleichzeitig aktivieren kann. Phorbolester sind polyzyklische Alkohole, die natürlicherweise vor allem bei *Euphorbiaceae* (Wolfsmilchgewächsen) vorkommen. PMA aktiviert die Proteinkinase C (PKC), indem es statt dem eigentlichen Substrat DAG (Diacylglycerin) die PKC bindet. Da PMA anders als DAG nicht schnell abgebaut wird, verursacht diese Bindung eine andauernde Aktivierung der PKC, die in eine verstärkte Proliferation mündet. Aus diesem Grund gelten Phorbolester wie PMA als Tumorpromotoren [78, 79]. Andere Studien zeigen aber auch, dass PMA pro-apoptotische wirkt, so dass der Effekt von PMA auf Tumore letztendlich noch unklar bleibt [80].

Die Serin-Threonin Kinase Akt, auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet, gehört zu der Klasse der AGC Kinasen (AMP/GMP Kinasen und Proteinkinase C) und besteht aus den Isoformen Akt1-3 [55]. In vielen Krebsentitäten ist Akt konstitutiv aktiviert, so auch im Kopf-Hals-Karzinom [81, 82]. Durch die Phosphorylierung und Inaktivierung wichtiger proapoptotischer Moleküle wie beispielsweise Bad und Caspase-9, GSK-3ß und den Inhibitoren des Zellzyklus p21 und p27, besitzt Akt eine onkogene Funktion [83]. Eine Untersuchung verschiedener Tumorzelllinien konnte zeigen, dass die Aktivität der p38 MAP Kinase durch Akt reguliert wird. Eine Aktivierung von Akt ist antagonistisch zur p38 Aktivität, wogegen eine Inaktivierung von Akt zu einer Aktivierung von p38 führt [84]. Die Ergebnisse des Phospho-MAPK Proteinarrays zeigen ebenfalls eine vergleichsweise geringe Akt Expression, wogegen die p38 MAPK auch in unstimulierten Zellen aktiviert vorlag. Letztendlich scheintvdie Akt Kinase an der Regulation inflammatorischer Zytokine in HNSCC nicht beteiligt zu sein.

Der zelluläre Stress einer PMA-Stimulation ist sowohl durch die gestiegene Expression des Hitzeschockproteins (HSP) 27 im Phospho-MAPK Proteinarray als auch durch die deutlich verringerte Proliferation beim MTT-Test erkennbar. Proteine aus der Familie der kleinen Hitzeschockproteine wie HSP27 verhindern die Aggregation von Proteinen

bei zellulärem Stress. Durch die Bildung von Oligomeren erhöht sich die Affinität von HSP27 zu dem degradierten Protein. Das Gleichgewicht der Oligomerisation wird durch den reversiblen Phosphorylierungsstatus reguliert, der unter anderem von der p38 MAPK und MK 2/3 induziert wird [85]. In vielen Tumoren sind Hitzeschockproteine überexprimiert. Auch in der untersuchten HNSCC Zelllinie ist der basale Level an phosphoryliertem HSP27 hoch und wird durch PMA weiter erhöht. Eine Koinkubation mit dem p38 Inhibitor SB203580 und PMA verringerte die Proliferation ebenfalls. Möglicherweise ist der Stimulus von PMA zu dominant, als dass eine direkte Regulation des Zellwachstums durch die p38 MAPK mit dem Proliferations-Assay nachweisbar wäre.

Generell konnten die Inhibitoren SB203580 und U0126 den PMA induzierten Effekt nicht vollständig inhibieren. Der ATP kompetitive Pyridinyl-Imidazol Inhibitor SB203580 bindet spezifisch an die ATP Bindedomäne der p38 MAPK. Im inaktiven Zustand besitzt die p38 MAPK eine geringe Affinität zu ATP, die sich nach der Aktivierung durch die Phosphorylierung am Phosphorylierungsmotiv durch MKK6/3 deutlich erhöht. Im Gegensatz zu ATP kann der Inhibitor SB203580 auch am inaktiven Enzym binden und die Enzymaktivität von p38 beeinflussen. Die p38 MAP Kinase kann somit von den übergeordneten Kinasen phosphoryliert werden, der weitere Signalweg über die Aktivierung von p38 "downstream" Kinasen wird aber durch SB203580 inhibiert. [61, 62]. Dies erklärt die verringerte IL-6 und IL-8 Konzentration trotz PMA-induzierter p38 Aktivierung bei gleichzeitiger Inkubation mit SB203580 in Abbildung 7 und Abbildung 11. Der Inhibitor U0126 ist spezifisch für die MAP Kinase Kinase (MEK1), einer ERK1/2 übergeordneten Kinase. Durch die Bindung von U0126 wird die inaktive Form von MEK1 stabilisiert und die Aktivierung blockiert. Dies inhibiert die Aktivierung von ERK1/2 [86]. Untersuchungen von Mausfibroblasten (NIH3T3), die mit einer konstitutiv aktiven MEK1 Kinase transfiziert wurden, konnten nach PMA-Stimulation keine ERK1/2 Aktivierung nachweisen, wenn die Zellen zuvor mit U0126 inkubiert wurden [87]. Die beobachtete ERK1/2 Phosphorylierung nach PMA und U0126 Inkubation in den HNSCC Zelllinien widerspricht diesem Ergebnis. Es scheint, als ob in HNSCC die ERK1/2 Kinase ohne MEK1 Phosphorylierung aktiviert werden kann. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass es neben der MAP

Signalkaskade auch noch die Möglichkeit der Autoaktivierung von MAP Kinasen gibt [29]. Ob in HNSCC die ERK1/2 Kinase autophosphoryliert wird, müssen weitere Untersuchungen klären.
Da die Expression von IL-6 und IL-8 bei HNSCC von essentieller Bedeutung zu sein scheint, werden diese Zytokine vermutlich von der p38 MAP Kinase im "cross-talk" mit ERK1/2 reguliert, sodass bei Beeinträchtigung eines Regulators der andere die Funktion übernehmen kann.

3.2 Regulation der STAT3 Aktivität durch die p38 MAP Kinase

Die Weiterleitung extrazellulärer Signale von Zytokinrezeptoren (z.B. IL-6 Rezeptor) oder Rezeptor Tyrosin Kinasen (z.B. EGFR) zum Nukleus, erfolgt durch STAT Proteine ("signal transducer and activator of transcription"). Sie induzieren die Transkription von Genen, die an der Regulation von Zellzyklus, Apoptose oder der Zelldifferenzierung beteiligt sind. In vielen malignen Tumoren, so auch in Kopf-Hals-Karzinomen, ist STAT3 überexprimiert und konstitutiv aktiviert, was zur verstärkten Proliferation und verbesserter Lebensfähigkeit von Tumorzellen aufgrund einer Expression anti-apoptotischer Proteine führt [63]. Eine Studie mit verschiedenen HNSCC Zelllinien konnte eine NFκB abhängige Expression von IL-6 feststellen, die zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 führte. Es wird hier angenommen, dass die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB zu der Produktion und Sekretion von Zytokinen wie IL-6 führt, das durch Bindung der gp130 und IL-6 Rezeptoren eine autokrine Aktivierung von STAT3 verursacht [88]. Eine weitere Aktivierung von STAT3 in HNSCC kann auch über den EGF Rezeptor erfolgen, indem STAT3 entweder direkt oder von intermediären Kinasen wie beispielsweise ERK phosphoryliert wird [16, 65, 88].
In dieser Arbeit konnte eine p38 abhängige Aktivierung von STAT3 nachgewiesen werden. Die siRNA vermittelte Inhibierung der p38 MAP Kinase führte zu einer verminderten Expression von Phospho-STAT3 an der Tyrosin 705 Untereinheit. Es wird vermutet, dass diese Tyrosinphosphorylierung für die Aktivierung und Bildung des STAT3 Dimers notwendig ist, wobei neuere Studien diesem widersprechen [89]. Die

Phosphorylierung von STAT3 am Serin 727, die die Transkriptionsaktivität von STAT3 verstärken soll [65], erfolgte unabhängig von der p38 MAP Kinase, was den bisherigen Studien zur STAT3 Serinphosphorylierung widerspricht [90]. Sie konnte aber von PMA induziert werden. Auch hier könnten siRNA Experimente die Rolle von MAP Kinasen bei der STAT3 Regulation in HNSCC klären.

Da in HNSCC sowohl der EGF Rezeptor als auch der IL-6 Rezeptor überexprimiert sind, könnte die p38 MAPK einerseits bei der autokrinen STAT3 Aktivierung durch einen "cross-talk" mit NFκB beteiligt sein, andererseits bei der EGFR vermittelten STAT3 Aktivierung zwischengeschaltet sein. Die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 über p38 sorgt für die Aktivierung von STAT3, eine andere MAPK phosphoryliert STAT3 an der Serin 727 Untereinheit. Die Zielgene von STAT3 sind Zellzyklusregulatoren wie *Cyclin D1*, *c-myc* oder *p21* und *p27*, anti-apoptotische Gene wie *Bcl-2* und *Bcl-xL*, Gene für Angiogenesefaktoren wie *VEGF* oder der negative STAT3 Regulator *SOCS3*. Demnach ist durch die Regulation von STAT3 der p38 MAPK eine tumorinduzierende Funktion in HNSCC nachgewiesen worden.

In über 50% der Kopf-Hals-Karzinome ist das *p53* Gen mutiert oder inaktiviert. Eine Mutation hat häufig eine Überexpression des p53 Proteins zur Folge, was als ein Merkmal der HNSCC Tumorigenese angesehen wird [12]. P53 reguliert in untransformierten Zellen viele wichtige zelluläre Funktionen wie die Apoptose und den Zellzyklus, schützt somit die Zellen vor einer malignen Entartung und gilt als Tumorsuppressor. Diese Funktionen sind bei mutiertem *p53* in malignen Tumoren gestört. Bei zellulärem Stress aktiviert die p38 MAPK p53 an verschiedenen Serinuntereinheiten wie beispielsweise am Serin 46, was in eine verstärkte Transkription p53 regulierter Gene resultiert [32]. Die Funktion der spezifischen Phosphorylierung von Serinuntereinheiten ist noch weitestgehend ungeklärt, scheinen aber für die Aktivierung von p53 nicht essentiell zu sein [91].

Durch die Untersuchung der p38 abhängigen Aktivierung von p53 sollte die Rolle von p38 als möglicher Tumorsuppressor näher untersucht werden. Es zeigte sich, dass in HNSCC die Aktivierung von p53 nicht einer Regulation durch die p38 MAPK unterliegt, wie die Ergebnisse der Western Hybridisierung nach p38 "Silencing" eindeutig zeigen. Die Phosphorylierung an der Serin 46 Untereinheit wird aber durch

PMA induziert. Die Serin 15 und Serin 392 Untereinheiten von p53 sind in den untersuchten HNSCC Zelllinien konstitutiv phosphoryliert. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass p53 auch Proteine anderer Signalkaskaden wie JNK, Akt und p38 sowie die Transkriptionsfaktoren wie NFκB und STAT3 negativ regulieren kann. Wahrscheinlich wird in den untersuchten HNSCC Zelllinien eher die Aktivität von MAPK durch p53 beeinflusst, als dass umgekehrt eine Regulation von p53 über p38 erfolgt. Des Weiteren ist noch ungeklärt, ob in den untersuchten Zelllinien *p53* mutiert vorliegt und aus diesem Grund einen dysregulierten Aktivierungsmechanismus besitzt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die p38 MAPK durch die Regulation der Zytokine IL-6 und IL-8 maßgeblich an der Tumorigenese beteiligt ist, zumal eine autokrine Aktivierung von STAT3 über den IL-6 Rezeptor, die in verstärkter Proliferation und Expression anti-apoptotischer Proteine resultiert, zu vermuten ist. Die Funktion anderer MAPK, insbesondere der ERK1/2 MAP Kinase muss in diesem Zusammenhang noch geklärt werden. Auch ist die genaue Analyse der STAT3 und NκFB regulierten Gene für die Bestätigung dieser Hypothese von großer Bedeutung.

3.3 TLR3 als wichtiger Faktor für die Progression von HNSCC

Unsere Untersuchungen zum Expressionsprofil humaner Toll-like Rezeptoren bei Kopf-Hals-Karzinomen konnten ausschließlich TLR3 als einzigen Toll-like Rezeptor im Tumorgewebe und Zelllinien nachweisen. Die starke TLR3 Expression beschränkte sich auf das Tumorgewebe und ist weder im angrenzenden noch bei leukoplastischen Gewebe nachgewiesen worden [52]. Der Transkriptionsfaktor NFκB reguliert bei Entzündungsreaktionen die Expression relevanter Gene und bestimmt somit zelluläre Funktionen wie Proliferation oder Apoptose. Die chronische Entzündungsreaktion in HNSCC verursacht eine konstitutive Aktivität von NFκB, die auch bei gesunden Schleimhautproben starker Raucher nachgewiesen werden konnte [52]. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass der TLR3 Signalweg in HNSCC zu der NFκB Aktivität beiträgt, aber nicht als wichtigster Faktor für die Aktivierung angesehen

werden kann. Des Weiteren scheint eine TLR3 vermittelte Induktion von c-myc die Proliferation zu beeinflussen. Bei Untersuchungen von Mammakarzinom Zelllinien konnte eine TLR3 Expression ebenfalls nachgewiesen werden [50, 70]. Die Stimulation des TLR3 Signalweges mit dem artifiziellen Liganden PolyI:C führte bei diesen Untersuchungen zur Apoptose. Aufgrund dieser Diskrepanz zu den bisherigen Ergebnissen in Kopf-Hals-Karzinomen wurde in dieser Arbeit der Effekt einer PolyI:C Stimulation auf die Expression pro-apoptotischer Proteine bei der HNSCC Zelllinie PCI1 und der Mammakarzinom Zelllinie T47D untersucht. Die Ergebnisse des Apoptose Proteinarrays zeigten deutlich, dass in beiden Zelllinien keine Apoptoseinduktion durch PolyI:C stattfand. Die Expression der untersuchten pro-apoptotischen Proteine wurde durch PolyI:C entweder reduziert oder blieb auf ähnlichem Niveau wie bei den Kontrollzellen nach Mediuminkubation. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Beobachtungen bezüglich der Mammakarzinom Zelllinien und stützt unsere Beobachtung einer PolyI:C induzierten Proliferation bei HNSCC. Die TLR3 induzierte Apoptose in Mammakarzinomen wurde bei einer Arbeitsgruppe nach Zugabe des Peptidyltransferase Inhibitors Cycloheximid, das auch als Zytostatikum Verwendung findet, festgestellt [70], wodurch die Beurteilung der beobachteten Apoptose schwer einzuschätzen ist. In Mammakarzinomen wird PolyI:C zusätzlich zur Radiotherapie verwendet und bei TLR3 positiven Zellen im Zusammenhang pro-apoptotischer Effekte gesehen [92]. Möglicherweise sind die Effekte von PolyI:C sehr stark von der untersuchten Zelllinie und der untersuchten Tumorentität abhängig. In gesunden Zellen ist eine TLR3 vermittelte Apoptose durch die Induktion der Caspase-9 und einer IRF3 abhängigen IFN-1 Sekretion, die durch die Stabilisierung von p27 den Eintritt in den Zellzyklus verhindert, nachgewiesen worden. Viele Aspekte der Signaltransduktion von TLR3 zur Apoptose, auch in Zusammenhang einer Beteiligung von NFκB, sind aber noch ungeklärt [93].

Grundsätzlich ist es zumindest bei HNSCC unwahrscheinlich, dass Tumorzellen ihr Wachstum durch die Expression eines "Apoptoserezeptors" gefährden. Der MAPK – Proteinarray und die Western Hybridisierungsexperimente zeigten nach der Stimulation durch PolyI:C, dass die ERK1/2 MAP Kinase aktiviert wurde, wogegen bei der p38 MAPK nur eine sehr geringe Aktivierung festzustellen war. Zugleich bewirkte die

PolyI:C Stimulation einen Anstieg der Zytokine IL-6 und IL-8 in den Zellkulturüberständen. Somit ist die Beteiligung der p38 MAPK am TLR3 Signalweg auszuschließen und eine ERK1/2 vermittelte IL-6 und IL-8 Sekretion nach PolyI:C Stimulation zu vermuten, da auch die MAPK JNK1/2 nicht durch PolyI:C phosphoryliert wurde (Daten nicht gezeigt). Allerdings muss hierbei die Beteiligung von PKR sowie RIG-1 und MDA-5 durch weitere Analysen ausgeschlossen werden, da diese Mediatoren ebenfalls durch PolyI:C aktiviert werden können. Die TLR3 vermittelte Signaltransduktionskaskade wird von den Tumorzellen als weiterer Signalweg zur Induktion der Zytokine IL-6 und IL-8 genutzt und sorgt somit für das Fortschreiten der Angiogenese und der IL-6 induzierten Proliferation, die möglicherweise sogar über STAT3 verläuft

Nach der Aktivierung des EGF Rezeptors durch die Bindung des Liganden werden die MEK1-ERK1/2-, PI3-Kinase-, Akt- und STAT3- Signalwege aktiviert, die als onkogene Regulatoren das Zellwachstum und die Tumorigenese beeinflussen [94]. Die klinische Anwendung des EGFR Antikörpers Cetuximab zeigt nach dem aktuellen Kenntnisstand nur einen geringen Erfolg bei der Tumortherapie für einen großen Teil der Patienten. Manche Patienten sprechen hingegen sehr gut auf eine Therapie mit Cetuximab an. Die Gründe hierfür sind noch ungeklärt. Man kann vermuten, dass nach der Inhibierung von EGFR der TLR3 Signalweg stellvertretend für die Biosynthese und Regulation wichtiger Prozesse vom Tumor verwendet wird und eine Therapie mit EGFR und TLR3 Inhibitoren möglicherweise bessere Ergebnisse erzielt.

Tumore des Kopf-Hals-Bereiches werden von vielen Lymphozyten wie zum Beispiel Dendritische Zellen, NK-Zellen oder T-Zellen infiltiert, die von dem Tumor in ihrer Funktion modifiziert werden [95, 96]. Stimuli der infiltrierenden Lymphozyten zum Beispiel durch Th1 Zytokine aktivieren in den Tumorzellen Mediatoren wie MAP Kinasen, STAT3 und SOCS3 sowie Transkriptionsfaktoren wie NFκB und AP-1. Dieses führt zu Abwehrmechanismen und fördert die Modulation der Lymphozytenfunktion durch die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-6, IL-8, IL-4 und IL-10 sowie Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und VEGF. Auf diese Weise entsteht ein Netzwerk aus fehlgesteuerten Lymphozyten und den Tumorzellen, das die

Tumorigenese erheblich fördert. In der Abbildung 20 ist die postulierte Signaltransduktionskaskade innerhalb einer HNSCC Zelle schematisch dargestellt.

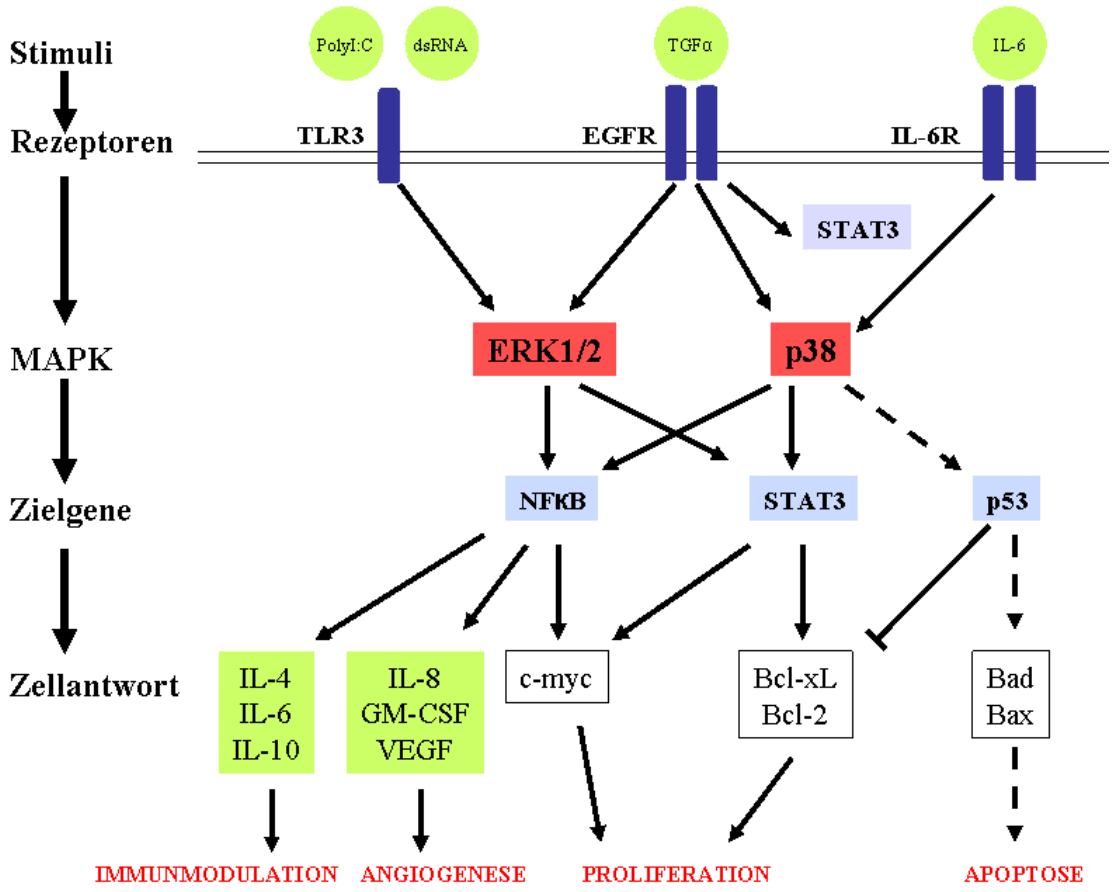


Abbildung 20: Postulierte TLR3 und p38 MAPK regulierte Signaltransduktionskaskade in HNSCC
Tumorinfiltrierende Lymphozyten sorgen für die Immunabwehr seitens des Tumors durch die Induktion von Chemokinen und Zytokinen, die einerseits Angiogenese und Metastasierung fördern (z.B.: IL-8, GM-CSF, VEGF), andererseits die infiltrierenden Lymphozyten zu einer tumorinduzierenden Zellantwort (z.B.: IL-4, IL-10) zwingen oder eine autokrinen Signalweg fördern (IL-6-p38-NFκB/STAT3-Signalweg). Die Induktion von c-myc und Bcl-xl Proteinen induziert die Proliferation. Apoptotische Signalwege sind möglicherweise in HNSCC inhibiert (dargestellt mit einer gestrichelten Linie).

In Kopf-Hals-Karzinomen befindet sich ein komplexes Netzwerk von Signaltranduktionswegen, die möglicherweise miteinander interagieren und somit Funktionen eines anderen Signalweges übernehmen können. Viele Regulationen sind noch nicht geklärt und benötigen weitere Untersuchungen. Die in dieser Arbeit

ermittelten Funktionen der TLR3 Signaltransduktion und die p38 vermittelten Regulationen von Zytokinen sind wichtige Erkenntnisse, die für eine spätere Immuntherapie von Bedeutung sein werden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen SIGMA-ALDRICH (Seelze, D), OTTO FISCHAR (Saarbrücken, D), FLUKA (Buchs, S), und CARL ROTH GMBH (Karlruhe, D) bezogen. Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und gegebenenfalls über einen 0,2µm Membranfilter (SARSTEDT, Nümbrecht, D) steril filtriert. Die weiteren Chemikalien und Reagenzien sind mit Angaben des Herstellers in den folgenden Kapiteln angegeben.

4.2 Zelllinien

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Zelllinien	Beschreibung	Referenz
PCI-1	humanes Plattenepithelkarzinom, Hypopharynx; adhärent	Pittsburg Cancer Institut; USA
PCI-13	humanes Plattenepithelkarzinom, Hypopharynx; adhärent	Pittsburg Cancer Institut; USA
BHY	humanes Plattenepithelkarzinom, Oropharynx (hochdifferenziert); adhärent	DSMZ (Braunschweig, D) # ACC404
T47D	ductales Mammakarzinom; adhärent	Zur Verfügung gestellt von der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH Campus Lübeck

4.3 Antikörper

Tabelle 3: verwendete Antikörper für die Western Hybridisierung

Antikörper	Typ	eingesetzte Konzentration	Referenz
Anti-Pp38α	monoklonal, Kaninchen,	1: 500	INVITROGEN (Carlsbad, USA)
Anti-p38α	monoklonal, Maus	1: 1000	INVITROGEN (Carlsbad, USA)
Anti-P-STAT3 (Tyr705)	polyklonal, Kaninchen	1: 1000	INVITROGEN (Carlsbad, USA)
Anti-P-STAT3 (Ser727)	monoklonal, Kaninchen	1: 1000	ACRIS (Hiddenhausen, D)
Anti-STAT3	monoklonal, Kaninchen	1: 1000	INVITROGEN (Carlsbad, USA)
Anti-NFκB p65 Untereinheit	monoklonal, Kaninchen	1: 500	BIOMOL (Hamburg, D)
Anti-TLR3	monoklonal, Maus	1: 500	IMGENEX (San Diego, USA)
Anti-c-myc	monoklonal, Maus	1: 500	BIOMOL (Hamburg, D)
Anti-ß-Actin Ladekontrolle	monoklonal, Maus	1:1000	ABCAM, Cambridge (UK)
Anti- p53	monoklonal, Maus	1:1000	INVITROGEN (Carlsbad, USA)

Antikörper	Typ	eingesetzte Konzentration	Referenz
Anti-P-p53 (Serin 15)	monoklonal, Kaninchen	1:1000	BIOMOL (Hamburg, D)
Anti-P-p53 (Serin 46)	monoklonal, Kaninchen	1:1000	EPITOMICS (Burlingame, USA)
Anti-P-p53 (Serin 392)	monoklonal, Kaninchen	1:500	EPITOMICS (Burlingame, USA)
Anti-P-ERK1/2	polyklonal, Kaninchen	1:1000	BIOMOL (Hamburg, D)
Anti-P-JNK1/2	polyklonal, Kaninchen	1:1000	BIOMOL (Hamburg, D)
Anti-Maus- IgG1-Sekundärantikörper	Ziege	1:3000	BIORAD (Hercules, USA)
Anti-Kaninchen IgG1-Sekundärantikörper	Ziege	1:3000	BIORAD (Hercules, USA)

4.4 siRNA

Tabelle 4: siRNA Oligonukleotide

siRNA	eingesetzte Konzentration	Referenz
p38α MAP Kinase ShortCut™ siRNA Mix	25nM	NEW ENGLAND BIOLABS (Ipswich, USA)
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligonukleotid	25nM	INVITROGEN (Carlsbad,USA)

4.5 Zellkultur

4.5.1 Kultivierung von HNSCC-Zelllinien

Die adhärenten HNSCC-Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 unter Verwendung von DMEM ("Dulbecco´s modified Eagle´s Medium"; GIBCO (New York, USA)) mit 4,5mg/ml Glucose, 10% FCS (fetales Kälberserum), 1mM Natriumpyruvat und nicht essentiellen Aminosäuren (MEM- NEAA; GIBCO) in einfacher Konzentration kultiviert. Für die Subkultivierung wurden die Zelllinien bei einer Konfluenz von 70-80% mit Trypsin-EDTA (PAA; Pasching, (A)) von den Zellkulturflaschen (SARSTEDT; Nümbrecht (D)) abgelöst, in DMEM resuspendiert und zum Pelletieren zentrifugiert (200g, 8 min, 30°C). Nach dem Resuspendieren des Zellpellets wurde die gewünschte Verdünnung der Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen überführt.
Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mit dem "Venor PCR Detection Kit" (MINERVA; Berlin, D) auf Mycoplasmen-Kontaminationen untersucht.

Zur Langzeit-Aufbewahrung wurden die Zelllinien im Verhältnis 1:1 mit 2-fach konzentriertem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO, 70% DMEM) versetzt und in Kryoröhrchen (SARSTEDT) unter Verwendung eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussels bei -80°C eingefroren.

4.5.2 Stimulation von Zelllinien

Zur Aktivierung der p38 MAPK wurde PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate; SIGMA-ALDRICH, Seelze, D) in einer Endkonzentration von 200ng/ml den permanenten HNSCC-Zelllinien zugegeben und in Abhängigkeit zu den jeweiligen Versuchsbedingungen bis zu 48h inkubiert. Die Effizienz einer PMA-Stimulation hängt von der Konfluenz der Zellen ab. Daher wurden nur $3x10^5$ Zellen je T25-Zellkulturflasche eingesetzt. Um die p38 Aktivierung spezifisch zu inhibieren, wurde der Pyridinyl-Imidazol Inhibitor SB203580 (JENA BIOSCIENCE; Jena, D) in einer Endkonzentration von 10µM 20min vor der PMA-Stimulation zu den Zellen gegeben.

Der Zellkulturüberstand wurde abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei -80°C eingefroren.

4.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (BRAND; Wertheim, D). Zur Differenzierung von toten und lebenden Zellen wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (MERCK; Darmstadt, D) gemischt. Der polyanionische Azofarbstoff Trypanblau durchdringt bei toten Zellen die Zellmembran und färbt die Zellen dunkelblau. Im Mikroskop erscheinen lebende Zellen hingegen farblos (Vitalfärbung). Die Anzahl lebender Zellen wurde mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

Zellen/ml = (mittlere Zellzahl pro Großquadrat der Neubauer Zählkammer) x Verdünnungsfaktor x 10^4

4.6 Transfektion von HNSCC-Zelllinien

4.6.1 Inhibierung ("Silencing") von Targetgenen

Das Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi) ist eine sequenzspezifische mRNA Degradation, die durch eine zur Zielsequenz homologe dsRNA induziert wird. Dieser Mechanismus dient der Eliminierung von "fremd" mRNA (z.B. Virus RNA) und ist hochkonserviert. In Säugerzellen wird dsRNA durch ein RNAse III ähnliches Protein namens Dicer in 21-23bp große RNA-Fragmente mit 2nt 3´ Überhängen gespalten [97]. Diese siRNAs ("small interfering RNAs") binden und aktivieren den "RNA-induced silencing"- Komplex (RISC) [98]. Der so entstandene RISC-siRNA-Komplex bindet an komplementäre mRNA, was zu einem Shutdown der Genexpression führt.
Synthetisch hergestellte 21bp siRNAs ahmen den "Dicer-Effekt" nach und können zur gezielten Manipulation der Genexpression in eukaryotischen Systemen eingesetzt werden. Aufgrund ihrer geringen Größe umgehen diese siRNAs Mechanismen, die zum generellen dsRNA-induzierten Shutdown der Genexpression führen [99].
Die in dieser Arbeit verwendete siRNA ist in Tabelle 4 aufgeführt.

4.6.2 Transfektion

Die zu transfezierenden Zelllinien wurden 24h vor der Transfektion in 6- oder 12-Well-Platten (SARSTEDT) ausgesät und sollten nach 24h eine Konfluenz von 60-70% nicht überschritten haben. Die Transfektion wurde mit Lipofektamin2000 (INVITROGEN) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die siRNA in der entsprechenden Konzentration (Tabelle 4) eingesetzt. Nach 72h war durch das "Silencing" des betreffenden Gens die Proteinexpression herunterreguliert. Dieser Effekt wurde durch Western Hybridisierung überprüft. Um die Transfektionseffizienz zu kontrollieren wurde eine Transfektion mit einem GFP (Green Fluorescent Protein) -markierten, doppelsträngigen Oligonukleotid (BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo; INVITROGEN) durchgeführt. Dieses Oligonukleotid führt zu keinem "Silencing", da keinerlei Sequenz-Homologie zu einem Gen in Säugerzellen besteht. Die Transfektionseffizienz wurde 72h nach der Transfektion im FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) -Kanal mittels Duchflusszytometrie untersucht.

4.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Analyse von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen einer Zelle. Hierbei werden Zellen einer Zellsuspension, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper inkubiert wurden, in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Durch den monochromatischen Laser werden die Photonen des Fluoreszenzfarbstoffs auf ein höheres Energieniveau gebracht. Die Emission wird anschließend mit einem Photodetektor gemessen und verhält sich proportional zur Menge gebundender Antikörper. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und an der Expression des nachzuweisenden Proteins unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde mit dem FACSCanto Flow Cytometer und der FACS Diva Software Version 4.1.2 (BDBIOSCIENCE; Heidelberg (D)) gearbeitet.

4.7.1 Annexin V und Propidiumjodid (PI)-Färbung

Apoptose ist durch verschiedene morphologische Veränderungen der Zelle wie Verlust der Plasmamembran, Kondensation des Nukleus und des Zytoplasmas sowie Spaltung der DNA im Nukleus gekennzeichnet. Ein frühes apoptotisches Merkmal ist die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) vom intrazellulären an den extrazellulären Bereich der Plasmamembran. Annexin V besitzt als Calzium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein eine hohe Affinität zu PS und ist somit für einen sensitiven Nachweis apoptotischer Zellen geeignet. Propidiumjodid (PI) durchdringt die Plasmamembran toter oder geschädigter Zellen und wird als Standardnachweismethode für eine Vitalitätsbestimmung von Zellen eingesetzt. Der Nachweis apoptotischer und toter Zellen wurde in dieser Arbeit im Durchflusszytometer mit Annexin V-FITC und PI-PE (Phycoerythrin) von BDPharmingen durchgeführt. Apoptotische Zellen sind Annexin V positiv und PI negativ, während tote oder nekrotische Zellen für beide Marker positiv sind. V-itale Zellen sind sowohl für Annexin V als auch für PI negativ.
Die HNSCC Zelllinien PCI1 und PCI13 wurden nach der Stimulation mit 200ng/ml PMA in einem Zeitraum von 0-72h inkubiert. Nach jeweils 24h wurden die Zellen von den Zellkulturflaschen gelöst und in 1x Bindepuffer (BDPharmingen) bis zu einer Konzentration von 1x 10^6 Zellen resuspendiert. 100µl dieser Zellsuspension wurde mit jeweils 5µl des Annexin V-FITC und PI-PE Antikörpers 15 min inkubiert. Nach der Zugabe von 400µl Bindepuffer konnte die prozentuale Anzahl apoptotischer und toter Zellen im Durchflusszytometer bestimmt werden. Als Kontrolle wurden sowohl ungefärbte als auch unstimulierte Zellen verwendet.

4.8 Messung von Zytokinen aus Zellkulturüberständen

4.8.1 Flex-Set Messung im Durchflusszytometer

Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Kombination von Durchflusszytometrie und einem auf Partikel ("Beads")-basierenden Immunassay. Hierbei werden Microbeads

verwendet, die eine definierte Fluoreszenzintensität besitzen und spezifisch das zu analysierende Protein, in dieser Arbeit Interleukin (IL)-6 und IL-8 aus Zellkulturüberständen, binden. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen "Beads" können im FACSCanto im APC-Cy7- und APC- Filter detektiert werden, wobei jede "Bead"-Population einer bestimmten Position im Verhältnis zu einer anderen Population zugeordnet ist (Abbildung 21).

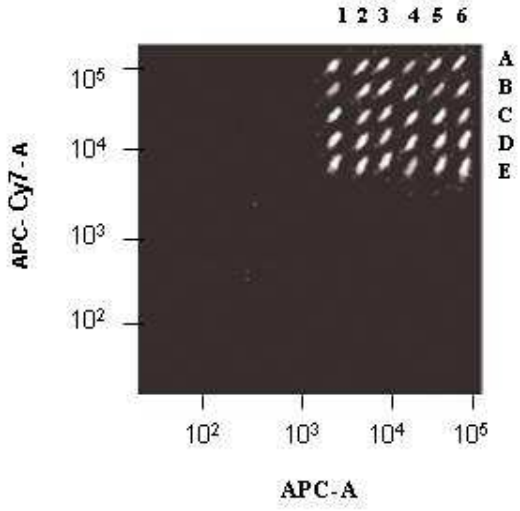


Abbildung 21: Alphabetisch-numerischen Einteilung der Flex-Set "Bead" Populationen
Die Fluoreszenzintensität der verwendeten "Beads" entspricht immer einer spezifischen Region im APC-Cy7 und APC Kanal. Da jede "Bead"-Population spezifisch ein bestimmtes Zytokin bindet, können mehrere verschiedene Zytokine gleichzeitig während einer Messung analysiert werden.

Auf diese Weise können mehre Beads mit unterschiedlichen Positionen zusammen in einem Ansatz verwendet und somit mehrere Proteine in einem Zellkulturüberstand gleichzeitig analysiert werden. Der Nachweis der Interleukine in den Zellkulturüberständen erfolgt mit einem PE konjugiertem Nachweisreagenz, das zusammen mit den Zellkulturüberständen in einem "Sandwich"-Komplex inkubiert wird (Abbildung 22).

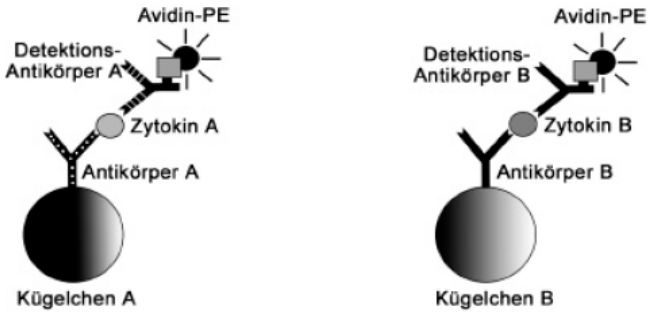


Abbildung 22: Prinzip der Antikörperbindung und Detektion der Zytokine
(aus: Bioplex –Array Manual von Biorad)
Die "Beads" binden spezifisch ein Zytokin aus dem Zellkulturüberstand, und werden mit Hilfe eines PE-gekoppelten Sekundärantikörper im PE-Kanal des Durchflusszytometers gemessen.

Die Zellkulturüberstände wurden auf Eis aufgetaut und nach Angaben des Herstellers für die Flex-Set Messung vorbereitet. Die Messung erfolgte im PE-Kanal als Reporterkanal und APC-APC-Cy7-Kanal für die "Beads" im Durchflusszytometer (FACSCanto). Anhand einer Standardkurve, die für jede Messung neu erstellt werden musste, wurden die Zytokinkonzentrationen mit der FCAP™ Array Software (BD BIOSCIENCE) berechnet.

4.8.2 Messung von Zellkulturüberständen im Bioplex-Array-Reader ™

Das Prinzip dieser Methode ist mit der Flex-Set Messung in Kapitel 4.8.1 identisch, nur hier erfolgt die Analyse der Zellkulturüberstände in einer 96-Well-Platte im Bioplex-Array-Reader (BIORAD). Mit dem hier verwendeten Th1/Th2-Panel (BIORAD) konnten die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN-γ und TNF-α gleichzeitig im Zellüberstand bestimmt werden.

Die Vorbereitung der Zellkulturüberstände für die Bioplex-Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Lokalisation der Standards auf der zu messenden Platte sowie deren Konzentrationen wurden vor der Messung über die Bioplex-Manager-Software (BIORAD) eingegeben, sodass am Ende der Messung die jeweiligen Zytokinkonzentrationen durch die Software berechnet werden konnten.

4.9 Proteinbiochemie

4.9.1 Isolierung von Proteinrohextrakten

HNSCC-Zellen wurden für die jeweilige Versuchsbedingung entsprechend angezogen. Nach einem Waschschritt mit 1x PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat) wurde anschließend RIPA-Puffer (1x PBS, 1% Igepal CA-630, 0,5% Natrium-Deoxycholat, 0,1% SDS) und Proteinase- und Phosphataseinhibitoren (30% Aprotinin, 10% PMSF, 10% Natrium-Orthovanodat, 20% Natriumfluorid, 10% Phosphataseinhibitor-Cocktail) zugegeben, die Zellen von der Zellkulturflasche mit einem Zellschaber (SARSTEDT) abgelöst und in ein Reaktionsgefäß (SARSTEDT) überführt. Die Zellen wurden 30-60 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000g 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2-4µl Proteinsuspension in Abhängikeit zur erwarteten Proteinkonzentration für die Bradford-Proteinbestimmung mit dem BIORAD Protein Assay eingesetzt [100]. Nach der Zugabe von 2×SDS Loading-Dye (0,25 M Tris-HCl, pH6.8, 15% ß-Mercaptoethanol, 30% Glycerin, 7% SDS, 0,3% Bromphenolblau) wurden die Proteine 15 min bei 65°C denaturiert.

Für die Proteinpräparation aus Tumorgewebe musste zuerst eine Einzelzellsupension hergestellt werden. Hierfür wurde das Fett und Bindegewebe vom Tumor abgetrennt und anschließend das Tumorgewebe in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert. Das Tumorgewebe wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und mit 50 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (250g; 5min). Der Überstand wurde verworfen und 10 ml Dissektionsmedium (1 ml Collagenase (INVITROGEN), 1 ml Hyaloronidase (INVITROGEN), 8 ml DMEM) 1,5h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe abzentrifugiert (250g; 5min) und der Überstand verworfen. Nun wurde das Gewebe in 20 ml Dispersionsmedium (1ml Dispase (INVITROGEN), 19ml DMEM) 2h im Wasserbad bei 37°C geschüttelt. Die Gewebereste wurden zuerst durch einen 70µm Filter dann durch einen 40µm Filter gefiltert. Die nun erhaltenen Zellen wurden bei 350g 10min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Proteinpräparation aus dem Zellpellet wie oben angegeben.

4.9.2 SDS-Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; [101])

In Abhängigkeit zur Proteinexpression und der molekularen Größe des untersuchten Proteins wurden 10 bis 60 µg/ml Protein auf ein 10 oder 12,5%iges SDS-Poly-Acrylamidgel aufgetragen und bei 200V aufgetrennt (Tabelle 5). Als Molekulargewichtsstandard wurde der "Kaleidoskope Precision Plus Proteinstandard" von BIORAD verwendet.

Tabelle 5: Zusammensetzung von einem SDS-Poly-Acrylamidgel

	Trenngel		**Sammelgel**
	10% Poly-Acrylamid	12,5% Poly-Acrylamid	4% Poly-Acrylamid
1M Tris-HCl pH 8,8	2ml	2ml	-
1M Tris-HCl pH 6,8	-	-	0,3ml
1% SDS	0,5ml	0,5ml	0,25ml
Poly-Acrylamid	1,65ml	2,1ml	0,35ml
H_2O dest.	0,85ml	0,4ml	1,6ml
APS	50µl	50µl	25µl
TEMED	5µl	5µl	2,5µl

4.9.3 Western-Hybridisierung

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Transblot-Transfermedium, BIODRAD) erfolgte durch Elektroblotting bei 0,8-20 mA in einer "Trans-Blot Semi-dry Transfer Cell" von BIORAD für 45min. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran mit PonceauS-Lösung (0,2% PonceauS, 3% Trichloressigsäure) gefärbt. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu blocken, wurde die Membran 1h mit 3% Magermilchpulver in 1x TBS (10x TBS: 24,2g Tris-Base, 80g NaCl; pH 7,6) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem

Primärantikörper für mindestens 4h oder über Nacht. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (5min) in 1xTBS entfernt. Nach einer zweistündigen Inkubation mit einem an Alkalische-Phosphatase (AP) gekoppelten Sekundärantikörper (1:3000) und erneutem Waschen in 1xTBS (3x 10min) wurden die Proteine durch Zugabe des AP- Substrates ("AP-Conjugate Substrate Kit"; BIORAD) visualisiert. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe des Imaginsystems Gel-Dok XR und der QuantityOne Software (beides BIORAD). Die relative Pixelintensität der Proteinbanden wurde mit der Ladekontrolle ß-Actin normalisiert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgeführt

4.10 ELISA

Der ELISA ("Enzyme-linked Immunosorbent Assay") ist ein Immunassay, dessen Prinzip eine Antigen-Antikörper-Reaktion ist, bei dem ein Enzym als Marker verwendet wird [102, 103]. Hierbei bindet ein Antikörper, der kovalent an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden ist, mit seinem Paratop spezifisch an das Epitop des Antigens in der Probe. Unspezifische Bindungen anderer Antigene werden durch Waschen entfernt. Der Nachweis des zu untersuchenden Antigens erfolgt mit Hilfe eines Detektionsantikörpers, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet und zusätzlich mit einem Enzym als Marker versehen ist ("Sandwich"-Komplex). Durch die Reaktion mit einem spezifischen Substrat erfolgt ein Farbumschlag, der photometrisch gemessen werden kann. Auf diese Weise kann mit dieser Methode eine quantitative Bestimmung des zu untersuchenden Antigens durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Expression der phosphorylierten p38 MAP-Kinase untersucht (Surveyor™ IC human Phospho-p38α (T1807Y182) Immunassay; RND SYSTEMS). Hierfür wurden 3 x 10^5 Zellen der Zelllinien PCI1 und PCI13 über Nacht in T25 Zellkulturflaschen inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 200ng/ml PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate; SIGMA-ALDRICH, Seelze, D) für 15 min, 30 min, 45min und 1h. Die Proteinpräparation sowie die weitere Versuchsdurchführung erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Messung erfolgte in

einem Mikrotiterplatten-Photometer MRX (DYNATECH LABORATORIES; Denkendorf (D)) bei einer Wellenlänge von 450nm mit der Referenzwellenlänge von 570nm.

4.11 Proliferations-Assay (MTT-Test)

In lebenden Zellen wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) von mitochondrialen Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems zu einem violetten, wasserunlöslichem Formazanderivat reduziert. Da die Enzyme nur in vitalen Zellen aktiv sind, kann man durch diesen Test Rückschlüsse auf die Zellvitalität ziehen, da mit ansteigender Zellzahl die optische Dichte des Formazans proportional zunimmt [56, 57]. Die Menge des gebildeten Formazans wird bei einer Wellenlänge von 550-600nm photometrisch bestimmt, bei der das Substrat MTT nicht absorbiert.
HNSCC-Zellen wurden in der entsprechenden Zellzahl in eine 96-Well- Platte pipettiert (ca. 2500 Zellen in 70µl DMEM pro Well). Nach 24h wurden gegebenenfalls die 10µM SB203580 und/oder 200ng/ml PMA zugegeben und die Zellen 0-72h inkubiert. Für die enzymatische Reaktion wurde 5mg/ml MTT-Gebrauchslösung (SIGMA) pro Well nach Ende des jeweiligen Zeitpunktes zugegeben und nach 1h durch Zugabe von 100µl MTT Solubilization Lösung (SIGMA) abgestoppt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation im Dunkeln wurde die Absorption bei 560nm gegen die Referenzwellenlänge von 650nm in dem MRX Mikrotiterplatten-Photometer (DYNATECH LABORATORIES) gemessen.

4.12 Proteom Profiler Array (RND SYSTEMS)

Das Prinzip dieses Protein Arrays beruht auf die gleichzeitige Analyse verschiedener Proteine auf einer Nitrozellulosemembran. Auf dieser Nitrozellulosemembran sind Primärantiköper ("Capture Antibodies") gegen die zu untersuchenden Proteine und Kontroll-Antikörper als Doppelbestimmungen gespottet worden. Nach der Inkubation mit Zelllysaten wurden ungebundene Proteine durch Waschschritte entfernt. Dann erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen biotinyliertem Antikörper, mit anschließender Inkubation mit einem Anti-Biotin-AP (Alkalische Phosphatase)

Sekundärantikörper (Goat-Anti-Biotin-AP Antibody; SIGMA-ALDRICH (Seelze, D)). Die Proteine wurden mit einem AP Substrat ("AP-Conjugate Substrate Kit", BIORAD) visualisiert und erschienen in Abhängigkeit zur gebundenen Proteinmenge als dunkle Felder auf der Membran. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Imaginsystems Gel-Dok XR und der QuantityOne Software (beides BIORAD). Es wurde die Pixelintensität der einzelnen Felder auf der Nitrozellulosemembran gemessen und von der Pixelintensität des Membranhintergrundes abgezogen. Die Pixelintensität der Proteine war abhängig von der Menge an gebundenem Protein. Mit Hilfe der im Array Kit enthaltenen Schablone wurden die Koordinaten der einzelnen Proteine ermittelt.

In dieser Arbeit wurde mit diesem Array zum einen die relative Expression von phosphorylierten und unphosphorylierten MAPKs und anderen Serin/Threonin Kinasen (Human Phospho-MAPK Array Kit) und die Expression von pro-apoptotischen Proteinen (Human Apoptosis Array Kit) bestimmt. Es wurden 2 x 10^5 Zellen von PCI1 und/oder T47D pro T25 Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht in DMEM inkubiert. Nach der Stimulation mit 50µg/ml PolyI:C für 72h bzw. mit 200ng/ml PMA oder 10µM SB203580 für jeweils 15min, wurden die Zellen mit dem im Array Kit enthaltenden Lysispuffer versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (13000UpM, 10min) wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Proteinbestimmung mit dem BIORAD Protein Assay durchgeführt [100]. Die Proteine konnten bei -80°C gelagert werden. Die weitere Durchführung der Protein-Arrays erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der Anti- Biotin Sekundärantikörper (Goat-Anti-Biotin-AP Antibody; SIGMA-ALDRICH) wurde im Verhältnis 1: 10000 eingesetzt. Um die Arrays miteinander vergleichen zu können, wurde die Reaktion mit dem AP-Substrat wurde nach 10min abgestoppt.

5 Referenzen

1. Hoffman, H.T., et al., *The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1998. **124**(9): p. 951-62.

2. Decker, J. and J.C. Goldstein, *Risk factors in head and neck cancer.* N Engl J Med, 1982. **306**(19): p. 1151-5.

3. Copper, M.P., et al., *Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1995. **121**(2): p. 157-60.

4. Chen, R., L.M. Aaltonen, and A. Vaheri, *Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis.* Rev Med Virol, 2005. **15**(6): p. 351-63.

5. Tan, E.H., et al., *Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers.* Am J Clin Oncol, 1997. **20**(2): p. 146-50.

6. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.

7. Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay, *Global cancer statistics.* CA Cancer J Clin, 1999. **49**(1): p. 33-64, 1.

8. Pisani, P., et al., *Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990.* Int J Cancer, 1999. **83**(1): p. 18-29.

9. Chin, D., et al., *Head and neck cancer: past, present and future.* Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(7): p. 1111-8.

10. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors.* Science, 1987. **235**(4787): p. 442-7.

11. Pries, R., S. Nitsch, and B. Wollenberg, *Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma.* Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(9): p. 1195-203.

12. Hardisson, D., *Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma.* Eur Arch Otorhinolaryngol, 2003. **260**(9): p. 502-8.

13. Chin, D., et al., *Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis.* Br J Plast Surg, 2004. **57**(7): p. 595-602.

14. Grandis, J.R., et al., *Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4227-32.

15. Song, J.I. and J.R. Grandis, *STAT signaling in head and neck cancer.* Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2489-95.

16. Lee, T.L., et al., *Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas.* Mol Cancer Ther, 2006. **5**(1): p. 8-19.

17. Croker, B.A., et al., *SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo.* Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 540-5.

18. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops.* Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.

19. Young, M.R., *Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault.* Head Neck, 2006. **28**(5): p. 462-70.

20. Chen, Z., et al., *Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer.* Clin Cancer Res, 1999. **5**(6): p. 1369-79.

21. Young, P.R., et al., *Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site.* J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 12116-21.

22. Sparano, A., et al., *Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma.* Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. **131**(5): p. 573-6.

23. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade.* Faseb J, 1995. **9**(9): p. 726-35.

24. Widmann, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human.* Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 143-80.

25. Morrison, D.K. and R.J. Davis, *Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 91-118.

26. Pawson, T. and J.D. Scott, *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins.* Science, 1997. **278**(5346): p. 2075-80.

27. Turjanski, A.G., J.P. Vaque, and J.S. Gutkind, *MAP kinases and the control of nuclear events.* Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3240-53.

28. Hornberg, J.J., et al., *Control of MAPK signalling: from complexity to what really matters.* Oncogene, 2005. **24**(36): p. 5533-42.

29. Pimienta, G. and J. Pascual, *Canonical and alternative MAPK signaling.* Cell Cycle, 2007. **6**(21): p. 2628-32.

30. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer.* Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3279-90.

31. Kennedy, N.J. and R.J. Davis, *Role of JNK in tumor development.* Cell Cycle, 2003. **2**(3): p. 199-201.

32. Bulavin, D.V. and A.J. Fornace, Jr., *p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor.* Adv Cancer Res, 2004. **92**: p. 95-118.

33. Hagemann, C. and J.L. Blank, *The ups and downs of MEK kinase interactions.* Cell Signal, 2001. **13**(12): p. 863-75.

34. Eckert, R.L., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta.* J Invest Dermatol, 2003. **120**(5): p. 823-8.

35. Ono, K. and J. Han, *The p38 signal transduction pathway: activation and function.* Cell Signal, 2000. **12**(1): p. 1-13.

36. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway.* Cell Res, 2005. **15**(1): p. 11-8.

37. Kang, Y.J., et al., *Multiple activation mechanisms of p38alpha mitogen-activated protein kinase.* J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26225-34.

38. Bulavin, D.V., et al., *Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation.* Embo J, 1999. **18**(23): p. 6845-54.

39. Junttila, M.R., et al., *p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells.* Oncogene, 2007. **26**(36): p. 5267-79.

40. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.

41. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.* Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.

42. O'Neill, L.A., *How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know.* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 3-9.

43. Sen, G.C. and S.N. Sarkar, *Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3.* Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(1): p. 1-14.

44. Choe, J., M.S. Kelker, and I.A. Wilson, *Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain.* Science, 2005. **309**(5734): p. 581-5.

45. Liu, L., et al., *Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA.* Science, 2008. **320**(5874): p. 379-81.

46. Matsumoto, M. and T. Seya, *TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C).* Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(7): p. 805-12.

47. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.* Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.

48. Lee, H.K., et al., *Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14.* Immunity, 2006. **24**(2): p. 153-63.

49. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.* Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.

50. Salaun, B., et al., *TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells.* J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4894-901.

51. Paone, A., et al., *Toll-like Receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-{alpha} dependent mechanisms.* Carcinogenesis, 2008.

52. Pries, R., et al., *Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer.* Int J Mol Med, 2008. **21**(2): p. 209-15.

53. Raingeaud, J., et al., *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine.* J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7420-6.

54. McCoy, C.E., et al., *MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites.* Biochem J, 2005. **387**(Pt 2): p. 507-17.

55. Bellacosa, A., et al., *A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities.* Cancer Biol Ther, 2004. **3**(3): p. 268-75.

56. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.

57. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.* Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 474-82.

58. Raynal, P. and H.B. Pollard, *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins.* Biochim Biophys Acta, 1994. **1197**(1): p. 63-93.

59. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.* J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.

60. Favata, M.F., et al., *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.* J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18623-32.

61. Cuenda, A., et al., *SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1.* FEBS Lett, 1995. **364**(2): p. 229-33.

62. Kumar, S., et al., *Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(3): p. 825-31.

63. Leeman, R.J., V.W. Lui, and J.R. Grandis, *STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer.* Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(3): p. 231-41.

64. Zauberman, A., et al., *Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3.* Oncogene, 1999. **18**(26): p. 3886-93.

65. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis.* Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2474-88.

66. Bartek, J., et al., *Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies.* Oncogene, 1991. **6**(9): p. 1699-703.

67. Wang, Y. and C. Prives, *Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases.* Nature, 1995. **376**(6535): p. 88-91.

68. Sakaguchi, K., et al., *Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53.* Biochemistry, 1997. **36**(33): p. 10117-24.

69. Hao, M., et al., *Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo.* J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29380-5.

70. Jiang, Q., H. Wei, and Z. Tian, *Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway.* BMC Cancer, 2008. **8**: p. 12.

71. Lathers, D.M., N.J. Achille, and M.R. Young, *Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.* Hum Immunol, 2003. **64**(12): p. 1160-6.

72. Pries, R. and B. Wollenberg, *Cytokines in head and neck cancer.* Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(3): p. 141-6.

73. Kanazawa, T., et al., *Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells.* Eur Arch Otorhinolaryngol, 2007. **264**(7): p. 815-21.

74. Bancroft, C.C., et al., *Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(2): p. 435-42.

75. Xiao, Y.Q., et al., *Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta.* J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14884-93.

76. Ballif, B.A. and J. Blenis, *Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals.* Cell Growth Differ, 2001. **12**(8): p. 397-408.

77. Li, S.P., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1,2.* Cancer Res, 2003. **63**(13): p. 3473-7.

78. Liu, W.S. and C.A. Heckman, *The sevenfold way of PKC regulation.* Cell Signal, 1998. **10**(8): p. 529-42.

79. Goel, G., et al., *Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals.* Int J Toxicol, 2007. **26**(4): p. 279-88.

80. Brodie, C. and P.M. Blumberg, *Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta.* Apoptosis, 2003. **8**(1): p. 19-27.

81. Tosi, L., et al., *Akt, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase phosphorylation status in head and neck squamous cell carcinoma.* Head Neck, 2005. **27**(2): p. 130-7.

82. Chun, K.H., et al., *Implication of protein kinase B/Akt and Bcl-2/Bcl-XL suppression by the farnesyl transferase inhibitor SCH66336 in apoptosis induction in squamous carcinoma cells.* Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 4796-800.

83. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream.* Cell, 2007. **129**: p. 1261-1274.

84. Liao, Y. and M.C. Hung, *Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(19): p. 6836-48.

85. MacRae, T.H., *Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas.* Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(6): p. 899-913.

86. Gaestel, M., et al., *Protein kinases as small molecule inhibitor targets in inflammation.* Curr Med Chem, 2007. **14**(21): p. 2214-34.

87. Ahn, N.G., et al., *Pharmacologic inhibitors of MKK1 and MKK2.* Methods Enzymol, 2001. **332**: p. 417-31.

88. Squarize, C.H., et al., *Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma.* Neoplasia, 2006. **8**(9): p. 733-46.

89. Liu, L., K.M. McBride, and N.C. Reich, *STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8150-5.

90. Turkson, J., et al., *Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7519-28.

91. Thompson, T., et al., *Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53015-22.

92. Laplanche, A., et al., *Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer: a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC).* Breast Cancer Res Treat, 2000. **64**(2): p. 189-91.

93. Salaun, B., P. Romero, and S. Lebecque, *Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis.* Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3311-8.

94. Kalyankrishna, S. and J.R. Grandis, *Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer.* J Clin Oncol, 2006. **24**(17): p. 2666-72.

95. Frenzel, H., et al., *Toll-like receptor interference in myeloid dendritic cells through head and neck cancer.* Anticancer Res, 2006. **26**(6B): p. 4409-13.

96. Xie, L., et al., *Head and neck cancer triggers the internalization of TLR3 in natural killer cells.* Int J Mol Med, 2007. **20**(4): p. 493-9.

97. Bernstein, E., A.M. Denli, and G.J. Hannon, *The rest is silence.* Rna, 2001. **7**(11): p. 1509-21.

98. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.* Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-6.

99. Tuschl, T., et al., *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro.* Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3191-7.

100. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

101. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

102. Engvall, E. and P. Perlman, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.* Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.

103. Avrameas, S. and B. Guilbert, *[Enzymo-immunological determination of proteins with the aid of immunoadsorbants and enzyme-labelled antigens]*. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 1971. **273**(25): p. 2705-7.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
kDa	Kilo Dalton
DMEM	"Dulbecco´s modified eagle medium"
DMSO	Dimethylsulfonsäureoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	"Epidermal growth factor receptor"
ERK1/2	"extracellular signal related kinase"
et al.	"et alii", und andere
FACS	"Fluorescence activated cell sorter"
FCS	"Fetal calf serum"
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GFP	"Green fluorescent protein"
GM-CSF	"Granulocyte macrophage – colony stimulating factor"
h	Stunde

HNSCC	"Head and neck squamous cell carcinoma"
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JNK1/2	"c-Jun N-terminal kinase"
MAPK	"Mitogen activated protein kinase"
MEK	MAP/ERK-Kinase
MDA-5	"Melanoma differentiation associated gene 5"
min	Minute
MSK	"Mitogen and stress-activated protein kinase"
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5- Diphenyl-Tetrazoliumbromid
NFκB	"Nuclear factor κB"
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	"Phosphat-buffered saline"
PCR	"Polymerase chain reaction"
PE	Phycoerythrin
PKB, PKC	Proteinkinase B, Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PolyI:C	Poly Ionsinic Acid
RIG-1	"Retinoic acid reducable gene 1"
RIPA-Puffer	"Radioimmunoprecipation assay"-Puffer
RNA	"Desoxyribonucleic acic"
mRNA	"messenger RNA"

siRNA	"short interference RNA"
RSK	"p90 ribosomal S6 kinase"
SB203580	2,4,5-Triaryl Imidazol
SDS	"Sodium-Dodecylsulfate"
SOCS	"Suppressor of cytokine signalling"
STAT3	"Signal transducer and regulator of transcription"
TBS	"Tris-buffered Saline"
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TGF	"Transforming growth factor"
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis-(2-aminophenylthio)butadiene

6.2 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Christine Riebe
Geburtsdatum:	16. Oktober 1978
Geburtsort:	Hannover
Familienstand:	ledig

WERDEGANG

seit 04/2005:	**Promotion** Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Lübeck; Universitätsklinikum-Schleswig-Holstein (Prof. Dr. Barbara Wollenberg)
01/2004 – 11/2004:	**Diplomarbeit** Institut für Mikrobiologie und Genetik; Georg-August-Universität Göttingen (Prof. Dr. Gerhard Braus)
10/1999 – 11/2004:	**Studium der Biologie** Georg-August-Universität Göttingen Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie, Immunologie Abschluss: Diplom
08/1998 – 06/1999:	**Auslandsaufenthalt in Winchester, Großbritannien** Arbeit als Au-pair und Besuch des Southampton City College
08/1985 – 06/1998:	**Schulbildung** Grundschule und Orientierungsstufe Gronau Gymnasium Alfeld Abschluss: Abitur

VERÖFFENTLICHUNG

Riebe, C., Pries R., Kemkers A., Wollenberg B., *Increased cytokine secretion in head and neck cancer upon p38 mitogen-activated protein kinase activation.* Int J Mol Med, 2007. **20**(6): p. 883-7.

6.3 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Barbara Wollenberg für die Überlassung des Promotionsthemas und für ihre vielen Anregungen und ihr großes Interesse an meiner Promotion.
Herrn Prof. Enno Hartmann danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Dissertation und für das sehr große Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.
Ein sehr großes Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Ralph Pries für die gute Betreuung während der gesamten Zeit meiner Promotion.
Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Wollenberg bedanke ich mich sehr herzlich für die nette Zusammenarbeit. Ein sehr großer Dank gilt hier Sandra Wulff, Christina Crusius, Birgit Hüsing, Sabrina Jeske und Anne-Kathrin Schott. Ein herzlicher Dank gilt auch Brigitte Wollmann, Ewelina Szymanski und Britta Dannenberg für die technische Unterstützung.
Zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir durch die Finanzierung des Studiums diesen Weg ermöglicht haben. Meinem Freund Sven danke ich ganz besonders für seine moralische Unterstützung.

6.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat darüber hinaus noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.