

Fakultät für Medizin an der Technischen Universität München

Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
des Klinikums rechts der Isar

**Der Aurora-Kinase A Phe31-Ile-Polymorphismus als
mögliches Zielmolekül zur Verbesserung der
Strahlentherapie bei Plattenepithelkarzinomen des
Kopf-Hals-Bereichs**

Alexander Baumann

Vollständiger Ausdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. A. C. Pickhard
2. Prof. Dr. S. E. Combs

Die Dissertation wurde am 17.02.2016 bei der
Technischen Universität München eingereicht und durch die
Fakultät für Medizin am 07.12.2016 angenommen.

Meiner Familie und meinen Freunden

1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Einleitung	10
2.1 Problemstellung	10
2.2 Grundlagen des Plattenepithelkarzinoms.....	11
2.2.1 Epidemiologie	11
2.2.2 Klassifikation.....	12
2.2.3 Ätiologie und Risikofaktoren	15
2.2.4 Klinisches Bild	16
2.2.5 Molekularpathologie	17
2.2.6 Standardtherapie	19
2.2.7 Prognose	21
2.3 Aurora-Kinasen.....	23
2.3.1 Aurora-Kinase A	25
2.3.2 Aurora-Kinase B	27
2.4 Aurora-Kinase-Inhibition	29
2.5 Zielsetzung.....	30
3. Material und Methoden	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Zelllinien	31
3.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur	31
3.1.3 Inhibitoren	32
3.1.4 Primärantikörper (IHC/IF)	32
3.1.5 Primärantikörper (WB).....	33
3.1.6 Sekundärantikörper	33
3.1.7 Reagenzien und Chemikalien.....	34
3.1.8 Gemischte Puffer, Reagenzien und Gele	36
3.1.9 Geräte.....	37
3.1.11 Verbrauchsmaterialien.....	39
3.1.12 Computerprogramme	40
3.2 Methoden.....	41
3.2.1.1 Studienkollektiv.....	41
3.2.1.2 Immunhistochemische Färbung	42
3.2.2 Zellkultur	43
3.2.3 Bestrahlung	44
3.2.4 Crystal-Violett Proliferations-Assay	45
3.2.5 Immunfluoreszenz	47

3.2.6 Nachweis des AurkA-Polymorphismus.....	47
3.2.7 Proteinisolierung.....	50
3.2.8 Bradford-Assay.....	50
3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	51
3.2.10 Western-Blot.....	52
3.2.11 Immundetektion.....	53
3.2.12 Fixierung der Zellen für FACS und FISH.....	53
3.2.13 Durchflusszytometrie (FACS).....	54
3.2.14 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	54
3.2.15 Statistische Auswertung.....	56
4. Ergebnisse.....	57
4.1 Charakterisierung des Kollektivs.....	57
4.2 Nachweis AurkA-Polymorphismus, Immunhistochemie.....	58
4.3 AurkA-Polymorphismus.....	67
4.4 Strahlenkinetik.....	68
4.5 Konzentrationskinetik.....	70
4.6 Proliferationsanalysen.....	74
4.7 Durchflusszytometrie.....	82
4.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	83
4.9 Western Blot-Analysen.....	86
5. Diskussion.....	87
5.1 Diskussion der Methoden.....	88
5.2 Einfluss des AurkA-Polymorphismus auf das Therapieansprechen.....	88
5.3 Einfluss des AurkA-Polymorphismus auf eine Strahlensensibilisierung.....	89
5.4 Zusammenhang zwischen Aurora-Kinasen und Aneuploidie.....	91
5.5 Verknüpfung der Aurora-Kinasen mit Survivin und p-Akt Ser 473.....	92
6. Zusammenfassung.....	95
7. Literaturverzeichnis.....	96
8. Tabellenverzeichnis.....	103
9. Abbildungsverzeichnis.....	105
10. Danksagung.....	107

1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
%	Prozent
<, >	kleiner, größer
≤, ≥	kleiner gleich, größer gleich
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Akt	Proteinkinase B
APS	Adenosinphosphosulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AurkA = STK15	Aurora-Kinase A
AurkB	Aurora-Kinase B
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BTAK	breast tumor amplified kinase
CA	Kalifornien
ca.	zirka
CDK1	Cyclin-abhängige Kinase 1
Cis	Carcinoma in situ
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cq	Chi-Quadrat-Test

Abkürzung	Erklärung
CPC	Chromosomaler Passenger Komplex
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	phosphate buffered saline
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ef	exakter Test nach Fisher
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	extracellular-signal-regulated kinases 1/2
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin Embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
for	forward
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
Gy	Gray
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Abkürzung	Erklärung
HPV	Humanes Papilloma Virus
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBE	Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
Ile	Isoleucin
INCENP	inner centromere protein
IRS	Immunreaktiver Score
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
m	männlich
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mg	Milligramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar

Abkürzung	Erklärung
Nm	Nanometer
Nr.	Nummer
p-Akt	phosphorylierte Proteinkinase B
PCR	Polymerase Chain Reaction
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PM	Polymorphismus
Pmol	pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Percentage points
PP1 γ	Proteinphosphatase 1 γ
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	reverse
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Rpm	Revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sek.	Sekunden
Ser	Serin
SI	Staining intensity
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TPX2	target protein for Xenopus kinesin-like protein 2
TU	Technische Universität
TX	Texas
Tyr	Tyrosin

Abkürzung	Erklärung
U	Units
UICC	International Union against Cancer
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
w	weiblich
WB	Western Blot

2. Einleitung

2.1 Problemstellung

Das mittlere 5-Jahres-Überleben von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) liegt bei ca. 50 % (Bose, Brockton et al. 2013) und mindestens 50 % der Patienten ab Tumorstadium III entwickeln in den ersten 2 Jahren nach der Therapie ein Rezidiv (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Diese beiden Aussagen spiegeln die äußerst schlechte Prognose des HNSCC sehr eindrücklich wider. Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich ist vom achthäufigsten Tumor im Jahr 2000 (Ragin, Modugno et al. 2007) zur sechsthäufigsten Entität im Jahr 2013 (Bose, Brockton et al. 2013) aufgestiegen. Zweifelsohne verringert die Erkrankung an einem HNSCC die Lebensqualität beträchtlich. Besonders betroffen sind dabei unerlässliche Basisfunktionen wie Atmen, Sprechen, Speichelbildung und Schlucken. Überdies sind die Patienten durch die ästhetische Problematik nach der Operation mit großem Resektionsausmaß belastet (Silveira, Goncalves et al. 2010).

Die ersten Therapieversuche dieser Tumoren zu Beginn des 20. Jahrhunderts basierten auf einem absolut anatomischen Vorgehen bestehend aus der chirurgischen Resektion und der Strahlentherapie. Erst kürzlich wurden immer mehr entscheidende Biomarker und Signaltransduktionswege entdeckt, die mittlerweile als Moleküle für eine gezieltere Therapie des HNSCC erforscht werden. Als Beispiel sei der in der Klinik bereits zusätzlich zur Standardtherapie verwendete monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix®) erwähnt, der sich gegen den EGF-Rezeptor richtet. Diese additive Therapiemöglichkeit ist ein großer Schritt zur individuellen Krebstherapie und verbessert das Gesamtüberleben signifikant (Bose, Brockton et al. 2013).

Die Aurora-Kinasen (Aurk) stellen im Hinblick auf eine Verbesserung der Prognose eine ebenso wichtige Möglichkeit dar, Teil dieser biologischen Ära und somit Bestandteil der zunehmend klinisch wichtigeren Targeted-Therapie zu werden. Bald nach deren Entdeckung 1995 wurde die zentrale Rolle dieser Enzyme in der Mitose beschrieben (Kollareddy, Zheleva et al. 2012). Sowohl frühere als auch aktuelle Studien konnten zeigen, dass die Aurora-Kinasen in mehreren unterschiedlichen Tumorentitäten überexprimiert sind (Carmena and Earnshaw 2003). Unsere

Arbeitsgruppe konnte dies bereits 2006 (Reiter, Gais et al. 2006) und erneut 2014 für das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich zeigen (Pickhard, Siegl et al. 2014). Ferner ist bekannt, dass der AurkA/STK15 Phe31Ile Polymorphismus für das Auftreten eines progressiven Verhaltens beim Ösophaguskarzinom verantwortlich ist (Miao, Sun et al. 2004).

2.2 Grundlagen des Plattenepithelkarzinoms

Die Malignome im Kopf-Hals-Bereich lassen sich ausgehend von epithelialen, mesenchymalen und lymphatischen Geweben in mehrere verschiedene Tumorentitäten einteilen. Die Mehrheit mit über 95 % bildet jedoch das Plattenepithelkarzinom, das in der vorrangig englischsprachigen Fachliteratur und auch in dieser Arbeit als HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) abgekürzt wird. Die Weltgesundheitsorganisation WHO definiert diese Tumorart als malignen epithelialen Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung, der durch Hornbildung und das Auftreten von Interzellularbrücken charakterisiert ist (Mast, Zimmermann et al. 2009).

Das Plattenepithelkarzinom kann dem Namen nach in allen mit diesem Epithel ausgekleideten Höhlen des Kopf-Hals-Bereiches vorkommen. Somit umfasst der Überbegriff HNSCC eine Vielzahl von Tumoren im oberen Aerodigestivtrakt. Dazu gehören die Mundhöhle, die Lippe, der Oro-, Naso- und Hypopharynx, der Larynx sowie die Nase, die Nasennebenhöhlen und die Speicheldrüsen (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Alle diese Tumoren ähneln sich in ihren Risikofaktoren, ihrer Epidemiologie, der Behandlung und der Prognose.

2.2.1 Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs ist das sechsthäufigste Malignom weltweit (Bose, Brockton et al. 2013). In der Bundesrepublik Deutschland beträgt der relative Anteil der Kopf-Hals-Malignome insgesamt 4,8 %, wobei Männer mit 7,3 % deutlich vor Frauen mit nur 2,1 % liegen. Dieser Trend lässt sich mit dem bei Männern deutlich häufiger beobachteten Konsum von Tabak und Alkohol erklären. In absoluten

Zahlen bedeutet dies, dass von 100.000 Einwohnern pro Jahr 25,1 Männer, aber lediglich 5,2 Frauen an diesem Tumor neu erkranken.

Bei Männern ist mit 26 % der Larynx am häufigsten betroffen vor dem Hypo- und dem Oropharynx. Frauen leiden am häufigsten mit je ca. 19 % an Zungen- und Oropharynxkarzinomen. Das mittlere Erkrankungsalter für Kopf-Hals-Malignome liegt bei zirka 60 Jahren, wobei dies auch unter den einzelnen Tumorlokalisationen variieren kann (Mast, Zimmermann et al. 2009).

Etwa zwei Drittel der Patienten stellen sich erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium vor, bei dem die Lymphknoten bereits befallen aber noch keine Fernmetastasen aufgetreten sind (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Die Rate der Fernmetastasierung bei Erstdiagnose ist äußerst gering und beträgt ca. 2,3 %. Zudem steigt die Inzidenz dieser Erkrankung stetig an und weist auch entscheidende Unterschiede in der geographischen Lokalisation der Patienten auf. In westlichen Ländern wie den USA oder Europa treten Kopf-Hals-Malignome mit einem relativen Anteil von 3 % deutlich weniger häufig auf. Im Süden Zentralasiens hingegen beträgt die Inzidenz der Kopf-Hals-Tumoren bereits 17 % und unterscheidet sich somit deutlich von besser entwickelten Ländern. Für das HNSCC im Mundhöhlenbereich wird hier beispielsweise eine Mortalitätsrate von 14,3 % für Männer und 15,7 % für Frauen angegeben. Es ist jedoch wichtig, diese Zahlen kritisch zu hinterfragen, da die Mortalität von vielen Faktoren abhängig ist. Die Tumorlokalisation und das Tumorstadium, sowie die Ausdehnung und der Befall der Lymphknoten spielen dabei eine große Rolle (Mast, Zimmermann et al. 2009).

2.2.2 Klassifikation

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs wird genauso wie viele andere Tumoren nach der TNM-Klassifikation der UICC (International Union against Cancer) eingeteilt. Diese spezielle Terminologie erleichtert das Erstellen von Statistiken, die interdisziplinäre Kommunikation und die Therapieentscheidungen. Im Folgenden werden die grundlegenden Klassifikationen tabellarisch dargestellt (modifiziert nach Wittekind, 2010). Die pTNM-Klassifikation beschreibt die pathologische Einteilung des Resektats anhand der histologischen Untersuchung durch den Pathologen.

Primärtumor – pT	
pTx	histologisch nicht beurteilbar
pT0	kein histologischer Anhalt für einen Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1-T4	Größe und/oder Ausdehnung des Primärtumors nehmen zu

Tabelle 1: pT-Klassifikation der UICC

Regionale Lymphknoten - pN	
pNx	Lymphknoten histologisch nicht beurteilbar
pT0	kein histologischer Anhalt für Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten ≤ 3 cm
pN2a	Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten > 3 cm aber < 6 cm
pN2b	Metastasen in mehreren ipsilateralen Lymphknoten ≤ 6 cm
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten ≤ 6 cm
pN3	alle Lymphknotenmetastasen > 6 cm

Tabelle 2: pN-Klassifikation der UICC

Fernmetastase(n) - pM	
pMx	Fernmetastase(n) histologisch nicht beurteilbar
pM0	kein histologischer Anhalt für Fernmetastase(n)
pM1	Fernmetastase(n) histologisch gesichert

Tabelle 3: pM-Klassifikation der UICC

Zusätzlich kann der resezierte Tumor mittels des sogenannten histopathologischen Grading klassifiziert werden. Dieses Grading gibt Auskunft über die Differenzierung des Primärtumors und somit auch über dessen Malignitätsgrad.

Histopathologisches Grading - G	
Gx	Grad der Differenzierung kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Tabelle 4: Histopathologisches Grading von HNSCC

Die klassische TNM-Klassifikation berücksichtigt in keiner Weise die durchgeführte Therapie. Aus diesem Grund wird das Verbleiben eines Residualtumors mittels der R-Klassifikation beschrieben. Sie sollte jedoch nur auf den Primärtumor angewendet werden. Die folgende Einteilung ist entscheidend für das weitere therapeutische Vorgehen und kann durchaus zuverlässige Aussagen über die Prognose geben.

Residualtumor - R	
Rx	Auftreten eines Residualtumors nicht beurteilbar
R0	kein Residualtumor
R1	mikroskopischer Residualtumor
R2	makroskopischer Residualtumor

Tabelle 5: R-Klassifikation der UICC

Unabhängig von diesen allgemeinen Abkürzungen stehen noch weitere Symbole zur Verfügung, die besondere Fälle kennzeichnen sollen. Ein nachgestelltes „m“ zeigt mehrere Primärtumoren in einem anatomischen Bezirk an und das Präfix „y“ kennzeichnet eine Klassifikation nach Beginn oder während einer multimodalen Therapie. Ein „r“ vor der TNM-Klassifikation beschreibt Rezidivtumoren nach einem krankheitsfreien Intervall und ein „a“ zeigt eine Klassifikation nach einer Autopsie an. Unter Berücksichtigung der pTNM-Klassifikation teilt die UICC die Plattenepithelkarzinome in verschiedene Stadien ein.

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2 T3	N0, N1 N1	M0
IV-A	T1, T2, T3 T4a	N2 N0, N1, N2	M0
IV-B	jedes T T4b	N3 jedes N	M0
IV-C	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 6: Stadieneinteilung von HNSCC

Es ist allerdings wichtig, nicht nur auf diese eher formale Klassifikation zu achten. Das klinische Bild des Patienten und die Einteilung des Tumors mittels der TNM-Klassifikation nach der histopathologischen Untersuchung bilden die beste Grundlage für die weiteren Behandlungsentscheidungen.

2.2.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ursache für die Entstehung eines Kopf-Hals-Malignoms ist noch nicht im Einzelnen geklärt. Es scheint jedoch gesichert zu sein, dass Rauchen und der Konsum von Alkohol als die Hauptrisikofaktoren gelten. Raucher haben ein 10 Mal höheres Risiko an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken und etwa 80 % der Karzinome lassen sich auf das Rauchen zurückführen (Bose, Brockton et al. 2013).

Zudem wurde nachgewiesen, dass Alkohol und Tabak kombiniert einen multiplikativen Effekt auf die Entstehung dieser Malignome haben. Das in Südostasien sehr verbreitete Kauen von Betelnüssen wird ebenso als Risikofaktor für HNSCC angesehen. Im Gegensatz dazu minimiert der Verzehr von Gemüse und Obst das Risiko einer Karzinomentstehung. Des Weiteren wurde eine hereditäre Komponente nachgewiesen, die das Auftreten von HNSCC bei speziellen Syndromen wie der Fanconi-Anämie, dem Li-Fraumeni-Syndrom oder dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom begünstigt (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

Obwohl der weltweite Tabakkonsum in den letzten Jahrzehnten durch zahlreiche Kampagnen leicht reduziert werden konnte, stellt das Rauchen in den westlichen Ländern trotzdem noch den dominierenden Risikofaktor dar. Im Alter zwischen 40 und 55 Jahren gilt jedoch die Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV) als neuer wichtiger Risikofaktor speziell für das oropharyngeale Plattenepithelkarzinom, das durchaus mit den Veränderungen im sexuellen Verhalten der Patienten in Verbindung gebracht werden kann (Bose, Brockton et al. 2013). Seit der Entdeckung dieser Viren wurden mehr als 100 verschiedene Typen identifiziert. Ein Großteil ist mit der Entstehung von Malignomen im Genitalbereich und im Kopf-Hals-Bereich assoziiert worden. Dazu gehören vor allem die HPV-Typen 16 und 18. Es handelt sich um ein zirkuläres Doppelstrang DNA-Virus, das die Onkogene E6 und E7 enthält. Dies sind Proteine, die anhand der Inaktivierung von p53 und des Retinoblastom-Proteins die Karzinogenese induzieren (Leemans, Braakhuis et al. 2011). Die IARC (International Agency for Research on Cancer) schätzt, dass mehr als 60 % der auftretenden Krebsfälle im Kopf-Hals-Bereich allein durch die Reduktion jeglichen Tabakkonsums und des Verzehrs von Alkohol vermieden werden könnten (Döbrössy 2005).

2.2.4 Klinisches Bild

Die Patienten stellen sich meist mit neu aufgetretenen Lymphknotenschwellungen, Schleimhautveränderungen, Gefühls- und Funktionsstörungen der Kopf-Halsmuskulatur oder einer Dysphagie vor. Neben der genauen Anamnese und der allgemein ärztlichen Untersuchung sollte bei Auftreten der oben angeführten Symptome eine spezielle HNO-ärztliche Untersuchung der betroffenen Region durchgeführt werden. Dazu gehört auch die palpatorische Untersuchung der Verschieblichkeit und Konsistenz aller Schwellungen, der Knochenkonturen und der Nervenaustrittspunkte (Mast, Zimmermann et al. 2009).

Zudem gehören ein Röntgen/CT-Thorax, eine Endoskopie, eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Halses und mindestens eine Sonographie des Oberbauchs zu den Standarduntersuchungen beim Staging des Tumors. Abgesehen von Larynx- und Hypopharynxkarzinomen ist das MRT bei den anderen Tumorlokalisationen zu bevorzugen. Die Rolle des FDG-PET-CT beim Tumorstaging wird momentan in

einigen klinischen Studien ermittelt (Gregoire, Lefebvre et al. 2010). Die Sonographie gilt als äußerst wichtiger Verlaufsparemeter. Obwohl der Ultraschall sehr vom Untersucher abhängig ist, kann eine Gefäßwandinfiltration eines Rezidivs oder eine erneute Lymphadenopathie mit hoher Aussagekraft beurteilt werden (Mast, Zimmermann et al. 2009).

In der Mundhöhle ist die Befundung der Schleimhaut unerlässlich und der Zahnstatus ist zu erheben. In bis zu 0,5 % der Fälle finden sich orale Läsionen, die als orale Leukoplakien bezeichnet werden und als Präkanzerosen eingestuft werden müssen. Dabei handelt es sich um weiße nicht abwischbare Beläge der Mundschleimhaut. Die Transformationsrate in ein invasives Karzinom liegt bei ca. 1-2 % pro Jahr und ist hauptsächlich vom Geschlecht, der Größe der Läsion und dem Grad der Dysplasie abhängig. Es gibt keinen wissenschaftlichen Beweis, dass die Therapie dieser Läsionen das Entstehen eines HNSCC verhindern kann. Deshalb erfolgt lediglich die aktive Beobachtung der oralen Leukoplakien ohne spezifische Therapie (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Bei Stimmstörungen und Schluckbeschwerden gilt es den Larynx-Pharynx-Bereich zu inspizieren, da diese Tumoren durch ihre Größenzunahme mit der Zeit auch die Atemwege verlegen können. Bei den geschilderten Symptomen, mit denen sich die meisten Patienten erst sehr spät vorstellen, hat der Tumor bereits eine Größe erreicht, was den unverzüglichen Therapiebeginn in einem spezialisierten Tumorzentrum notwendig macht (Mast, Zimmermann et al. 2009).

2.2.5 Molekularpathologie

Die Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich beruht auf einer Vielzahl molekularer Veränderungen des Gewebes. Dies geschieht mittels der Aktivierung von Onkogenen und der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die Folge ist eine genetische Instabilität (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

Bereits 1996 entwickelten Califano et al. ein heute noch anerkanntes Modell zur Entstehung eines HNSCC:



Abbildung 1: Modell zur Entstehung eines HNSCC; modifiziert nach (Califano, van der Riet et al. 1996)

Genetische Veränderungen wie eine Cyclin-D1 Amplifikation, 3p-Deletion, Aneuploidie oder TP53-Mutation können diese histopathologische Progression negativ beeinflussen (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Auch der Verlust der Region 9p21 findet sich in 70-80 % der Fälle, was zu einer Inaktivierung von p16 und somit zu einem Zellzyklusarrest führt (Perez-Ordenez, Beauchemin et al. 2006).

Man geht davon aus, dass neben den makroskopisch sichtbaren Leukoplakien auch nicht sichtbare Veränderungen im Gewebe auftreten. Dazu wurde 1953 die Theorie der sogenannten „Felder-Karzinogenese“ vorgestellt (Slaughter, Southwick et al. 1953). Hierbei handelt es sich um makroskopisch normal aussehende aber durch chromosomale Veränderungen histopathologisch auffällige Felder, die sich oft an Exzisionsrändern befinden. Da diese Felder für den Operateur nicht sichtbar sind, werden diese unzureichend entfernt und führen auf diesem Weg zu einem Rezidiv (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Ferner müssen auf molekularer Ebene der Tumorgenese auch einige wichtige Signalkaskaden erwähnt werden wie beispielsweise der EGF-Rezeptor-Signalweg oder der Phosphoinositid-3-Kinase-Proteinkinase-B-mammalian-Target-of-Rapamycin-Signalweg (PI3K/Akt/mTOR). Alle diese Signalwege stehen über Quervernetzungen miteinander in Verbindung und beeinflussen sich bei der Inhibition einzelner Zielstrukturen untereinander (Bose, Brockton et al. 2013).

Die HPV-Infektion als Ursache für die Karzinomentstehung ist nicht außer Acht zu lassen, da auch in diesem Fall molekulare Mechanismen beteiligt sind.

Folgende Darstellung (Leemans, Braakhuis et al. 2011) verdeutlicht die prozentuale Häufigkeitsverteilung von HPV im HNSCC:

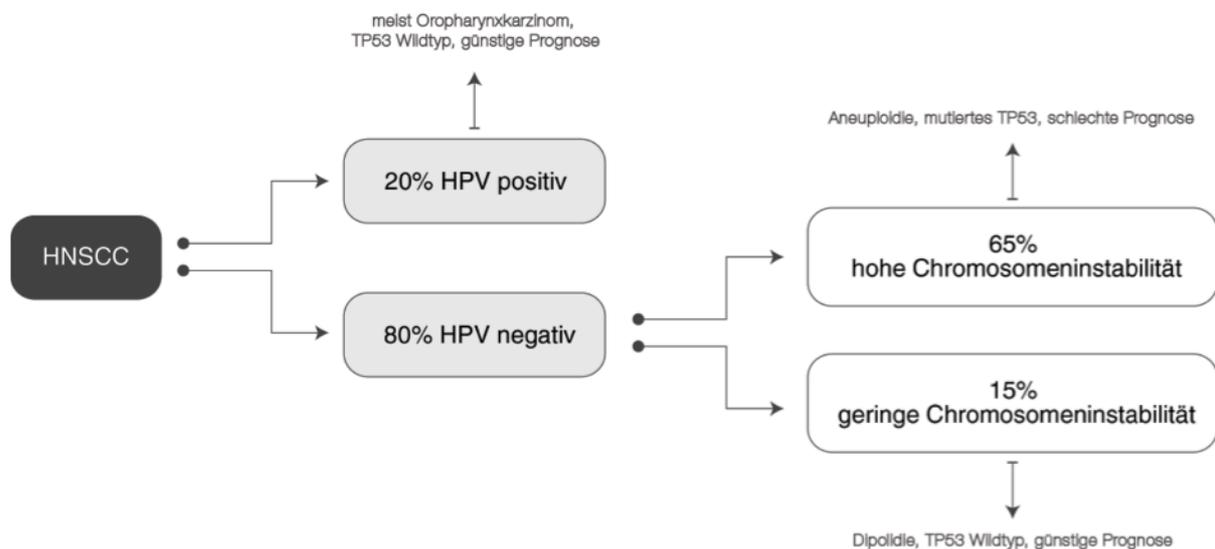


Abbildung 2: prozentuale Häufigkeitsverteilung von HPV im HNSCC; modifiziert nach (Leemans, Braakhuis et al. 2011)

Das Humane Papilloma Virus trägt die drei Onkogene E5, E6 und E7 in sich. E5 moduliert die Expression des EGF-Rezeptors, E6 und E7 inhibieren p53 und das Retinoblastom-Protein. Somit scheint der HPV-Status des Patienten ebenso in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle zu spielen.

2.2.6 Standardtherapie

Die Behandlung eines Kopf-Hals-Malignoms sollte auf einem interdisziplinären Behandlungsplan basieren (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Die Therapieentscheidung ist von mehreren Faktoren abhängig, unter anderem von der Ausdehnung und der Lokalisation des Primärtumors (Gregoire, Lefebvre et al. 2010). Grundsätzlich stehen für die Therapie eines HNSCC drei Modalitäten zu Verfügung: Chirurgische Resektion, Radiotherapie und Chemotherapie (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

Nur etwa ein Drittel der Patienten stellt sich in den frühen Tumorstadien I und II vor (Leemans, Braakhuis et al. 2011). Jene Patienten werden entweder mit der

chirurgischen Resektion oder einer Radiotherapie behandelt, womit der lokal begrenzte Tumor gut beherrschbar ist. Die Zugabe von Cetuximab, einem monoklonalen Antikörper gegen den EGF-Rezeptor oder auch einer Platin basierten Chemotherapie zur Bestrahlung gilt als mögliche Option zur Verbesserung des Gesamtüberlebens (Gregoire, Lefebvre et al. 2010). Meist wird die Operation bevorzugt, da die teilweise sehr unangenehmen Nebenwirkungen der Bestrahlung vermieden werden können. Dazu zählen die Mucositis, die Hypersekretion, die Dysphagie und Geschmacksstörungen. Oftmals werden unterstützende Maßnahmen wie die enterale Ernährung, Hautpflege oder Schmerztherapie nötig. Typischerweise erfolgt die Radiotherapie perkutan in täglichen Dosen von 2 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 70 Gy verteilt auf insgesamt 7 Wochen. Beim frühen Larynxkarzinom beispielsweise zeigt auch die zweimalige Bestrahlung mit 25 Gy gute Effekte ohne ein erhöhtes Nebenwirkungsspektrum (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

Die restlichen zwei Drittel der Patienten mit den Tumorstadien III und IV erhalten wenn möglich eine chirurgische Intervention. Die immer besser werdenden chirurgischen Techniken lassen den Anspruch auf gute rekonstruktive Ergebnisse nach großen Resektionen (Gregoire, Lefebvre et al. 2010) ebenso wie gute funktionelle Ergebnisse durch bestmöglichen Organerhalt (Argiris, Karamouzis et al. 2008) größer werden. Patienten mit einem resektablen Tumor werden neben der Resektion mit einer kombinierten Radiotherapie behandelt. Bei R1 oder R2-Resektion oder einem extrakapsulären Wachstum der Lymphknotenmetastasen muss eine adjuvante Radiochemotherapie erfolgen.

Das therapeutische Ziel sollte stets der Organerhalt und die R0-Resektion sein (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Aus diesem Grund kann eine Neck Dissection das Auftreten von Rezidiven oder weiteren Metastasen verhindern. Bei diesem Eingriff handelt es sich um die operative Entfernung der Halslymphknoten und der dazugehörigen Lymphbahnen. Abhängig vom Befall können auch Teile der Halsmuskulatur (Musculus sternocleidomastoideus, Musculus omohyoideus), große Gefäße wie die Vena jugularis interna, Nervengeflechte wie der Plexus cervicalis oder der N. accessorius oder befallene Speicheldrüsen (Glandula submandibularis, Glandula sublingualis) mitreseziert werden. Bei nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen gehört die Neck Dissection zum Standardtherapieschema, während bei klinisch unauffälligen

Befunden am Hals die selektive Neck Dissection angeboten wird. Im Laufe der Zeit wurden mehrere modifizierte Operationstechniken entwickelt, die das unnötige Resektionsausmaß der radikalen Neck Dissection vermindern sollten (Mast, Zimmermann et al. 2009).

Die Rolle der Induktionschemotherapie zum Organerhalt bei Larynxkarzinom oder primär nicht resektablen Tumoren vor der Operation ist noch nicht ganz geklärt und zählt deshalb noch nicht zum Therapiestandard. Die Kombination aus einem Taxan und einem Platin-Präparat scheint jedoch besser zu wirken als die bisherige Kombination Cisplatin plus 5-Fluouracil (Gregoire, Lefebvre et al. 2010).

Sollte der Tumor als nicht resektabel eingeschätzt werden, bleibt als Standardbehandlung die alleinige Radiochemotherapie (Gregoire, Lefebvre et al. 2010).

Die alleinige Chemotherapie bestehend aus Platin plus 5-Fluouracil oder plus Cetuximab wird lediglich in der palliativen Situation eingesetzt (Gregoire, Lefebvre et al. 2010).

Das Ziel der Forschung im Moment besteht in der Verbesserung der neuen Biologika-Therapien. Es wird versucht die zielgerichtete individuelle Therapie (Targeted Therapy) für das Kopf-Hals-Malignom in der Klinik zu etablieren. Die Integration des HPV-Status, der EGF-Rezeptor-Überexpression oder der TP53-Mutation in die Therapie sind dabei mit Sicherheit wichtige Meilensteine in dieser neuen Behandlungsmodalität (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Zusammenfassend sollte angemerkt werden, dass die Therapie des HNSCC zu schweren funktionellen und ästhetischen Defekten führen kann. Diese Störungen ziehen durchaus auch soziale und - nicht zu vergessen - psychische Störungen nach sich (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

2.2.7 Prognose

Die Prognose des Plattenepithelkarzinoms ist stark abhängig von der Lokalisation des Primärtumors, der Stadieneinteilung nach der gängigen TNM-Klassifikation und vom Grading des Malignoms. Außerdem spielt eine eventuell aufgetretene Fernmetastasierung eine wichtige Rolle, da die primär systemische Metastasierung das mittlere Überleben auf unter ein Jahr senkt (Mast, Zimmermann et al. 2009). Am

häufigsten betroffen von einer Infiltration durch Fernmetastasen ist die Lunge vor den mediastinalen Lymphknoten, der Leber und den Knochen (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

Bis in das Jahr 2013 hat sich die Prognose des HNSCC noch nicht wesentlich verändert. Abhängig von der Tumorlokalisation beträgt das mittlere 5-Jahres-Überleben dieser Tumorentität in etwa 50 % (Bose, Brockton et al. 2013). Das männliche Geschlecht und hohes Alter zum Erkrankungszeitpunkt zählen ebenso zu den ungünstigen Prognosefaktoren (Lehnerdt, Hoffmann et al. 2010) wie die Hypoxie im Tumorgewebe und die daraus resultierende Azidose, die mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert wird (Bose, Brockton et al. 2013).

Bereits in mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Komorbiditäten einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose des HNSCC haben. Im Speziellen zählen dazu chronische Erkrankungen wie die Herzinsuffizienz, Lungenerkrankungen, zerebrovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus und das peptische Ulkus. Auch der HPV-Status gilt als prognostischer Faktor. HPV positive Tumoren zeigen ein besseres Ansprechen auf die Therapie und sind somit prognostisch günstiger. Die Patienten mit HPV positiven Tumoren sind meist jünger, oft Nichtraucher und gelten als körperlich belastbarer (Boje 2014).

Neben diesen klassischen Faktoren veröffentlichten Lehnerdt et al. mehrere neue Prognosefaktoren, die in Zukunft das Überleben der Patienten mit HNSCC maßgeblich beeinflussen sollen. Dazu gehören nicht nur die viralen Onkoproteine der bereits erwähnten HPV-Infektion sondern auch der p53-Status, das Zellzyklusderegulationsprotein p16^{INK4}, eine Überexpression von Cyclin D1 und viele weitere Signaltransduktionsmoleküle. Es scheint jedoch nicht so einfach zu sein, den prognostischen Wert der einzelnen Biomarker festzulegen. Trotzdem konnte unsere Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen erniedrigtem Gesamtüberleben der Patienten und der Überexpression von Survivin und p-Akt Ser 473 zeigen (Pickhard, Gröber et al. 2014).

Abschließend sollte angemerkt werden, dass das Verständnis der Molekularpathologie des HNSCC, die genaue Patientenselektionierung und groß angelegte überregionale Studien der Schlüssel zu einer erfolgreicherer Targeted-Therapie zu sein scheinen (Kundu and Nestor 2012).

2.3 Aurora-Kinasen

Die Aurora-Kinasen gehören zur Enzymfamilie der Serin-Threonin-Kinasen und wurden 1995 von David Glover und Kollegen im Rahmen von Forschungsarbeiten an der *Drosophila melanogaster* entdeckt (Kollareddy, Zheleva et al. 2012). Unterteilt in Aurora-Kinasen A, B und C gelten sie in höheren Organismen als wichtige Bestandteile der Zellzyklusregulation (Mehra, Serebriiskii et al. 2013). Im Bereich des C-terminalen Endes sind die beiden Kinasen zu etwa 70 % identisch im Vergleich zum hoch divergenten N-Terminus. Die Aktivierung erfolgt sowohl bei Aurora-Kinase A (AurkA) als auch bei Aurora-Kinase B (AurkB) mittels Autophosphorylierung (Hochegger, Hegarat et al. 2013).

Die Aurora-Kinasen werden als Onkogene angesehen, deren Rolle in der Entstehung von Kopf-Hals-Malignomen ist jedoch unklar (Kollareddy, Zheleva et al. 2012). Die Relevanz dieser Enzyme ist jedoch unumstritten, da die Überexpression in einigen Tumorentitäten bereits nachgewiesen werden konnte. Dazu zählen beispielsweise das Kolonkarzinom, das Brustkarzinom, das Blasenkarzinom (Pitts, Davis et al. 2013) und auch das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (Reiter, Gais et al. 2006).

Die Hauptfunktionen der Aurora-Kinasen bestehen in der Regulation der Zellteilung, der Kontrolle des Mitoseeintritts der Zelle, der Bildung einer funktionsfähigen Mitosespindel und der Fertigstellung der Zytokinese. Primär liegt der Fokus dieser Arbeit auf den Aurora-Kinasen A und B, da sie für diese genannten Hauptfunktionen mehrheitlich zuständig sind und somit im Mittelpunkt der internationalen Forschung stehen. Aurora-Kinase C ist hauptsächlich im Hoden exprimiert und nimmt für Aurora-Kinase B eine komplementierende Funktion ein (Mehra, Serebriiskii et al. 2013).

Die folgende Abbildung zeigt die Lokalisationen und die Hauptfunktionen der Aurora-Kinasen A und B im Zellzyklus. Trotz ihrer Ähnlichkeit in der Sequenz, verfügen die beiden Kinasen über unterschiedliche Wirkungsbereiche. Aurora-Kinase A (gelbe Dreiecke) befindet sich im Bereich des Zentrosoms während Aurora-Kinase B (rote Kreise) am Kinetochor lokalisiert ist. Bei der Zytokinese sind beide Kinasen von großer Bedeutung und deshalb an der Einschnürungszone zu finden. In der G1-Phase verringert sich die Konzentration an aktiver Aurora-Kinase in der Zelle.

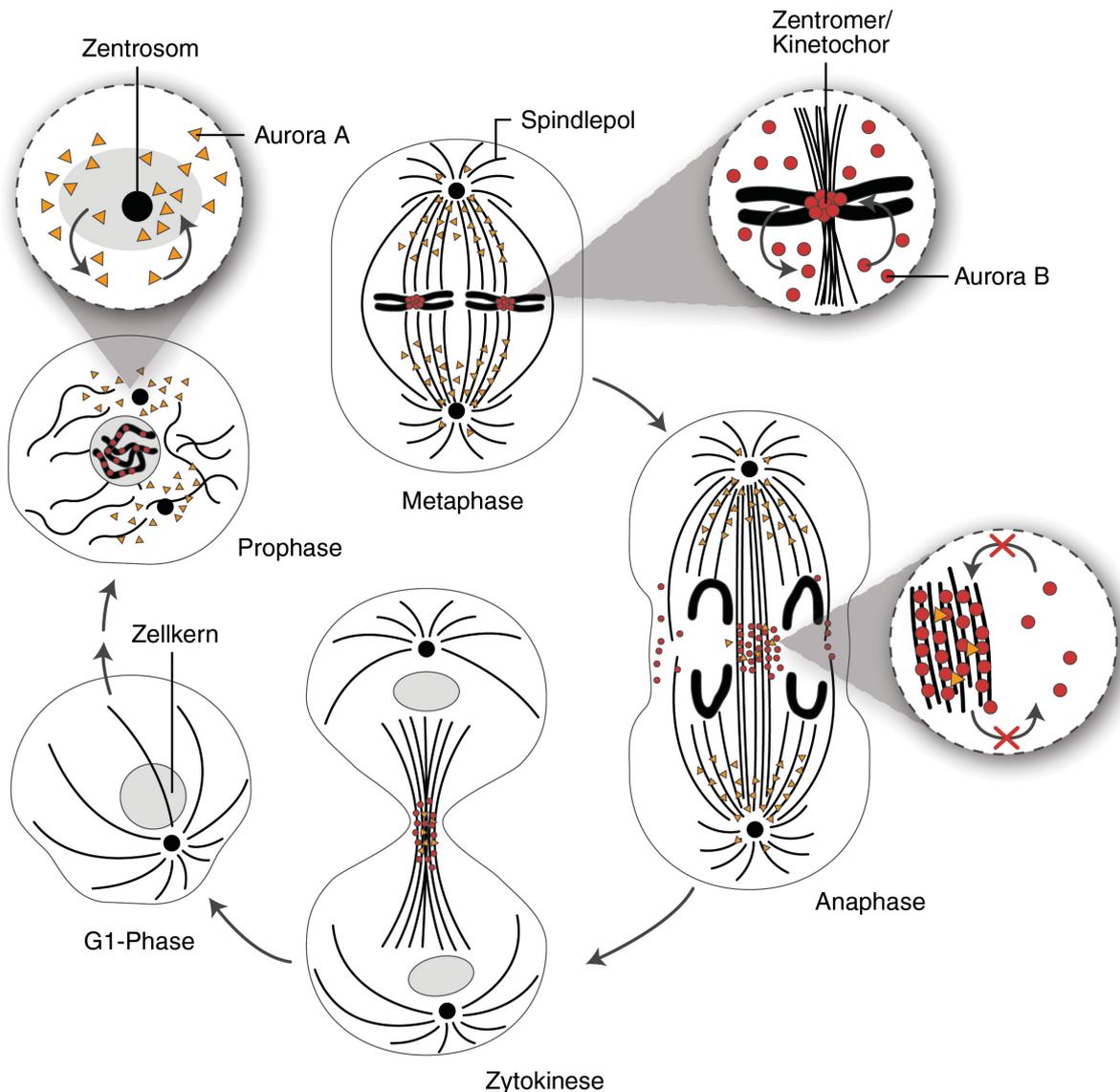


Abbildung 3: Lokalisationen und die Hauptfunktionen der Aurora-Kinasen A und B im Zellzyklus; modifiziert nach (Carmena and Earnshaw 2003)

Bei jeder Zellteilung besteht die Gefahr einer Fehlverteilung der Chromosomen, was eine Aneuploidie zur Folge hat. Diese numerischen Aberrationen des chromosomalen Gehalts der Zelle zählen zu den am meisten beobachteten Veränderungen in soliden Tumoren (Kops, Weaver et al. 2005). Der mechanische Vorgang der Chromosomentrennung wird von der Mitosespindel ausgeführt und kann nur starten, wenn alle Chromosomen in der Äquatorialebene regelrecht ausgerichtet sind. Dies ist einem äußerst komplexen Kontrollsystem unterworfen. Die Aurora-Kinasen und viele

weitere mitotisch aktive Kinasen gehören zu den Schlüsselenzymen dieses Systems (Hochegger, Hegarat et al. 2013).

2.3.1 Aurora-Kinase A

Die Aurora-Kinase A, auch BTAK (breast tumor amplified kinase) oder STK15 genannt, hat ein Molekulargewicht von 45,8 kDa (Gene Cards, Weizmann Institute of Science, 2014) und ist auf Chromosom 20q13.2 lokalisiert (Dar, Goff et al. 2010). Sie ist weitgehend am Zentrosom lokalisiert und akkumuliert während der S-Phase bis zu deren maximalen Expression zwischen der G2- und M-Phase (Mehra, Serebriiskii et al. 2013).

Die Aktivierung der Kinase erfolgt über eine Autophosphorylierung an Threonin 288. Die folgende Abbildung soll diesen Vorgang veranschaulichen: Der Gradient der GTPase Ran zwingt das Aktivierungsprotein TPX2 die Bindung von seinem Hilfsprotein Importin- α/β aufzuheben. Aurora-Kinase A wird von der Proteinphosphatase 1 γ im inaktiven Zustand gehalten. Sobald TPX2 an die inaktive

Aurora-Kinase A bindet, beginnt der Prozess der Autophosphorylierung und somit die Aktivierung der Kinase.

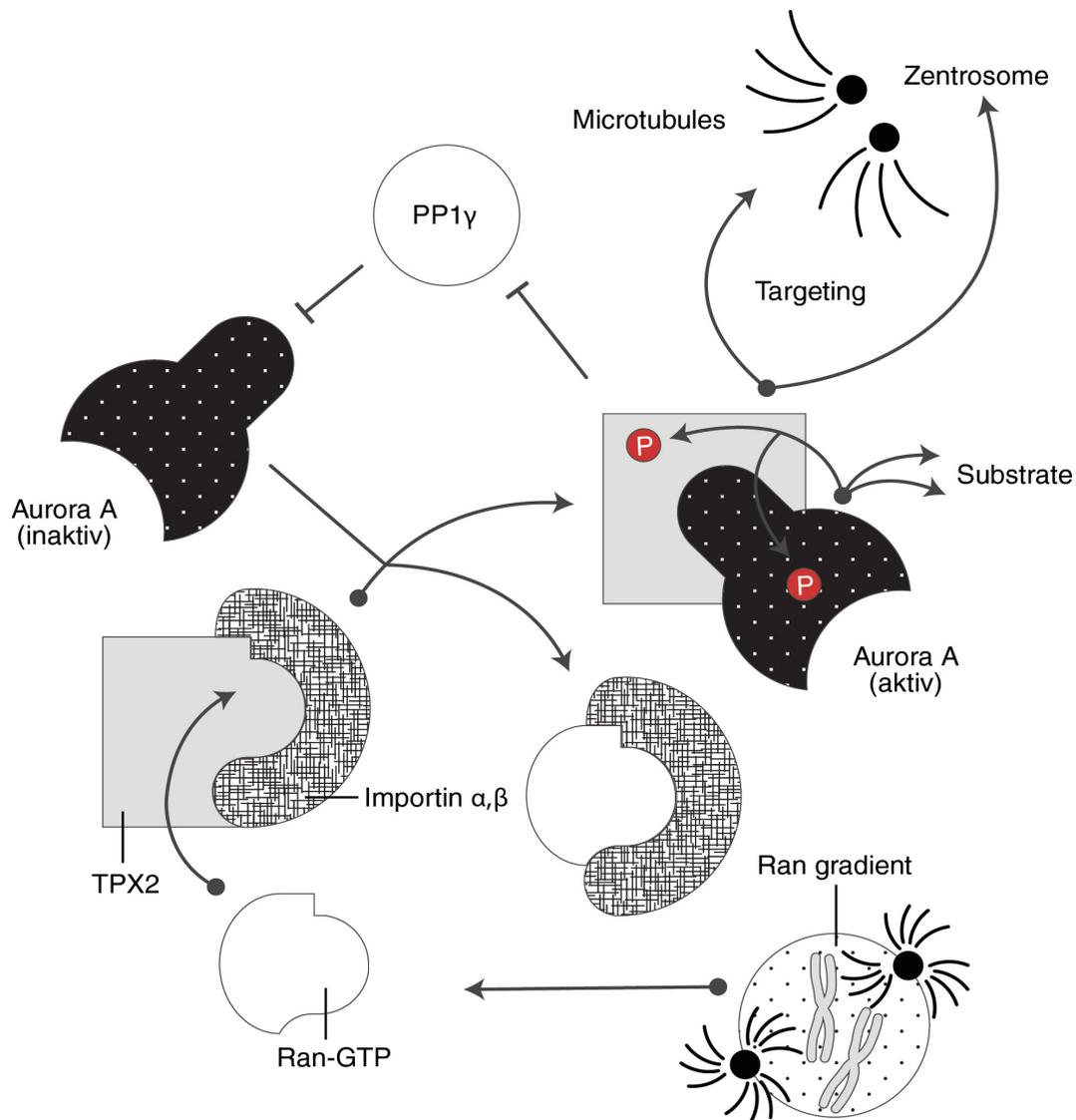


Abbildung 4: Aktivierung der Aurora-Kinase A; modifiziert nach (Carmena and Earnshaw 2003)

Die aktivierte Aurora-Kinase A reguliert den Reifungsprozess des Zentrosoms und kontrolliert den Eintritt der Zelle in die Mitose, indem sie zur Aktivierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes beiträgt. Des Weiteren spielt die Aurora-Kinase A zusammen mit der Aurora-Kinase B eine entscheidende Rolle bei der Chromosomenteilung und der Bildung der Mitosespindel (Nikonova, Astsaturov et al. 2013).

Aurora-Kinase A interagiert mit mehr als 60 verschiedenen Schlüsselenzymen wie AKT1, NFK β , p53 oder GSK3 β (Mehra, Serebriiskii et al. 2013). Die Interaktionen der zahlreichen Signaltransduktionsproteine mit der Aurora-Kinase A sind bis heute jedoch noch weitgehend nicht verstanden (Hochegger, Hegarat et al. 2013).

Eine Abnahme der Menge an aktivierter Aurora-Kinase A in der Zelle geht mit einem mitotischen Arrest der Zelle in der G2/M-Phase einher. Es kommt zur monopolen Spindelbildung und zur Apoptose der Zelle (Curry, Hayley et al. 2009). Die Überexpression dieser Kinase im Tumorgewebe führt zur Aneuploidie und zur erhöhten Aktivität von Downstream-Signalen des EGF-Rezeptors. Dies erhöht das Überleben der Tumorzellen und intensiviert die Zellmigration und Invasion (Mehra, Serebriiskii et al. 2013).

Zuletzt konnte ein genetischer Polymorphismus der AurkA auf Codon 91 gezeigt werden, bei dem auf Position 31 die Aminosäure Phenylalanin (Phe) gegen Isoleucin (Ile) ausgetauscht wird. Beim Ösophaguskarzinom konnte der Aurora-Kinase A Polymorphismus als Risikofaktor für das Auftreten von progressivem Tumorverhalten eingestuft werden (Miao, Sun et al. 2004) und eine groß angelegte Metaanalyse zeigte ein erhöhtes Karzinomrisiko für alle drei Varianten des Polymorphismus (Ewart-Toland, Dai et al. 2005).

2.3.2 Aurora-Kinase B

Die Aurora-Kinase B ist mit einem Molekulargewicht von 39,3 kDa etwas kleiner (Gene Cards, Weizmann Institute of Science, 2014) als die vorher beschriebene Aurora-Kinase A. Sie ist auf Chromosom 17q13 lokalisiert (Dar, Goff et al. 2010) und bildet einen essentiellen Teil des Chromosomalen Passenger Komplexes, der auch als CPC abgekürzt wird. Neben der Aurora-Kinase B wird dieser Komplex aus den Proteinen Survivin, Borealin und dem inner centromere protein (INCENP) gebildet. Diese Komplexbildung ist notwendig, um die Autophosphorylierung und somit die Aktivierung der Kinase einzuleiten. Aurora-Kinase B ist hauptsächlich am Kinetochor lokalisiert und akkumuliert beginnend in der G2-Phase bis zu seiner maximalen Expression während der Metaphase (Hochegger, Hegarat et al. 2013).

Folgende Grafik soll die Komplexbildung und die Aktivierung der Aurora-Kinase B verdeutlichen: Nach der Komplexbildung wird INCENP von Aurora-Kinase B direkt phosphoryliert. Das positive Feedback wiederum aktiviert die Kinase mittels Autophosphorylierung.

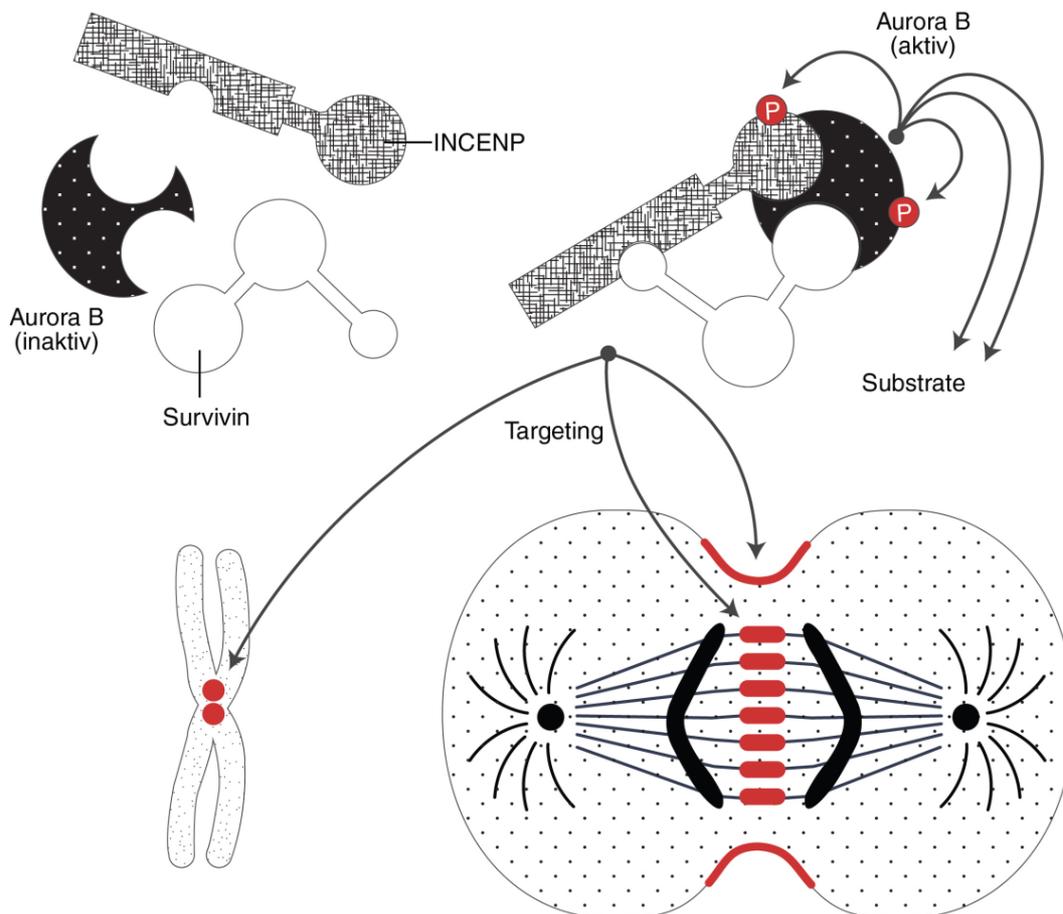


Abbildung 5: Komplexbildung und Aktivierung der Aurora-Kinase B; modifiziert nach (Carmena and Earnshaw 2003)

Die aktivierte Kinase diffundiert schließlich vom Zentromer ab und wird durch Proteinphosphatasen inaktiviert, sodass abhängig von der Nähe zum Zentromer ein Gradient von der aktivierten Aurora-Kinase B entsteht (Lampson and Cheeseman 2011).

Die Hauptaufgabe der Aurora-Kinase B besteht in der korrekten Ausrichtung der Chromosomen und der Anhaftung des Spindelapparates am Kinetochor ausgehend von den jeweils gegenüberliegenden Spindelpolen (Hochegger, Hegarat et al. 2013).

Die Chromosomentrennung ist ein mechanischer Vorgang, der genau reguliert sein muss, da es ansonsten zu fehlerhaften Verbindungen der Mikrotubuli kommt. Durch den Zug der Mitosespindel am Kinetochor entwickelt sich eine Spannung über dem Zentromer. Es konnte bereits in einzelligen Hefepilzen gezeigt werden, dass die Ipl1-Kinase Substrate phosphoryliert, die als Regulatoren der Bindung der Mitosespindel am Kinetochor gelten. Aurora-Kinase B ist das funktionelle Analogon zur Ipl1-Kinase in höheren Organismen. Im Rahmen der Forschung an *Drosophila melanogaster* konnte dies auch für die Aurora-Kinase B nachgewiesen werden. Dabei werden bei Abwesenheit der mechanischen Spannung Substrate am Kinetochor phosphoryliert und somit falsche Anhaftungen der Mitosespindel destabilisiert, wodurch die inkorrekte Chromosomentrennung verhindert wird (Lampson and Cheeseman 2011).

Neben der Funktion am Kinetochor spielt Aurora-Kinase B eine Rolle am Ende der Zytokinese (Pitts, Davis et al. 2013) und bei der Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 (Kollareddy, Zheleva et al. 2012).

Anders als bei Aurora-Kinase A stoppt die Abnahme der Konzentration von Aurora-Kinase B in der Zelle die Zytokinese und führt zu multinukleären Zellen, was meist den apoptotischen Zelltod zur Folge hat (Curry, Hayley et al. 2009).

2.4 Aurora-Kinase-Inhibition

Die Therapie maligner Zellen mittels monoklonalen Antikörpern oder anderen molekularen Inhibitoren soll in die Karzinogenese eingreifen, die Überlebensraten verbessern und gleichzeitig die Nebenwirkungen der derzeitigen Standardtherapie vermindern (Kundu and Nestor 2012). Da die Aurora-Kinasen als Onkogene angesehen werden, ist es durchaus sinnvoll diese als molekulare Zielstruktur zu verwenden. Obwohl ihre Funktion in der Tumorgenese noch nicht bekannt ist, befinden sich mehr als 30 Inhibitoren in präklinischen oder klinischen Studien (Kollareddy, Zheleva et al. 2012).

Die erste Generation der Aurora-Kinase-Inhibitoren wurde rein für Forschungszwecke entwickelt, konnte aber dazu beitragen die Biologie dieser Enzyme besser zu verstehen. Tozasertib (VX-680) war der erste in einer klinischen Studie verwendete Inhibitor, der sowohl Aurora-Kinase A also auch Aurora-Kinase B blockiert. Alisertib (MLN8237) ist ein selektiver, oraler Inhibitor der Aurora-Kinase A und wurde aus der

ersten Generation des Agens entwickelt, da dieses aufgrund der bezondiazepinähnlichen Struktur zu neurotoxischen Effekten führte. Barasertib (AZD1152) ist ein selektiver Aurora-Kinase B Inhibitor, der im Plasma sofort in seine aktive Form umgewandelt wird. Als häufigste, dosisunabhängige Nebenwirkung wurde eine Neutropenie beobachtet. Aktuelle Studien evaluieren die Wirkung von Alisertib und Barasertib als Einzeltherapeutika sowie auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika und der Strahlentherapie (Pitts, Davis et al. 2013).

2.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, sich eingehender mit der Aurora-Kinase Familie bei HNSCC zu beschäftigen.

Hierbei sollte erstens das Auftreten des Aurora-Kinase A Polymorphismus bei einem HNSCC Patientenkollektiv näher untersucht werden und ein möglicher Zusammenhang mit der Expression anderer Proteine wie p-AKT Ser 473 oder Survivin bezüglich des Überlebens ermittelt werden.

Zum Zweiten sollten *in vitro* Experimente erfolgen. Dabei sollte zunächst einmal das Proliferationsverhalten von HNSCC Zelllinien hinsichtlich des Vorliegens des Aurora-Kinase A Polymorphismus untersucht werden. Danach wurde versucht dieses Verhalten durch Inhibition der Aurora-Kinasen A oder B auch unter Strahlentherapie zu modifizieren.

Durch diese Arbeit erhoffen wir uns einen Marker oder eine Kombination von Markern zu finden, die Hinweise auf ein Therapieansprechen liefern, um so in Zukunft die Patienten zielgerichteter therapieren zu können.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die folgenden Tabellen zeigen die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, Inhibitoren, Primär- und Sekundärantikörper, Reagenzien und Chemikalien, Medien und Supplemente für die Zellkultur sowie Geräte, Verbrauchsmaterialien und Computerprogramme.

3.1.1 Zelllinien

In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten Zelllinien mit Tumorlokalisierung, Grading, Alter und Geschlecht des Patienten aufgelistet (Lin, Grandis et al. 2007).

Zelllinie	Tumorlokalisierung	Grading	Alter	Geschlecht
Cal27	Zunge	G3	56	M
HN	weicher Gaumen	G2	60	M
UD-SCC-5	Supraglottis	G3	44	M
SAS	Zunge	?	?	?

Tabelle 7: Zelllinien

Cal27, HN und SAS wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) mit Firmensitz in Braunschweig bezogen. UD-SCC-5 stammt von der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

3.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur

Medien und Supplemente für die Zellkultur	Hersteller
DMEM - Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMSO - Dimethylsulfoxid ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Medien und Supplemente für die Zellkultur	Hersteller
FBS - Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamine 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
TrypLE™ Express (1x) Stable Trypsin	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 8: Medien und Supplemente für die Zellkultur

3.1.3 Inhibitoren

Inhibitor	Wirkmechanismus	Konzentration	Hersteller
Alisertib (MLN8237)	selektiver Aurora-A- Inhibitor	5,0 nM	Selleckchem, Houston, TX, USA
Barasertib (AZD1152-HQPA)	selektiver Aurora-B-Inhibitor	1,0 nM	Selleckchem, Houston, TX, USA
Docetaxel	Mikrotubuli-Stabilisator	0,25 nM	Selleckchem, Houston, TX, USA
Tozasertib (VX-680)	Pan-Aurora-Inhibitor	2,5 nM	Selleckchem, Houston, TX, USA

Tabelle 9: Inhibitoren

3.1.4 Primärantikörper (IHC/IF)

Primärantikörper	Verdünnung	Molekulargewicht	Hersteller
Aurora Kinase A (1F8) (IHC/IF)	1:400	48 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Aurora Kinase B (IHC/IF)	1:100	40 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
p-Histon H3 Ser 10 (D2C8) (IHC/IF)	1:400	17 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA

Tabelle 10: Primärantikörper (IHC/IF)

3.1.5 Primärantikörper (WB)

Primärantikörper	Verdünnung	Molekulargewicht	Hersteller
β-Tubulin (WB)	1:5000	55 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Aurora Kinase A (WB)	1:5000	48 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Aurora Kinase B (WB)	1:500	40 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
p-Akt Ser 473 (WB)	1:500	60 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
p-p44/42 MAPK (Erk1/2) Thr 202/Tyr 204 (WB)	1:1000	42,44 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Survivin (WB)	1:1000	16 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA

Tabelle 11: Primärantikörper (WB)

3.1.6 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse IgG HRP-linked	1:10000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Anti-Rabbit IgG HRP-linked	1:5000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Anti-Mouse IgG (H+L) Cy5-conjugated	1:100	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Anti-Mouse IgG (H+L) FITC-conjugated	1:100	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Anti-Rabbit IgG (H+L) Cy5-conjugated	1:100	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Anti-Rabbit IgG (H+L) FITC-conjugated	1:100	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 12: Sekundärantikörper

3.1.7 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
1 % Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1,4 Dithiotreitol (DTT) ≥ 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumperoxidsulfat (APS) ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
ApoI Restriktionsenzym	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Bond Dewax Solution	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Bond Epitope Retrieval Solution 1	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Bond Epitope Retrieval Solution 2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Bond Polymer Refine Detection Kit	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Bond Wash Solution 10x	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Bovine Serum Albumin 2 mg/ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Crystal Violet	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Demineralisiertes Wasser	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
e-amino-n-caproic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥ 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd-Lösung ≥ 37 % säurefrei	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Glycin ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33342 Farbstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
Hybridisierungspuffer ZymoLight SPEC 13/CEN 18/SPEC 21 Triple Color Probe	Zytomed-Systems, Berlin, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
KAPPA SYBR fast PCR Universal Mastermix	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Magermilchpulver	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Methanol ≥ 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
NH ₄ Cl 500 mM	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitory Cocktail (10x)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Restriktionspuffer 5x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Roti®-Histokitt II	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Stock 20 % SDS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel - AcrylamidstammLösung 30 % mit 0,8 % Bisacrylamide	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
STK15 (AurkA) Primer for und rev	MWG Eurofins Ebersberg, Deutschland
Tris Pufferan® ≥ 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Xylol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ziegen Serum	Dako, Golstrup, Dänemark
ZymoLight SPEC 13/CEN 18/SPEC 21 Triple Color Probe	ZytoVision GbmH, Bremerhaven, Deutschland

Tabelle 13: Reagenzien und Chemikalien

3.1.8 Gemischte Puffer, Reagenzien und Gele

Verbrauchsmaterialien	Zusammensetzung
1 M Tris-Cl pH 6,8	12,1 g Tris ad 100 ml destilliertem Wasser + Essigsäure zur pH Einstellung
1 M Tris-Cl pH 8,8	12,1 g Tris ad 100 ml destilliertem Wasser + Essigsäure zur pH Einstellung
10 % Tween	10 ml Tween-20 ad 100 ml DPBS
10 % APS	1 g APS ad 10 ml destilliertem Wasser
10x SDS Laufpuffer für 1 Liter	30,3 g Tris + 140,42 g Glycin + 50 ml 20 % SDS ad 1000 ml destilliertem Wasser
10x TBS für 1 Liter	24,2 g Tris + 80 g NaCl ad 1000ml destilliertem Wasser + Essigsäure zu Einstellung des pH auf 7,6
5x SDS Sample Buffer	3,125 ml Tris pH 6,8 + 386 mg DTT + 1g SDS + 0,5 ml 1 % Bromphenol Blau + 5 ml Glycerol + 1,375 ml destilliertes Wasser
Anodenpuffer I pH 10,5	18,16 g Tris + 100 ml Methanol ad 500 ml destilliertes Wasser
Anodenpuffer II pH 10,4	1,51 g Tris + 100 ml Methanol ad 500 ml destilliertes Wasser
Antikörperverdünnungs- und Blockingpuffer für 1 Liter	100 ml 10x TBS + 10 ml 10 % Tween + 50 g Magermilchpulver + 890 ml destilliertes Wasser
Bovine Serum Albumin 0,2 mg/ml	0,2 µl BSA+ 0,01 % Triton X-100 ad 1 ml
Cell Lysis Buffer (10x)	Zusammensetzung nach Herstellerangaben
Crystal Violet 0,4 %	40 mg Crystal Violet + 100 ml 4 % Ethanol
DPBS/0,01 % Triton X-100	10 µl Triton X-100 ad 100 ml DPBS
DPBS/0,04 % Triton X-100	500 µl Triton X-100 ad 100 ml DPBS
DPBS/0,1 % Triton X-100	500 µl Triton X-100 ad 500 ml DPBS
DPBS/0,25 % Triton X-100	250 µl Triton X-100 ad 100 ml DPBS
DPBS/4 % Formaldehyd	27 ml Formaldehyd 37 % ad 500 ml DPBS
DPBS/5 % Normal Goat Serum	500 µl Normal Goat Serum ad 10 ml DPBS
DPBS/50 nM NH ₄ Cl	1 ml 500 nM NH ₄ Cl ad 10 ml DPBS

Verbrauchsmaterialien	Zusammensetzung
Hybridisierungspuffer ZytoLight SPEC 13/CEN 18/SPEC 21 Triple Color Probe	<p>grün-markierte Polynukleotide (ZyGreen: Absorption bei 503 nm und Emission bei 528 nm, ähnlich FITC), die gegen Chromosom-13 spezifische Sequenzen gerichtet sind</p> <p>blau-markierte Polynukleotide (ZyBlue: Absorption bei 418 nm und Emission bei 467 nm, ähnlich DEAC), die gegen alpha-Satelliten-Sequenzen des Zentromers von Chromosom 18 gerichtet sind</p> <p>orange-markierte Polynukleotide (ZyOrange: Absorption bei 547 nm und Emission bei 572 nm, ähnlich Rhodamin), die gegen Chromosom-21-spezifische Sequenzen gerichtet sind</p>
Kathodenpuffer pH 7,5	1,51 g Tris + 100 ml Methanol + 2,62 g e-amino-n-caproic acid ad 500 ml destilliertem Wasser
SDS 1 %	25 ml SDS 20 % ad 500 ml destilliertem Wasser
Stripping Buffer für 1 Liter	100 ml Methanol + 100 ml Essigsäure + 800 ml destilliertes Wasser
Waschpuffer für 1 Liter	100 ml 10x TBS + 10 ml 10 % Tween + 890 ml destilliertes Wasser

Tabelle 14: Gemischte Puffer, Reagenzien und Gele

3.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Vacuubrand ME2	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Accu-Jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Axio-Imager-Z1	Zeiss, Göttingen, Deutschland
BD FACSCanto-II flow cytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Bestrahlungsgerät Gulmay Medical LTD RS 225 X-Ray Research System	Gulmay Medical LTD, Surrey, England
Blotting System Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bond-Max Färbeautomat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Brutschrank HeraCell 150i CO2 Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Gerät	Hersteller
C1000 Thermo Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Cellometer™ Auto T4	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoresekammer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
ELISA Reader Multiscan FC	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Eppendorf Research Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank Premium No frost	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Kühlplatte	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf, Deutschland
Kühlschrank comfort	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Laborabzug	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze, Deutschland
Leica Mikroskop DMI6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Mikroskopkamera DFC425 C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikrotom Microm HM 355 S	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Minishaker MS2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Objektträgerstrecktisch OTS 40	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffin-Streckbad TFB 35	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf, Deutschland
PCR Elektrophorese Powersupply	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Peqette	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Power Pac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PowerPac™ HC Powersupply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Präzisionswaage SBC 32	Scaltec, Heiligenstadt, Deutschland
Ready Gel Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Gerät	Hersteller
Rüttler Vibrax VXR	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Sterilbank HeraSafe KS	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Stickstofftank LS 4800	Taylor-Wharton Germany GmbH, Husum, Deutschland
Taumel-Rollenmischer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge PerfectSpin Mini	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Tabelle 15: Geräte

3.1.11 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
15 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
50 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Biosphere Micro Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikrotomklingen Blade S35	Novoglas Labortechnik, Bern, Schweiz
Objekträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Parafilm®	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten-Spitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Merck Millipore GmbH, Darmstadt, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Whatmann Gel Blotting Papier	Sartorius stedim biotech, Göttingen, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Toppits Frischhaltefolie	Cofresco Frischhalteprodukte, Minden, Deutschland

Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien

3.1.12 Computerprogramme

Computerprogramme	Hersteller
Microsoft Office 2011	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
IBM® SPSS® Statistics Version 23	IBM GmbH, Ehningen, Deutschland
Software Cellometer Auto T4	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Prism GraphPad 6.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Quantity One Software 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Image Lab Software 5.2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Leica Application Suite LAS V3.8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
BD FACSDiva Software Version 6.1.1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
ModFit LT 3.2 Software	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Tabelle 17: Computerprogramme

3.2 Methoden

3.2.1.1 Studienkollektiv

In dieser Arbeit wurden Gewebe von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, des Oro-, des Hypopharynx und des Larynx eingeschlossen. Hierbei wurde sowohl Tumorgewebe als auch korrespondierendes Normalgewebe untersucht. Für die Analyse des Aurora-Kinase A Polymorphismus wurden Tonsillektomiepräparate (n=105) gesunder Patienten als Vergleichsgewebe verwendet, um das Vorliegen einer Keimbahnmutation auszuschließen. Bei immunhistologischen Färbungen wurde als Kontrollgewebe korrespondierendes Normalgewebe der Tumorpräparate herangezogen. Die Gewebe bei den primär operierten Fällen wurden im Rahmen einer Studie in den Kliniken und Polikliniken für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der TU München, Klinikum rechts der Isar sowie der Universitätsklinik Regensburg gewonnen. Diese erfolgte in den Jahren 1993-1997 und wurde durch die Wilhelm-Sander-Stiftung und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert (Steuer-Vogt, Bonkowsky et al. 2001) (Steuer-Vogt, Bonkowsky et al. 2006). Zudem erfolgte eine Kollektiverweiterung um primär radiochemotherapierte Patienten die im Zeitraum 2001-2006 am Klinikum rechts der Isar, TU München behandelt wurden.

Insgesamt wurden die Daten von 269 Patienten retrospektiv analysiert mit einem durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraum von 6,01 Jahren (Spanne: 0,02 -17,81 Jahre). Hierbei wurden Alter und Geschlecht der Patienten, Ort, Seite, TNM-Klassifikation und Graduierung des Primärtumors, Therapiemodalitäten, Risikofaktoren, mögliche Rezidive, Metastasen oder Zweitkarzinome sowie Überlebensdaten erhoben. Histologische und klinische Daten wurden aus medizinischen Aufzeichnungen entnommen, Überlebensdaten wurden teilweise vom Tumorregister München aber auch vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München bereitgestellt.

Alle Tumore wurden gemäß der International Union Against Cancer (UICC) TNM Klassifikationsystems von 2002 nachklassifiziert. Die Ethikkommission des Klinikums

rechts der Isar, Technische Universität München, genehmigte die Durchführung dieser Studie.

3.2.1.2 Immunhistochemische Färbung

Das Patientenmaterial wurde nach der Fixierung in Paraffin eingebettet und aus den Blöcken wurden 1,5 µm dicke Schnitte erstellt. Nach dem Aufziehen auf die Objektträger mussten die Schnitte über Nacht bei 58 °C getrocknet werden. Zur Färbung der Schnitte wurde der Leica Bond-Max Färbeautomat unter Zugabe verschiedener Primärantikörper angewendet. Dem Ganzen liegt das Prinzip der Polymerisation zugrunde, das sich sogenannte polymere Antikörperkonjugate zu Nutze macht. Die folgenden Schritte werden von dem Färbeautomaten durchgeführt:

1. Entparaffinieren durch die Bond Dewax Solution
2. Waschungen mit 100 % Ethanol
3. Epitop-Demaskierung mit Hilfe der Bond Epitope Retrieval Solution
4. Inkubation mit Wasserstoffperoxid
5. Zugabe des Primärantikörpers in korrekter Verdünnung
6. Inkubation mit dem Polymer Refine Detection Kit
7. DAB-Chromogen induziert die Farbreaktion und macht diese sichtbar
8. Gegenfärbung mittels Hämatoxylin

Zuletzt wird das gefärbte Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70 % Ethanol, 96 % Ethanol (jeweils 5 Minuten), Isopropanol (2 mal für je 5 Minuten) und Xylol (3 mal für je 10 Minuten) rehydriert und somit haltbar gemacht. Vor dem Auflegen der Deckgläser muss ein synthetisches Einschussmittel (Roti®-Histokitt II) als Eindeckmittel aufgetragen werden.

Die Auswertung der gefärbten Schnitte wurde durch zwei unabhängige Untersucher vorgenommen. Hierzu kam eine Modifikation des Immunreaktiven Scores (IRS) zum Einsatz (Schauer, Rothe et al. 1988).

Der IRS ergibt sich in dieser Arbeit durch die Addition aus dem prozentualen Anteil aller gefärbter Zellen (percentage points) und der Färbeintensität (staining intensity) und kann einen Wert zwischen 0 und 7 annehmen.

SI		PP		IRS	
negativ	0	negativ	0	negativ	0
Schwach positiv	1	< 10 %	1	Schwach positiv	2-3
Mäßig positiv	2	11-30 %	2	Mäßig positiv	4-5
Stark positiv	3	31-60 %	3	Stark positiv	6-7
		> 60 %	4		

Tabelle 18: Modifikation des Immunreaktiven Scores (IRS=SI+PP)

SI: staining intensity = Färbeintensität, PP: percentage points = Prozentpunkte, IRS: Immunreaktiver Score

3.2.2 Zellkultur

Die Arbeit an den verschiedenen Zelllinien erfolgt nach genau festgelegten Standardkultivierungsmethoden. Zuerst werden alle Medien und Supplemente, die zur Zellkultivierung verwendet werden im vorgeheizten Wasserbad (37 °C) angewärmt und anschließend mit 70 % Ethanol desinfiziert. Als Medium wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) verwendet. Dies wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) ergänzt. Die Kultivierung im Brutschrank erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ bei einer Luftfeuchtigkeit von 95 %.

3.2.2.1 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen werden in Kryoröhrchen in einem Stickstofftank bei -196 °C gelagert. Diese Röhrchen werden angetaut und die verflüssigte Zellsuspension wird mit 15 ml Medium in ein großes Reaktionsgefäß gefüllt. Inzwischen kann in die Kulturschale 5 ml Medium vorgelegt werden. Die Zellen werden mit der Pipette vereinzelt, in die vorbereitete Kulturschale überführt und im Brutschrank unter den oben angeführten Voraussetzungen kultiviert.

3.2.2.2 Splitten der Zellen und Mediumwechsel

Optimalerweise sollten die Zellen bei einer Konfluenz von 80 % gesplittet werden, um eine Wachstumsinhibition zu verhindern. Daher ist es essentiell sich mit der Proliferationsrate der verschiedenen Zelllinien zu beschäftigen. Am besten kann man dies einschätzen, in dem man die Zellen in unterschiedlichen Stadien des Wachstums unter dem Mikroskop regelmäßig betrachtet.

Das in der Kulturschale befindliche Medium wird abgesaugt und die am Boden anhaftenden Zellen werden mit 6 ml 1x DPBS einmalig gespült. Mittels 2 ml Trypsin/EDTA werden die Zellen abgelöst. Man kann die Schale 5 Minuten in den Brutschrank stellen, um für das Enzym Trypsin die optimalen Wirkungsbedingungen zu schaffen und die Ablösung zu beschleunigen. In der Zwischenzeit sollte man die neue Kulturschale beschriften und mit 7 ml Medium befüllen.

Mittels 5 ml Medium werden die abgelösten Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, resuspendiert und 1 ml davon in die neue Kulturschale gegeben. Diese kultiviert man im Brutschrank weiter. Nach 2 Tagen sollte ein Mediumwechsel erfolgen, bei dem das alte Medium abgesaugt und durch 7 ml frisches erwärmtes Medium ersetzt wird.

3.2.2.3 Einfrieren der Zellen

Nach dem Ablösen der Zellen wird die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß gefüllt und bei 1500 rpm in der Zentrifuge für 2 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Zellpellet in einer speziellen Mischung aus FCS und 5 % DMSO (Freezing Medium) resuspendiert. Zuletzt wird die Zellsuspension zu 1 ml in Kryoröhrchen abgefüllt und bei -20 °C eingefroren. Zur Langzeitkonservierung ist ein Stickstofftank mit einer Temperatur von -196 °C erforderlich.

3.2.3 Bestrahlung

Die Bestrahlung stellt einen wichtigen Teil der Standardtherapie dieser Art von Tumoren dar. In Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der TU München (Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Stephanie

E. Combs) war es möglich, das Bestrahlungsgerät RS 225 X-Ray Research System der Firma Gulmay Medical Systems für die Experimente zu verwenden.

Dazu sind folgende Standardeinstellungen zu wählen:

Elektrische Spannung	70 kV
Stromstärke	10 mA
Tischhöhe	466 cm
Filter	Nr. 3

Tabelle 19: Standardeinstellungen des Bestrahlungsgeräts

Um eine Strahlendosis von einem Gray zu erreichen, müssen die Zellen eine Minute bestrahlt werden. Es sind maximal zwei 6-wells oder drei Kulturschalen unter der Bestrahlungsquelle zu platzieren. Schließlich wurde für die Experimente eine Dosis von 2 Gy gewählt, da dies auch der Dosis der einzelnen Fraktionen für die Bestrahlung der Patienten entspricht.

3.2.4 Crystal-Violett Proliferations-Assay

Die Zellen für den Proliferations-Assay müssen bereits einen Tag vor Zugabe der Inhibitoren ausgesät werden. Man löst die Zellen einer 80 % konfluenten Kulturschale ab, ermittelt die Zellzahl und errechnet die nötige Verdünnung, um $5 \cdot 10^4$ Zellen pro ml zu erhalten. Danach pipettiert man je 100 μ l dieser Zellsuspension in die mit je 5 ml Medium befüllten 6-wells (insgesamt ca. $5 \cdot 10^3$ Zellen pro well) und kultiviert die 6-wells im Brutschrank für 24 Stunden. Am nächsten Tag erfolgt die Behandlung mit den ausgewählten Konzentrationen der Inhibitoren (5,0 nM Alisertib, 1,0 nM Barasertib, 2,5 nM VX-680 und 0,25 nM Docetaxel). Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank zur Aktivierung der Substanzen werden die 6-wells mit 2 Gy bestrahlt und anschließend im Brutschrank für 10 Tage ohne Mediumwechsel weiterkultiviert.

Die folgende Abbildung veranschaulicht den Crystal-Violett Proliferations-Assay:

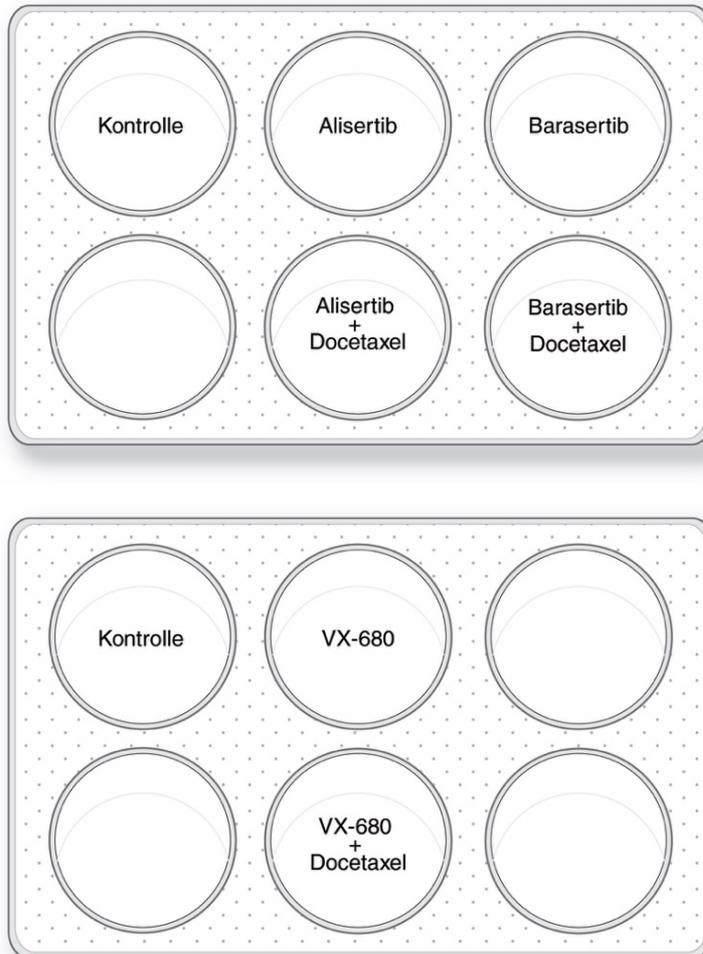


Abbildung 6: Versuchsaufbau des Crystal-Violett Proliferations-Assay

Die Auswertung des Proliferations-Assays nach dieser 10-tägigen Kultivierung basiert auf der Extinktionsmessung bei 595 nm mittels ELISA. Zur Vorbereitung muss das Medium abgesaugt und die Zellen mit je 2 ml 4 % Formaldehyd/0,4 % Ethanol für 20 Minuten fixiert werden. Anschließend wäscht man die noch anhaftenden Zellen mit 2 ml eines Reagenzgemisches aus 1x DPBS und 0,1 % Triton und 2 ml destilliertem Wasser. Die Anfärbung der Zellen erfolgt durch Zugabe von 2 ml 0,4 % Crystal-Violett-Lösung und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Die Farbreste werden mit 2 ml Aqua dest. entfernt. Mit Hilfe von 2 ml 1 % SDS-Lösung und einer Stunde auf dem Rüttler werden die Zellen lysiert. Die Extinktionsmessung im ELISA wird in einem 96-well durchgeführt. Daher müssen 100 µl der Lösung zur Messung nun in Form von

Tripletts untereinander in einen 96-well umpipettiert werden. Der jeweilige Farbumschlag in den einzelnen wells im Vergleich zu einer Referenzmessung ergibt unterschiedlich hohe Extinktionswerte wodurch Aussagen über die Proliferationshemmung getroffen werden können.

3.2.5 Immunfluoreszenz

Die beiden ausgewählten Zelllinien werden 48 Stunden vor dem Versuch nach bekanntem Schema behandelt. Anschließend werden $5 \cdot 10^5$ der ausgesäten Zellen als Monolayer auf die μ -Slides übertragen und mit 200 μ l DPBS/4 % Formaldehyd für 30 Minuten fixiert. Nach sorgfältiger Spülung mit DPBS werden die Slides in 200 μ l DPBS/0,25 % Triton X-100 eingelegt, erneut gespült und mit 200 μ l DPBS/5 % Normal Goat Serum geblockt. Die Slides müssen nun mit dem verdünnten Primärantikörper gegen Aurora-Kinase A und B im Kühlschrank über Nacht inkubiert werden. Am darauffolgenden Tag wird erneut gespült, der Sekundärantikörper zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird wiederholt mit DPBS gespült und eine Kernfärbung durchgeführt. Dazu werden die Zellen für ca. 5 Minuten mit 1 μ g/ml Hoechst 33342 Farbstoff gefärbt und schließlich mit Vectashield® Mounting Medium bedeckt. Die Färbung kann mit Hilfe des Leica Mikroskops DMI6000 B beurteilt und die entstandenen Bilder mit der Leica Application Suite LAS V3.8 Software aufgenommen und bearbeitet werden.

3.2.6 Nachweis des AurkA-Polymorphismus

Zum Nachweis des AurkA-Polymorphismus mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Assay (RFLP-Assay) muss zuerst die DNA aus dem fixierten FFPE-Material der Patienten isoliert und anschließend mit Hilfe einer PCR analysiert werden.

3.2.6.1 DNA-Isolierung aus FFPE-Material

Von den Paraffinblöcken mit dem Patientengewebe werden mehrere je 10 μ m dicke Schnitte angefertigt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach werden 1 ml

Xylol und 250 µl 70 %-iger Ethanol zugegen, die Proben gut durchmischt und anschließend 5 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und danach in 300-500 µl Proteinase K-Puffer und 0,1 % Tween resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Proteinase K müssen die Proben über Nacht bei 55 °C inkubiert werden.

Durch 10-minütiges Kochen der Lösung im Thermoblock kommt es zu einer Enzymaktivierung. Diese wird im NanoDrop gemessen und mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 20 ng/µl verdünnt. Die entstandene DNA-Stammlösung kann bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

3.2.6.2 RFLP-Assay

Zuerst muss der zu analysierende Genabschnitt am Codon 91 mittels PCR amplifiziert werden. Dazu werden folgende Primer verwendet:

AurkA/STK15	Primersequenz
Primer for	CTTTCATGAATGCCAGAAAGTT
Primer rev	CTGGGAAGAATTTGAAGGACA

Tabelle 20: Primer für den RLFP-Assay

Weiters muss für die spezifische PCR-Reaktion folgender Master-Mix zusammengemischt werden:

Reagenz	Stock	Volumen	Endkonzentration
Reaktionspuffer	10x	5 µl	1x
Enhancer P	5x	10 µl	1x
dNTP's	10 nM	1 µl	0,2 mM
Primer for	20 pmol	1 µl	0,4 pmol
Primer rev	20 pmol	1 µl	0,4 pmol

Reagenz	Stock	Volumen	Endkonzentration
taq. Polymerase	5 units/ μ l	0,2 μ l	1 unit/ μ l
DNA	20 ng/ μ l	10 μ l	200 ng
aqua dest.	-	21,8 μ l	-

Tabelle 21: Master-Mix

Anschließend wird das folgende PCR-Programm zur Amplifikation verwendet:

Temperatur	Zeit
95 °C	7 Min.
95 °C	30 Sek.
60 °C	30 Sek.
72 °C	1 Min 30 Sek.
72 °C	7 Min.

Tabelle 22: PCR-Programm

Anschließend erfolgt der Restriktionsverdau des 165 bp großen Fragments mit dem Enzym Apol. Dazu muss folgender Mix zusammenpipettiert werden.

Reagenz	Stock	Volumen	Endkonzentration
Reaktionspuffer	5x	2,5 μ l	1x
BSA	10 mg/ml	0,25 μ l	1 μ g
Apol	10000 units/ml	1 μ l	1000 units/ μ l
aqua dest.	-	1 μ l	-
PCR-Amplifikat	-	20 μ l	-

Tabelle 23: Mix für Restriktionsverdau

Der eigentliche Verdau erfolgt bei 55 °C über Nacht im Thermoblock. Nach der Aktivierung des Enzyms bei 80 °C für 20 Minuten müssen die Fragmente in einem 2,5 %-igen Agarosegel getrennt werden. Daraus ergeben sich die Bandenmuster für die Allele des Polymorphismus: 31Phe – 153 bp, 12 bp sowie 31Ile – 89 bp, 64 bp, 12 bp.

3.2.7 Proteinisolierung

Für die Proteinisolierung werden die Zellen mit den bekannten Inhibitoren behandelt und 48 Stunden inkubiert. Danach muss aus einer 80 % konfluenten Kulturschale das Medium abgesaugt und die Zellen mit kaltem DPBS gespült werden. Dazu pipettiert man 4,5 ml destilliertes Wasser, 500 µl Cell Lysis Buffer, 100 µl PMSF und 100 µl Protease Inhibitory Cocktail. Das Gemisch wird gut vermengt und auf Eis gekühlt. Der Puffer und das PMSF sollten möglichst kurz vor der Isolation angesetzt werden. Nach einer Inkubationsphase von 10 Minuten werden die Zellen mittels eines Zellschabers abgelöst, in einen 1,5 ml Tube pipettiert und für 15 Minuten erneut auf Eis gelegt. Anschließend werden die Zelllysate bei 4 °C für 15 Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wird mit der Pipette entfernt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

3.2.8 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay wurde erstmals 1976 von dem amerikanischen Biochemiker Marion Bradford beschrieben und dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen in den vorher angefertigten Isolaten (Bradford 1976).

Zuerst werden die Proteinlysate mit DPBS 1:10 verdünnt. Zur Herstellung der Probelösungen werden nun 20 µl des verdünnten Lysats, 180 µl DPBS und 200 µl 0,01 % Triton X-100 zusammengemischt. Das Bradford Reagenz wird 1:4 mit DPBS verdünnt. Für die Kalibrationskurve werden Standardlösungen aus 0,2 mg/ml BSA und 0,01 % Triton X-100 hergestellt. In der Folge muss man 600 µl der Bradford Reagenz zu den Standard- und Probelösungen zugeben, kurz durchmischen und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubieren. Abschließend erfolgt die Messung der Extinktion in einem 96-well im ELISA Reader Multiscan FC bei 595 nm. Anhand der

erstellten Kalibrationskurve und der gemessenen Extinktionswerte kann die Proteinmenge jeder einzelnen Probe in Microsoft Excel berechnet werden.

3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode spielt eine wichtige Rolle in der Proteinanalyse, bei der die Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Die SDS-Gelelektrophorese wird vorbereitend zum Western-Blot durchgeführt (Laemmli, 1970). Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Laufgele mit jeweils unterschiedlichen Dichten. Diese Unterschiede entstehen durch die verschiedenen Proteingrößen. Folglich werden Gele höherer Dichte zur Detektion kleinerer Proteine verwendet und umgekehrt.

Laufgel-Dichte	7,5 %	10 %	12 %
Destilliertes Wasser	5,72 ml	6,64 ml	4 ml
30 % Acrylamidstammlösung + 0,8 % Bisacrylamide	5,08 ml	5,32 ml	8,4 ml
1 M Tris pH 8,8	7,48 ml	4 ml	7,48 ml
20 % SDS-Lösung	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	25 µl	25 µl	25 µl

Tabelle 24: Zusammensetzung des Laufgels

Die Gelkammern werden zur Polymerisation zu ca. 2/3 mit den gemischten Gelen befüllt, mit destilliertem Wasser aufgefüllt und für 45 Minuten stehen gelassen. Der Rest der Gelkammer wird schließlich mit dem Sammelgel befüllt und durch die Kämme geschlossen. Diese bilden die Ladekammern für die Proteinlösungen. Nach einer weiteren Wartezeit von 15 Minuten kann das Gel mit den Proteinen beladen werden.

Sammelgel-Dichte	5 %
Destilliertes Wasser	7 ml
30 % Acrylamidstammlösung + 0,8 % Bisacrylamide	1,672 ml
1 M Tris pH 8,8	1,252 ml
20 % SDS-Lösung	50 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	25 µl

Tabelle 25: Zusammensetzung des Sammelgels

Die eingefrorenen Proteinlysate werden aufgetaut, im Verhältnis 5:1 mit 5x SDS Sample Buffer gemischt und für 5 Minuten bei 98 °C im Thermomixer denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Anschließend wird als Größenstandard 4 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder in die letzte Tasche des Gels gefüllt und anschließend Spannung angelegt. Je nach Proteingröße variiert die Laufzeit mittels des Systems Mini-PROTEAN® Tetra System bei 120 V zwischen 3 und 4 Stunden.

3.2.10 Western-Blot

Die Western-Blot Analysen werden nach der Semidry-Blot Methode durchgeführt und dienen der Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (9 cm mal 4,5 cm). Diese Membran wird zuvor 5 Minuten in Methanol eingelegt, mit destilliertem Wasser gespült und erneut 5 Minuten in Anodenpuffer II eingelegt. Zur weiteren Vorbereitung müssen 6 Stück des Blotting-Papiers in Anodenpuffer I, 3 Stück in Anodenpuffer II und schließlich 9 Stück in Kathodenpuffer getränkt werden. Der Proteintransfer erfolgt im Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell bei 225 mA und dauert in etwa 80 Minuten. Die folgende Darstellung bildet den genauen Aufbau der Semidry-Blot Methode ab.

Kathode



9 Stück Blotting-Papier getränkt in Kathodenpuffer
Gel mit aufgetrennten Proteinen
PVDF-Membran
3 Stück Blotting-Papier getränkt in Anodenpuffer II
6 Stück Blotting-Papier getränkt in Anodenpuffer I

Anode

Abbildung 7: Versuchsaufbau Western-Blot

3.2.11 Immundetektion

Mittels des Antigen-Antikörper-Bindungsprinzips und der Chemilumineszenz werden die Banden der gewünschten Proteine sichtbar gemacht. Die Membran muss bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer inkubiert werden. Dazu wird diese mit 10 ml Antikörperverdünnungspuffer und dem jeweiligen Primärantikörper in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und auf den Rollenmischer gelegt. Anschließend erfolgt eine dreimalige Wäsche für 7 Minuten in Waschpuffer und eine erneute einstündige Inkubation auf dem Rollenmischer mit 10 ml Antikörperverdünnungspuffer und dem Sekundärantikörper. Die PVDF-Membran wird nun für eine Minute in 10 ml SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate eingelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und im Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ entwickelt. Durch die Reaktion der mit Peroxidase gekoppelten Proteine und der immunfluoreszierenden Lösung werden die Banden sichtbar und mit der Image Lab Software 5.2.1 bearbeitet.

3.2.12 Fixierung der Zellen für FACS und FISH

Zur Vorbereitung der Durchflusszytometrie und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung müssen die Zellen fixiert werden. Hierzu werden eine Million Zellen ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der entstandene Zellrasen wird mit den üblichen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt und wiederum für 48 Stunden

inkubiert. Anschließend werden die Zellen protokollgemäß abgelöst und gezählt. Zuletzt wird eine Million Zellen in 1 ml eisgekühltem 70 %-igem Methanol fixiert. Die fixierten Proben wurden zu unserem Kooperationspartner Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff nach Regensburg (Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe) geschickt, der dankenswerterweise die Durchflusszytometrie und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchführte.

3.2.13 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine wissenschaftliche Methode verschiedene Zelleigenschaften zu bestimmen. In dieser Arbeit wird die FACS-Analyse zur Ermittlung des DNA-Gehalts verwendet, um eine Aussage über eine eventuelle Zunahme der Aneuploidie treffen zu können. Die Durchflusszytometrie erfolgt im BD FACSCanto-II flow cytometer und für die Datenauswertung wird die FACSDiva Software Version 6.1.1 verwendet.

Zur Quantifizierung der Apoptoseinduktion durch die Behandlung mit den einzelnen Substanzen wird ein AnnexinV/Propidium Iodide Assay durchgeführt. Damit können die Zellen in vitale, früh und spät apoptotische Zellen eingeteilt werden. Die Zelllinien UD-SCC-5 und SAS werden nach bekanntem Schema ausgesät und behandelt. Zur Vorbereitung des nachfolgenden Aneuploidie Assays müssen die Zellen über Nacht mit 70 %-igem Methanol fixiert und schließlich DPBS mit 0,01 mg/ml RNase resuspendiert werden. Nach 30-minütiger Inkubation wird das fluoreszierende Reagenz 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die anschließende Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgt mittels eines multizyklischen Algorithmus der ModFit LT 3.2 Software.

3.2.14 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wird mittels dem gebrauchsfertigen Hybridisierungspuffer ZytoLight SPEC 13/CEN 18/SPEC 21 Triple Color Probe nach den Anwendungsrichtlinien des Herstellers ZytoVision GmbH durchgeführt und mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops Axio-Imager-Z1 analysiert.

Vor der eigentlichen Hybridisierung werden $5 \cdot 10^4$ Zellen der bereits fixierten und behandelten Zellen mit einer Zytospinzentrifuge auf einen Objektträger gespinnt. Das Prinzip der Hybridisierung besteht darin, dass die Sonden Zentromer-spezifische Regionen der Chromosomen 13, 18 und 21 erkennen. Normalerweise findet man pro Sonde zwei Signale in einem Zellkern, was als euploid bezeichnet wird. Wenn mehr Signale vorliegen und dies in mehreren Chromosomen der Fall ist, wird von einer Aneuploidie gesprochen. In Tumorzellen kann dies auch ohne Therapie bereits gehäuft vorliegen. Liegen die Chromosomen jedoch durch eine erfolgte Therapie vermehrt vor, spricht man von einer behandlungsinduzierten Polyploidisierung. Anschließend werden je 50 Zellen ausgezählt und deren fluoreszierende Signale analysiert.

3.2.15 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der immunhistochemischen Daten wird die SPSS Software 23 herangezogen. Zur Analyse der Überexpression wird der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet. Die Korrelation der einzelnen Marker wird mittels Spearman-Korrelations-Analysen getestet und die Vier-Felder-Tafel mit dem Chi-Quadrat-Test sowie dem exakten Test nach Fisher bei geringeren Fallzahlen gibt Auskunft über die Zusammenhänge der Markerexpression mit den klinischen Daten. Zuletzt wird mit Kaplan-Meier-Analysen und dem Log-rank-Test der prognostische Wert der einzelnen Marker evaluiert.

Die statistische Auswertung der Zellkulturdaten wird mittels des Prism GraphPad 6.0 durchgeführt. Hierbei werden die Ergebnisse graphisch dargestellt und der p-Wert berechnet. Die Versuche werden 3-fach unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, um eine statistische Aussage treffen zu können. Der ungepaarte t-Test gibt Rückschlüsse auf die Signifikanz der unterschiedlichen Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Höhe des daraus resultierenden p-Wertes ergibt das Signifikanzniveau, wobei $< 0,05$ als signifikant angenommen wird.

p-Wert	Signifikanzniveau
$p < 0,05$	* signifikant
$p < 0,01$	** sehr signifikant
$p < 0,001$	*** höchst signifikant

Tabelle 26: Definition des Signifikanzniveaus

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Kollektivs

Charakteristika	Daten	
Alter		
Mittleres Alter	56 Jahre	
Spanne	30 - 77 Jahre	
Geschlecht		
Männlich/ Weiblich	229 / 40	85,1 % / 14,9 %
Tabakkonsum		
Raucher/ Nichtraucher	181 / 44	67,3 % / 16,4 %
keine Angaben	44	16,3 %
Alkoholmenge		
regelmäßig/ nicht regelmäßig	159 / 45	59,1 % / 16,7 %
keine Angaben	65	24,2 %
TNM-Klassifikation		
pT-Klassifikation		
pT1	35	13,0 %
pT2	77	28,6 %
pT3	76	28,3 %
pT4	80	29,7 %
fehlende Angaben	1	0,4 %
pN-Klassifikation		
pN0/ pN+	108	40,1 %
pN1	33	12,3 %
pN2a	4	1,5 %
pN2b	64	23,8 %
pN2c	55	20,4 %
pN3	2	0,7 %
fehlende Angaben	3	1,2 %
cM-Klassifikation		
cM0	260	96,7 %
M1	7	2,6 %
fehlende Angaben	2	0,7 %
Grading		
G1/ G2/ G3	16 / 152 / 100	5,9 % / 56,5 % / 37,2 %
fehlende Angaben	1	0,4 %

Charakteristika	Daten	
anatomische Lokalisation		
Mundhöhle	40	14,9 %
Oropharynx	104	38,7 %
Hypopharynx	50	18,6 %
Larynx	75	27,9 %

Tabelle 27: Charakterisierung des Kollektivs

4.2 Nachweis AurkA-Polymorphismus, Immunhistochemie

Anders wie bei den immunhistochemischen Färbungen wurden für das Vorliegen des AurkA Polymorphismus als Vergleichsgewebe Tonsillektomiepräparate von gesunden Patienten verwendet um eine Keimbahnmutation ausschließen zu können. Hier zeigte sich ein Vorliegen des Polymorphismus bei Gesunden von Phe/Phe 69/105 (65,7 %), Phe/Ile 36/105 (34,3 %), Ile/Ile 0/105 (0 %) und im Tumorgewebe von Phe/Phe 56/115 (48,7 %), Phe/Ile 56/115 (48,7 %), Ile/Ile 3/115 (2,6 %).

Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben wurde das Signifikanzniveau für die Expression der nachstehenden Marker im Tumorgewebe gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die Aurora-Kinase A im Tumor signifikant überexprimiert war ($p < 0,0001$). Zudem konnte eine Überexpression von Survivin ($p = 0,011$), p-Histon H3 Ser 10 ($p = 0,021$) und p-Akt ($p = 0,003$) gezeigt werden. Da die Färbung von Aurora-Kinase B im Normalgewebe nicht gelang, konnte hier keine Berechnung erfolgen.

Bei Korrelationsanalysen mittels Spearman-Korrelations-Analysen zeigten sich Korrelationen zwischen den Markern AurkB und AurkA, AurkB und p-Histon H3 Ser 10 und ebenso zwischen den Markern Survivin und p-Akt Ser 473. Bei den genannten Markerkombinationen fand sich ein signifikant positiver Korrelationskoeffizient.

	AurkA PM	AurkA	AurkB	Survivin	p-Histon H3 Ser 10	p-Akt Ser 473
AurkA PM		0,442 (n)	0,183 (n)	0,356 (n)	0,388 (n)	0,62 (p)
AurkA	0,442 (n)		< 0,001 (p)	0,430 (p)	0,704 (p)	0,418 (p)
AurkB	0,183 (n)	< 0,001 (p)		---	< 0,001 (p)	---
Survivin	0,356 (n)	0,430 (p)	---		0,679 (p)	< 0,001 (p)
p-Histon H3 Ser 10	0,388 (n)	0,704 (p)	< 0,001 (p)	0,679 (p)		1,0 (p)
p-Akt Ser 473	0,62 (p)	0,418 (p)	---	< 0,001 (p)	1,0 (p)	

Tabelle 28: Spearman-Korrelation zwischen AurkA-PM, AurkA, AurkB, Survivin, p-Histon H3 Ser 10 und p-Akt Ser 473

AurkA PM: Aurora-Kinase A Polymorphismus, (p) positiver Korrelationskoeffizient, (n) negativer Korrelationskoeffizient, Signifikanzniveau: 0,05

Bei Korrelationsanalysen mit den Risikofaktoren Nikotin und Alkohol war der Expressionsstatus von p-Histon H3 Ser 10 und die klinische Variable Nikotin negativ signifikant miteinander verknüpft.

Marker	Alkohol	Nikotin
AurkA PM	0,615 (n)	0,180 (p)
AurkA	0,629 (p)	0,389 (n)
AurkB	0,731 (p)	0,818 (p)
Survivin	0,214 (n)	0,511 (n)
p-Histon H3 Ser 10	0,866 (n)	0,014 (n)
p-Akt Ser 473	0,717 (n)	0,542 (n)

Tabelle 29: Spearman-Korrelation der Marker mit den Risikofaktoren Alkohol und Nikotin

(p) positiver Korrelationskoeffizient, (n) negativer Korrelationskoeffizient, Signifikanzniveau: 0,05

Weitere Zusammenhänge zwischen Markerexpression und klinischen Daten wurden durch Vier-Felder-Tafeln und Chi-Quadrat-Test, sowie bei geringerer Fallzahl mittels exaktem Test nach Fisher ermittelt. Das durchschnittliche Follow-up für die Erhebung der Daten betrug ca. 6,01 Jahre (Spanne: 0,02 – 17,81 Jahre). Der cut-off Wert für diese Einteilung wurde bei 2 gewählt. Als klinische Kategorien wurden zunächst Geschlecht, Alter und Therapie betrachtet. Korrelationen zeigten sich nur zwischen der Therapie und dem AurkA Polymorphismus bzw. p-Histon H3 Ser 10.

Marker	Geschlecht	Alter	Therapie
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
AurkA PM	0,556 (cq)	0,788 (cq)	0,044 (cq)
AurkA	0,921 (cq)	0,185 (cq)	0,842 (cq)
AurkB	0,715 (cq)	0,743 (cq)	0,812 (cq)
Survivin	0,505 (cq)	0,519 (cq)	0,082 (cq)
p-Histon H3 Ser 10	0,621 (cq)	0,588 (cq)	< 0,001 (cq)
p-Akt Ser 473	0,776 (cq)	0,137 (cq)	0,582 (cq)

Tabelle 30: Zusammenhänge zwischen Markerexpression und Geschlecht/Alter/Therapie

Chi-Quadrat-Test (cq), exakter Test nach Fisher (ef), Signifikanzniveau: 0,05

Des Weiteren zeigte sich bei der Analyse von Lokalisation, Stadium, Ansprechen auf prim. RCTx und Grading nachstehende Signifikanzen. Die Fallzahlen für Survivin und p-Akt Ser 473 waren bei den primär radiochemotherapierten Patienten für eine Berechnung zu gering.

Marker	Lokalisation	Stadium	Ansprechen RCTx	Grading
	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
AurkA PM	0,689 (cq)	0,027 (cq)	0,208 (cq)	0,917 (cq)
AurkA	0,036 (cq)	0,042 (cq)	0,265 (cq)	0,935 (cq)

Marker	Lokalisation	Stadium	Ansprechen RCTx	Grading
AurkB	0,181 (cq)	0,208 (cq)	0,054 (cq)	0,357 (cq)
Survivin	0,059 (cq)	0,034 (cq)	---	0,671 (cq)
p-Histon H3 Ser 10	0,114 (cq)	0,093 (cq)	0,861 (cq)	0,121 (cq)
p-Akt Ser 473	0,243 (cq)	0,165 (cq)	---	0,241 (cq)

Tabelle 31: Zusammenhänge zwischen Markerexpression und Lokalisation/Stadium/Ansprechen RCTx/Grading

Zudem wurden als klinische Kategorien die T-Klassifikation, die Lymphknotenmetastasierung, eine Fernmetastasierung, die Metastasierungsrate im Krankheitsverlauf, die Rezidivrate sowie die Rate an Zweitkarzinomen gewählt. Bei der Analyse von Survivin und p-Akt Ser 473 konnte bei der M-Klassifikation keine Berechnung erfolgen, da in allen Fällen M0 vorlag. Hierbei zeigten sich vor allem Signifikanzen für die Marker Survivin, p-Histon H3 Ser 10 und p-Akt Ser 473, wie der Tabelle zu entnehmen ist.

Marker	T	N	M	Rezidivrate	Metastasen	Zweitkarzinome
	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
AurkA PM	0,282 (cq)	0,629 (cq)	0,805 (cq)	0,602 (cq)	0,748 (cq)	0,315 (cq)
AurkA	0,690 (cq)	0,368 (cq)	0,601 (cq)	0,594 (cq)	0,553 (cq)	0,342 (cq)
AurkB	0,122 (cq)	0,066 (cq)	0,539 (cq)	0,819 (cq)	0,141 (cq)	0,503 (cq)
Survivin	0,042 (cq)	0,152 (cq)	---	0,724 (cq)	0,019 (cq)	0,583 (cq)
p-Histon H3 Ser 10	0,504 (cq)	0,005 (cq)	0,140 (cq)	0,905 (cq)	0,616 (cq)	0,084 (cq)
p-Akt Ser 473	0,145 (cq)	0,077 (cq)	---	0,883 (cq)	0,022 (cq)	0,130 (cq)

Tabelle 32: Zusammenhänge zwischen Markerexpression und TNM-Klassifikation/Rezidivrate/Metastasen/Zweitkarzinome

Kaplan-Meier-Analysen und Log-rank-Tests wurden zur Evaluation des prognostischen Wertes der verschiedenen Marker durchgeführt. Auch hier wurde ein

cut-off Wert von 2 gewählt. Unter den Markern konnte sich AurkB und p-Akt Ser 473 als Prognosemarker beweisen. Bei einer Überexpression dieser Marker fand sich ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben.

Marker	DFS	OS
AurkA PM	0,671	0,783
AurkA	0,653	0,505
AurkB	0,055	0,018
Survivin	0,311	0,079
p-Histon H3 Ser 10	0,427	0,691
p-Akt Ser 473	0,139	0,017

Tabelle 33: Zusammenhang der Markerexpression mit dem disease free survival (DFS) und dem overall survival (OS)

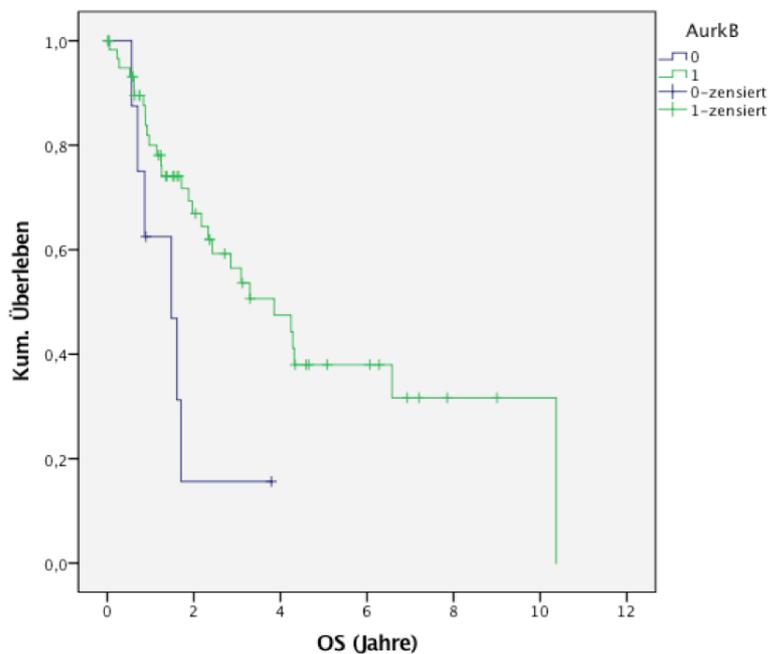


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse der AurkB-Expression

0: < 10 % positive Zellen
 1: > 10 % positive Zellen

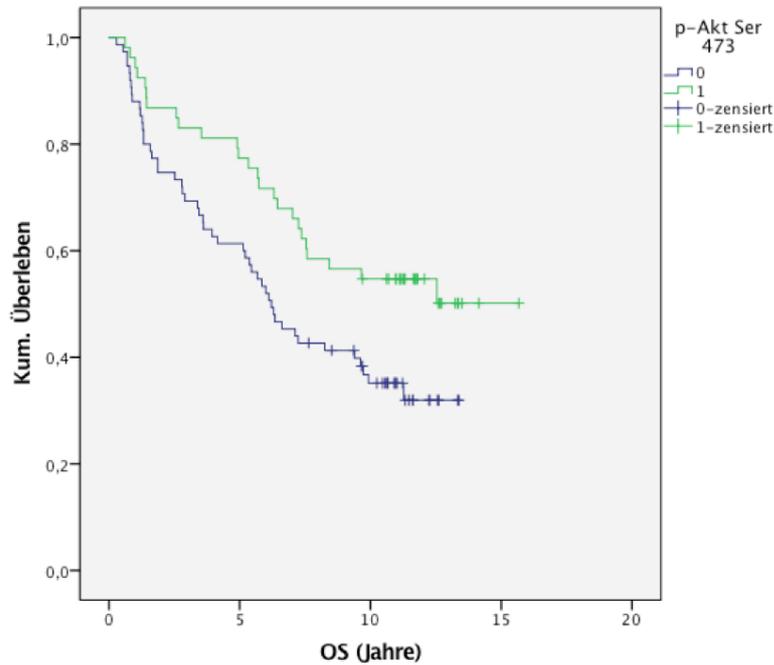


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Analyse der p-Akt Ser 473-Expression

0: < 10 % positive Zellen

1: > 10 % positive Zellen

Zur Evaluation von Hochrisikogruppen wurden Markerkombinationen mit dem Überleben verglichen. Es zeigte sich, dass die Kombinationen AurkA + Survivin bzw. p-Akt Ser 473 allesamt ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen, während eine zeitgleich hohe Expression von AurkA + AurkB ein besseres Überleben lieferte.

Marker	DFS	OS
PM - AurkA	0,185	0,343
AurkA - AurkB	0,262	0,044
AurkB - p-Histon H3 Ser 10	0,339	0,269

Marker	DFS	OS
AurkA - Survivin	0,107	0,020
AurkA - p-Akt Ser 473	0,221	0,031

Tabelle 34: Zusammenhang der Expression von Markerkombinationen mit dem disease free survival (DFS) und dem overall survival (OS);
PM = AurkA-Polymorphismus

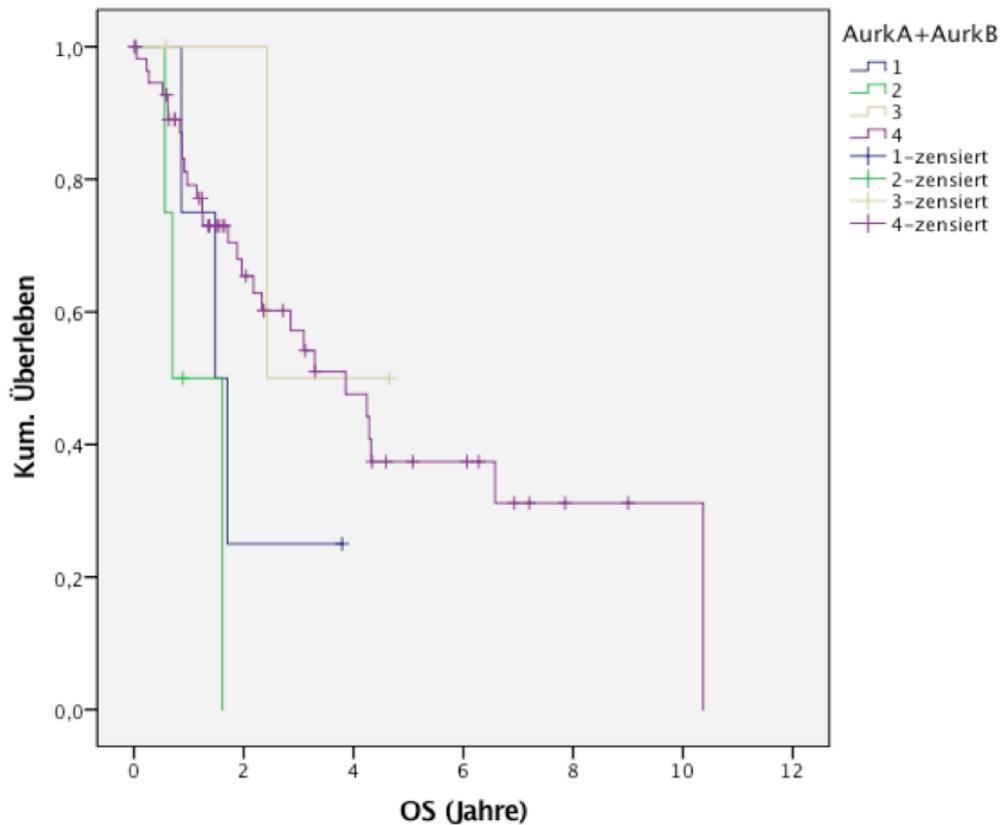


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Analyse vom Expressionsstatus der Aurora-Kinasen A und B

1=AurkA+AurkB nicht exprimiert, 2=AurkA nicht exprimiert, AurkB überexprimiert, 3=AurkA überexprimiert, AurkB nicht exprimiert, 4=AurkA+AurkB überexprimiert

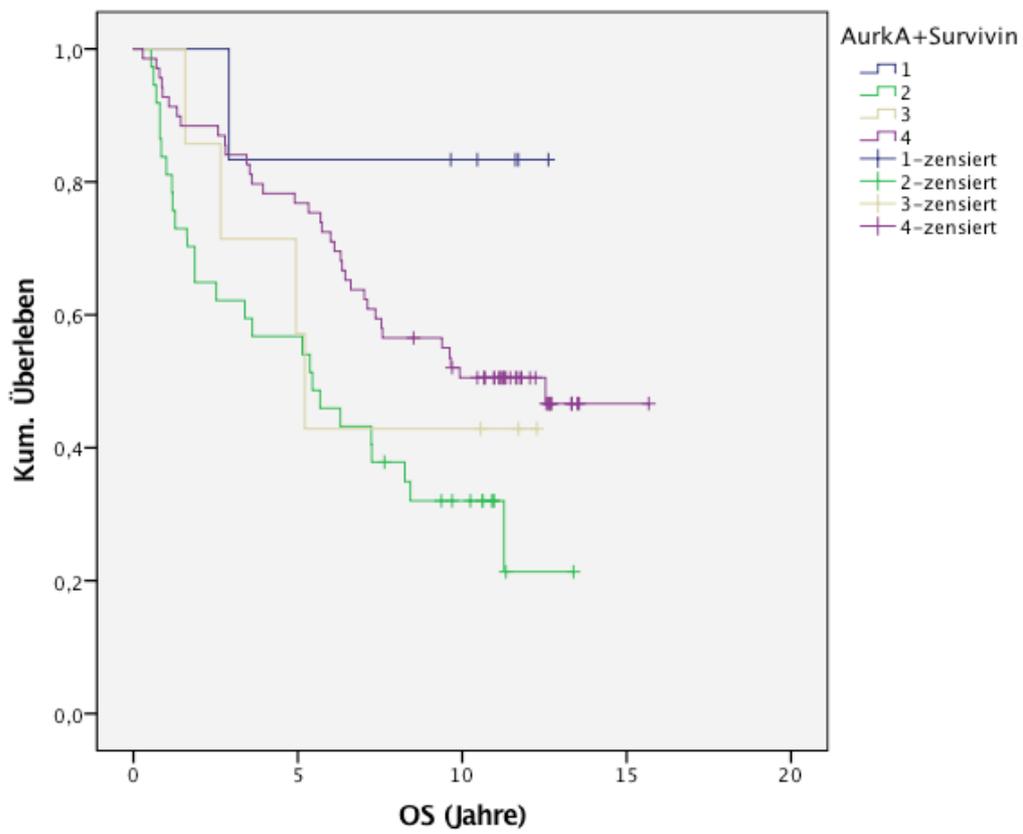


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Analyse vom Expressionsstatus der Aurora-Kinase A und Survivin

1=AurkA+Survivin nicht exprimiert, 2=AurkA nicht exprimiert, Survivin überexprimiert, 3=AurkA überexprimiert, Survivin nicht exprimiert, 4=AurkA+Survivin überexprimiert

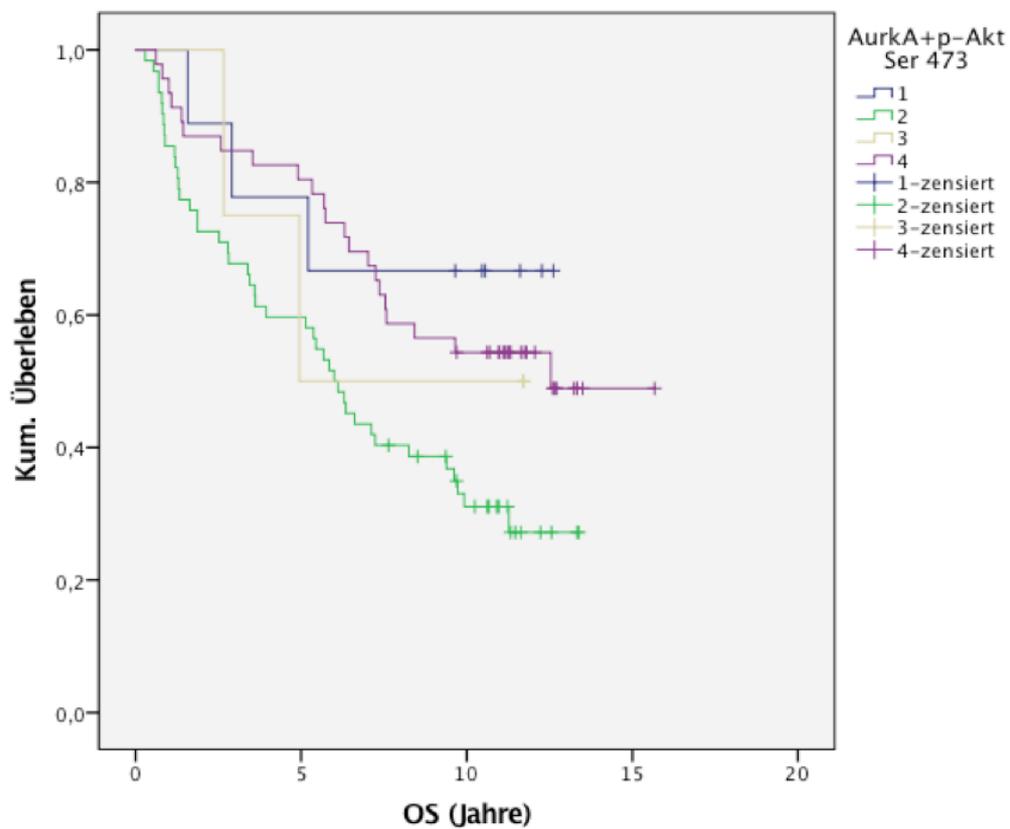


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Analyse vom Expressionsstatus der Aurora-Kinase A und p-Akt Ser 473

1=AurkA+p-Akt Ser 473 nicht exprimiert, 2=AurkA nicht exprimiert, p-Akt Ser 473 überexprimiert, 3=AurkA überexprimiert, p-Akt Ser 473 nicht exprimiert, 4=AurkA+p-Akt Ser 473 überexprimiert

Exemplarisch für die immunhistochemischen Färbungen, die für diese Arbeit angefertigt wurden, zeigen die folgenden Abbildungen für Aurora-Kinase A und B gefärbtes Normal- und Tumorgewebe. Des Weiteren wurden Färbungen von p-Akt Ser 473, EGFR, Survivin und p-Histon H3 Ser 10 durchgeführt.

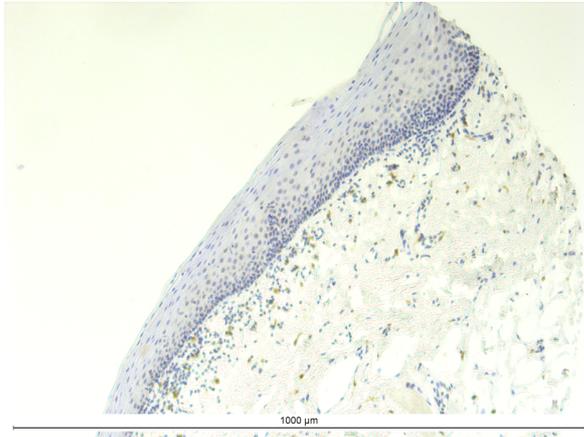


Abbildung 13: Normalgewebe AurKA

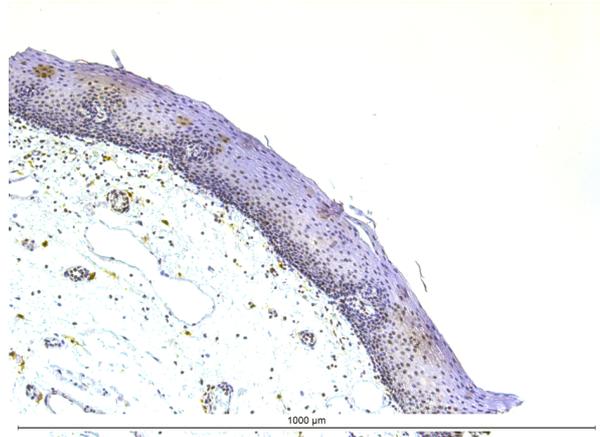


Abbildung 14: Normalgewebe AurKB

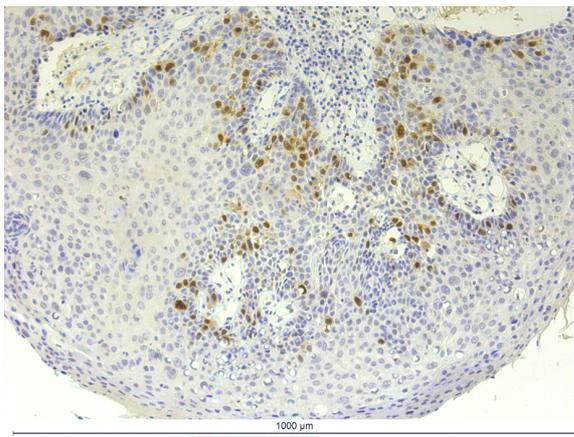


Abbildung 15: Tumorgewebe AurKA

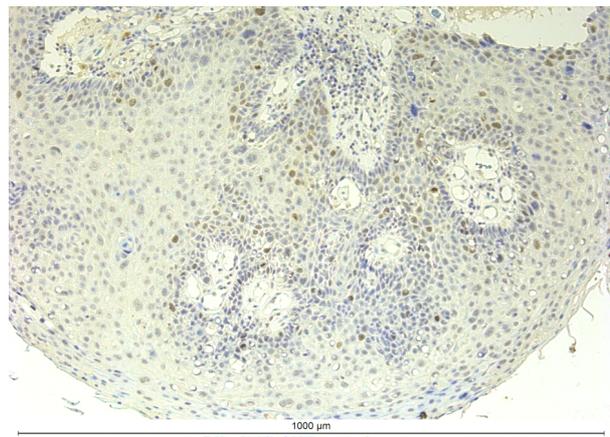


Abbildung 16: Tumorgewebe AurKB

4.3 AurKA-Polymorphismus

Neben den 4 verwendeten Zelllinien wurde auch das oben beschriebene Patientenkollektiv hinsichtlich des Aurora-Kinase A Polymorphismus untersucht und charakterisiert. Der bereits in der Einleitung beschriebene Polymorphismus der Aurora-Kinase A wurde mittels DNA-Isolierung aus FFPE-Material und PCR

nachgewiesen. Zuerst wurde die DNA der Zelllinien extrahiert und anschließend eine spezifische PCR für die Aurora-Kinase A am Genlocus Phe31Ile durchgeführt.

Die Zelllinien konnten mittels eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) betreffend des Aurora-Kinase A Polymorphismus in homozygot (Phe/Phe) und heterozygot (Phe/Ile) eingeteilt werden. Das 165 Basenpaar lange PCR-Produkt, welches die Aurora-Kinase A kodiert, wurde mit dem Enzym Apol verdaut.

Wie aus der unteren Grafik zu entnehmen ist, wurden UD-SCC-5 und Cal27 als homozygot (Phe/Phe) und SAS und HN als heterozygot (Phe/Ile) klassifiziert. Beim untersuchten Kollektiv fand sich eine Verteilung von Phe/Phe, Phe/Ile zu Ile/Ile von 48 %, 49 % zu 3 % im Tumor im Gegensatz zu 67 %, 33 % zu 0 % im Normalgewebe.

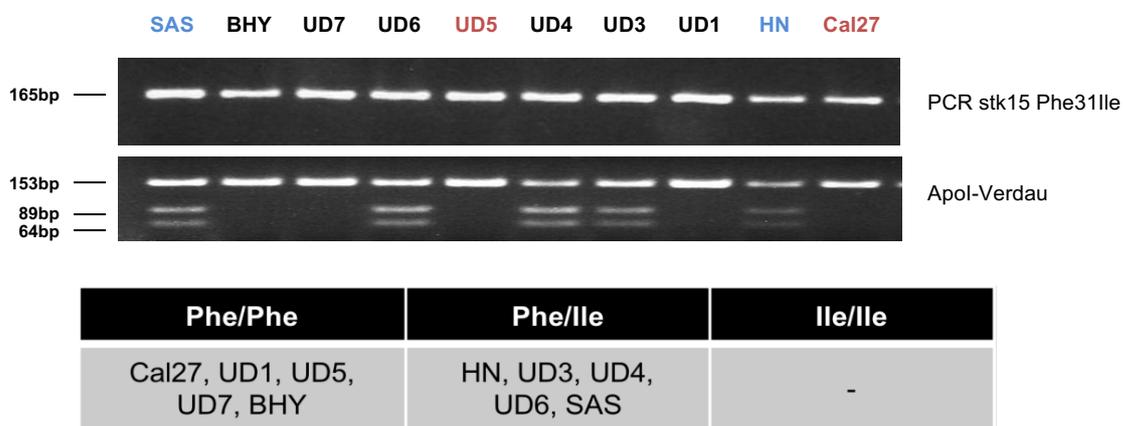


Abbildung 17: Charakterisierung der Zelllinien nach deren AurkA-Polymorphismusstatus

4.4 Strahlenkinetik

Um das in der Literatur beschriebene unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien auf Bestrahlung zu testen, wurde eine Strahlenkinetik angefertigt. Die Zellen wurden mit einer Dosis von 0-16 Gy dreimal unter denselben Bedingungen bestrahlt und anschließend der Mittelwert aus den erhaltenen Werten gebildet. Die angegebenen IC50-Werte geben jene Strahlendosis wieder, bei der durchschnittlich 50 % der Zellen überlebt haben.

Die beiden homozygoten Zelllinien sprachen gut auf die Bestrahlung an, was daran zu erkennen ist, dass die Bestrahlungsintensität von 4 Gy nur mehr von 50 % der Zellen

überlebt wurde. Die eigentliche therapeutische Bestrahlungsdosis von 2 Gy wurde von etwa 75 % der Zellen überlebt.

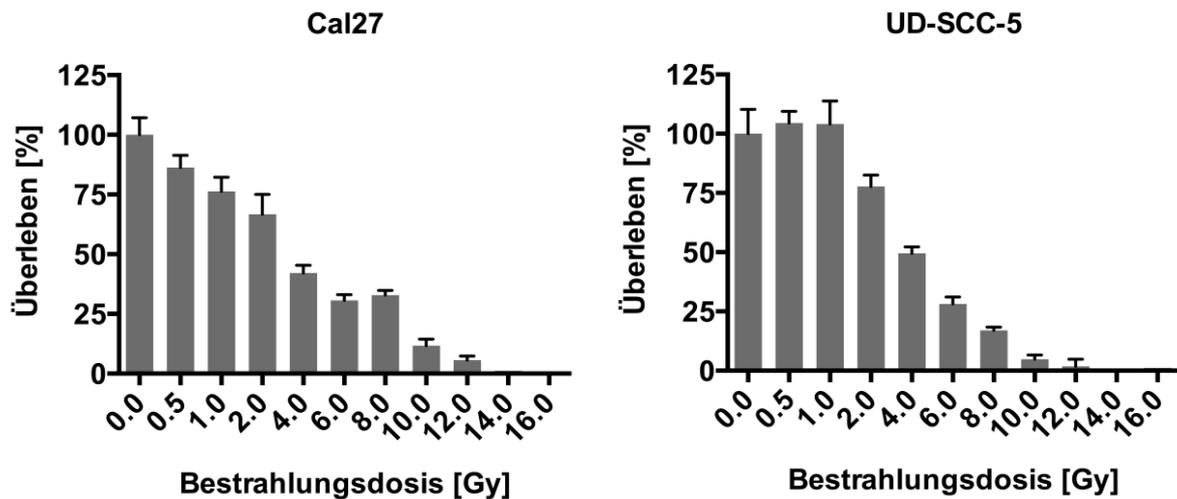


Abbildung 18: Strahlenkinetik der homozygoten (AurkA Phe/Phe) Zelllinien

Die Strahlenkinetik der heterozygoten Zellen ergab ein weitaus nicht so homogenes Bild. Das Ansprechen von HN auf die Bestrahlung war am deutlichsten ersichtlich, da die Dosis 2 Gy lediglich von 50 % der Zellen überlebt wurde. SAS verhielt sich gegenteilig zu den anderen Zelllinien. Erst eine Strahlendosis von 6 Gy zeigte ein Ansprechen der Zellen, wobei ca. 25 % der Zellen abstarben.

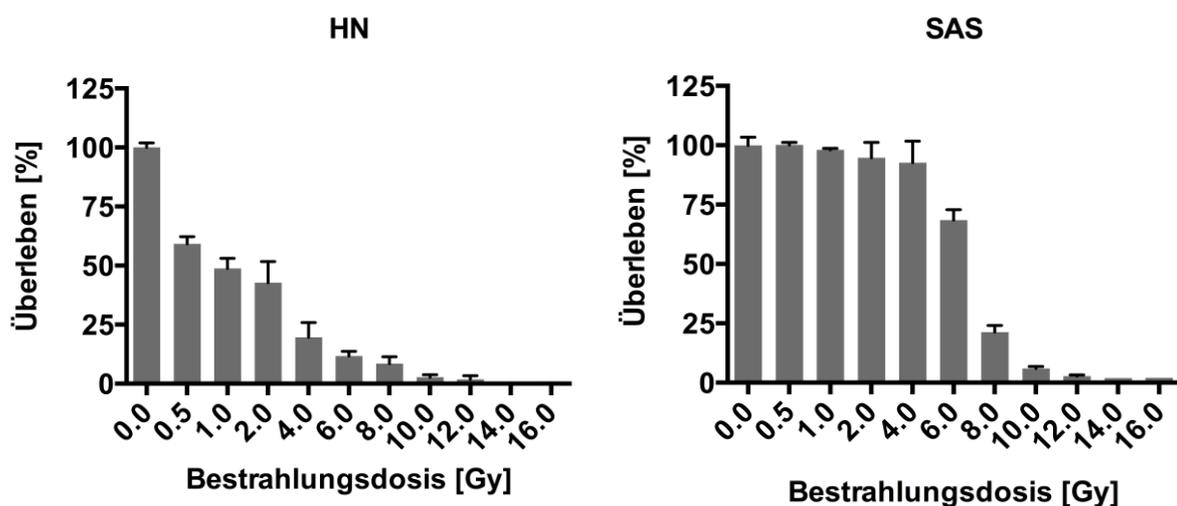


Abbildung 19: Strahlenkinetik der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien

4.5 Konzentrationskinetik

Neben einer Strahlenkinetik wurde zur Vorbereitung der Hauptversuche eine Konzentrationskinetik jeder verwendeten Substanz angefertigt. Diese Kinetiken gaben Auskunft über das Ansprechen der Inhibitoren und waren somit unerlässlich zur Bestimmung der Behandlungskonzentrationen in den Hauptversuchen. Die folgenden Abbildungen zeigen die Kinetiken der vier Substanzen und deren Wirkung auf die jeweiligen Zelllinien.

Der selektive Aurora-Kinase A Inhibitor Alisertib wirkt im Allgemeinen erst bei höheren Konzentrationen. Bei den Zelllinien Cal27 und SAS überlebten ca. 75 % der Zellen die Behandlung mit 5 nM Alisertib. Ähnliche Ergebnisse fanden sich für die Zelllinien UD-SCC-5 und HN bei einer Behandlungskonzentration von 10 nM Alisertib.

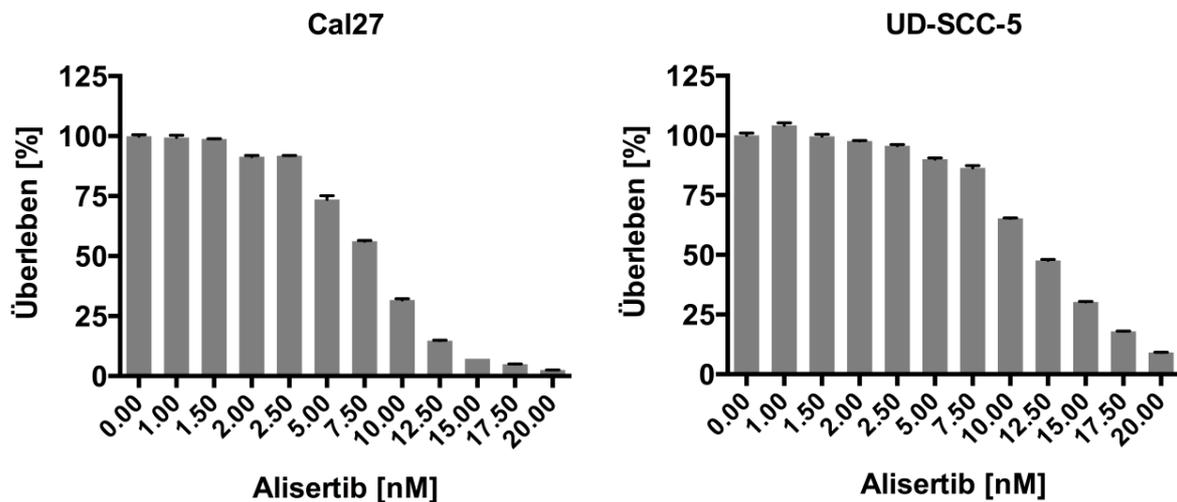


Abbildung 20: Konzentrationskinetik Alisertib der homozygoten (AurKA Phe/Phe) Zelllinien

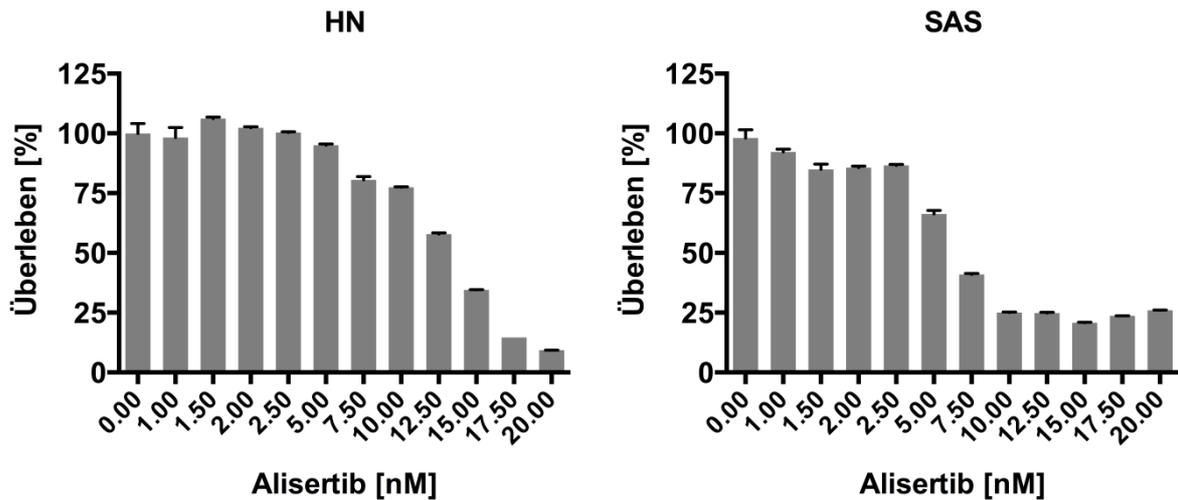


Abbildung 21: Konzentrationskinetik Alisertib der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien

Der selektive Aurora-Kinase B Inhibitor Barasertib hingegen zeigte ein gutes Ansprechen bereits bei kleinen Behandlungskonzentrationen. Wie in den unteren Grafiken deutlich zu sehen ist, wurde eine Konzentration von 1 nM des Inhibitors Barasertib von nur 50 % der heterozygoten Zelllinien HN und SAS überlebt. Bei Cal27 genühten 1,25 nM des Inhibitors, um das Überleben um 50 % zu senken und bei UD-SCC-5 waren dazu 2,5 nM Barasertib ausreichend.

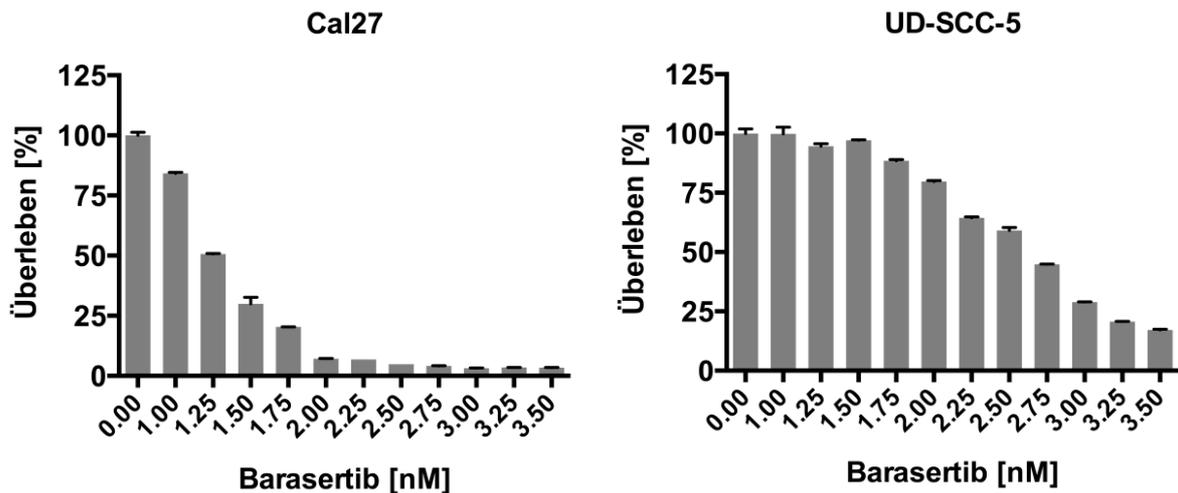


Abbildung 22: Konzentrationskinetik Barasertib der homozygoten (AurkA Phe/Phe) Zelllinien

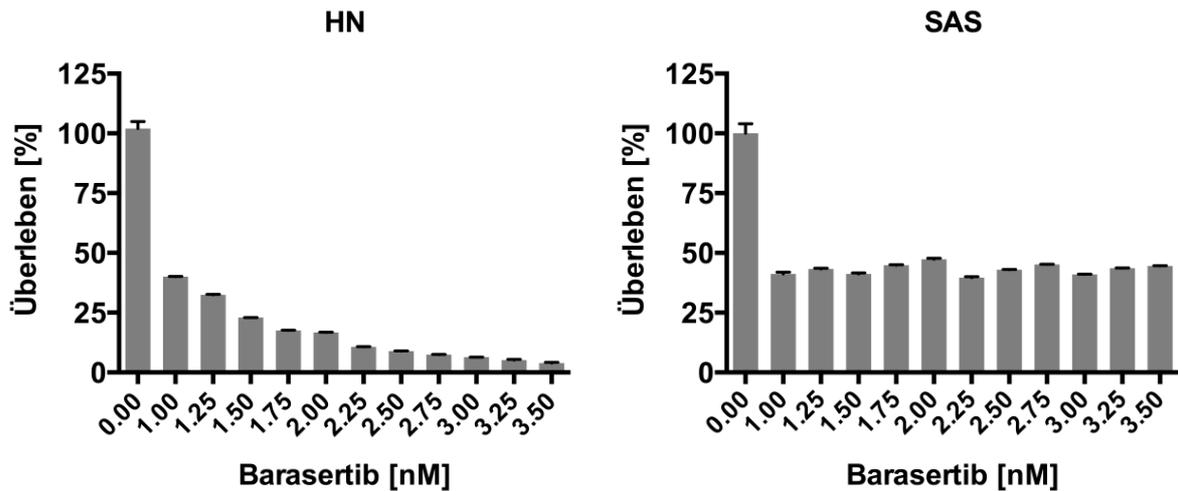


Abbildung 23: Konzentrationskinetik Barasertib der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien

Die Kinetiken des pan-Aurora-Kinase Inhibitors VX-680 zeigten sowohl bei den heterozygoten als auch bei den homozygoten Zelllinien ähnliche Verläufe. Cal27 und UD-SCC-5 zeigten ein gutes Ansprechen bei einer Behandlungskonzentration von 5 nM während bei HN und SAS, die beide mit je 2 nM VX-680 behandelt wurden, 75 % der Zellen überlebten.

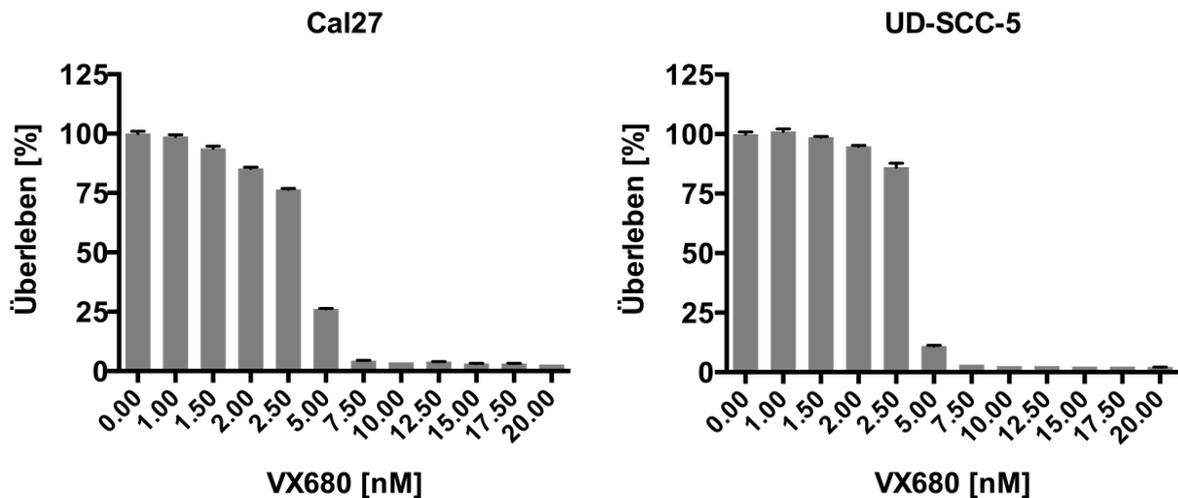


Abbildung 24: Konzentrationskinetik VX-680 der homozygoten (AurkA Phe/Phe) Zelllinien

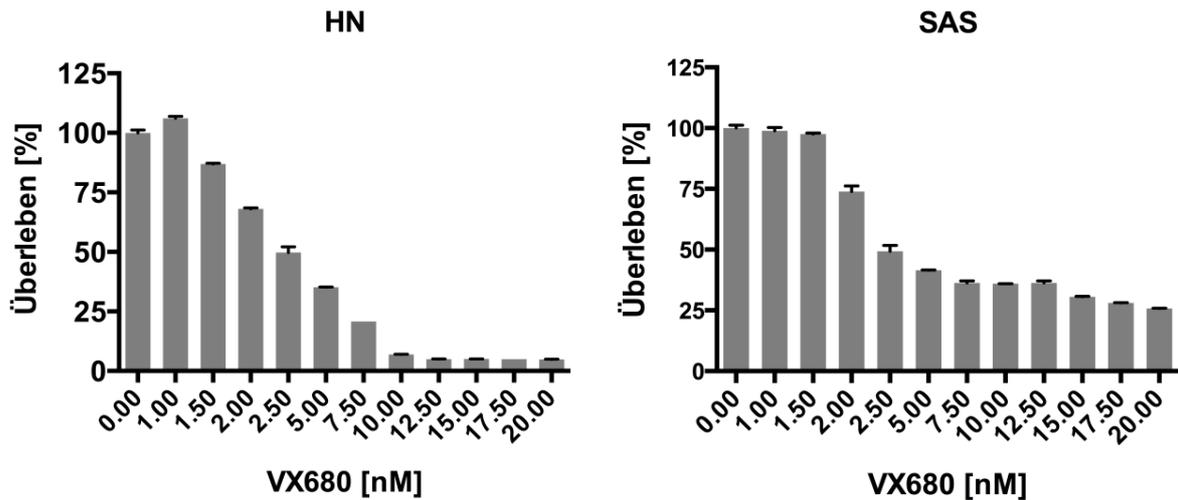


Abbildung 25: Konzentrationskinetik VX-680 der heterozygoten (AurKA Phe/Ile) Zelllinien

Die Kinetik des Spindelgifts Docetaxel, das zur Wirkverstärkung der Inhibitoren und der Bestrahlung eingesetzt wurde, zeigte eine hohe Potenz bereits bei äußerst geringen Behandlungskonzentrationen. Die beiden homozygoten Zelllinien Cal27 und UD-SCC-5 reagierten bei 0,30 nM Docetaxel mit nur mehr zirka 50 % überlebender Zellen. HN war am sensibelsten und sprach bereits bei 0,20 nM mit unter 50 % der überlebenden Zellen an. Die andere heterozygote Zelllinie SAS hingegen zeigte erst ab 0,5 nM ein Ansprechen von ca. 50 %.

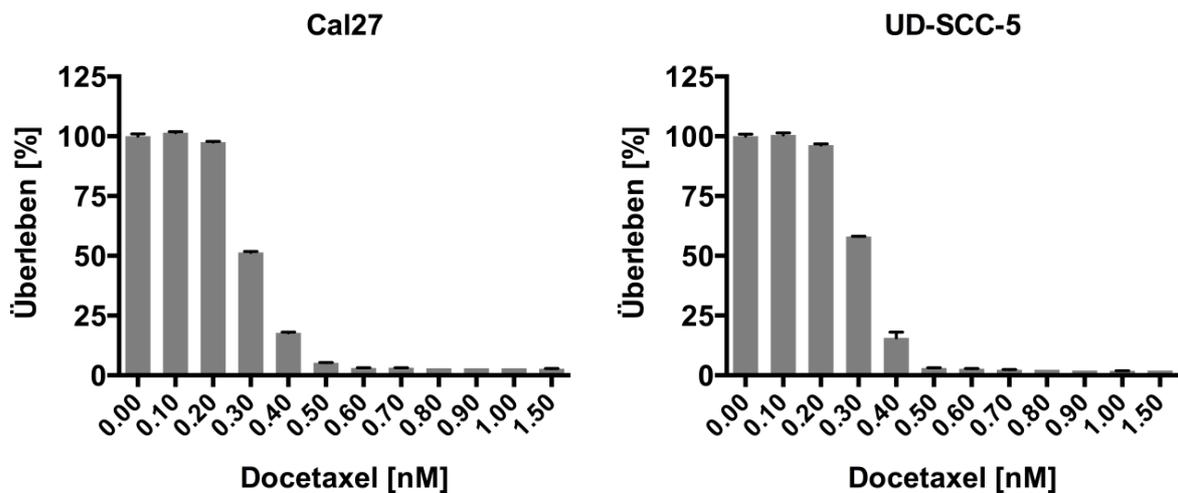


Abbildung 26: Konzentrationskinetik Docetaxel der homozygoten (AurKA Phe/Phe) Zelllinien

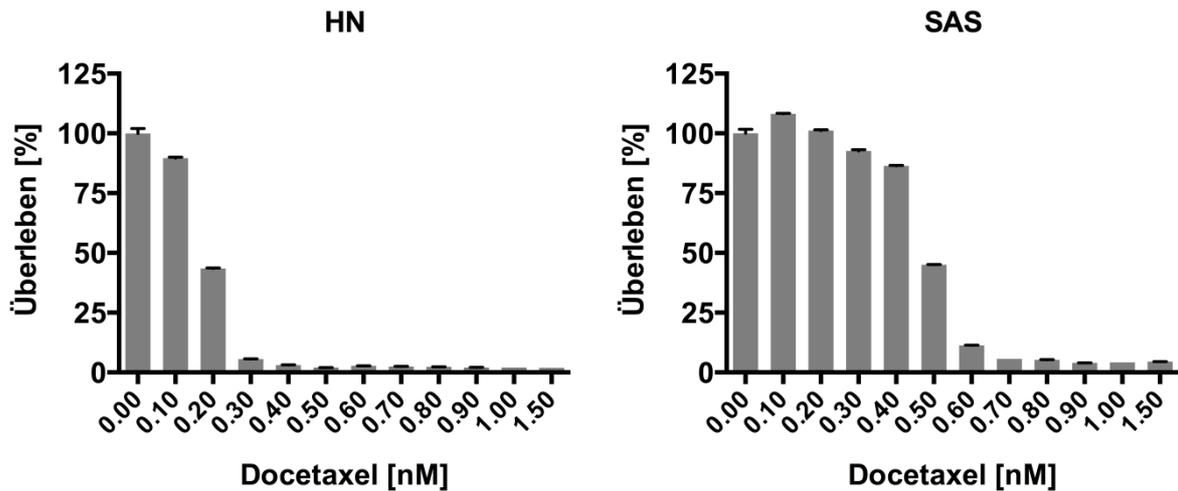


Abbildung 27: Konzentrationskinetik Docetaxel der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien

Nach der Erstellung der Konzentrationskinetiken für die einzelnen Substanzen wurden aufgrund der erhaltenen Graphen folgende Behandlungskonzentrationen für die Hauptversuche ausgewählt: 5,0 nM Alisertib, 1,0 nM Barasertib, 2,5 nM VX-680 und 0,25 nM Docetaxel. Diese Werte ergaben sich aus der Zusammenschau aller Kinetiken, bei denen über 50 % der Zellen überlebten.

4.6 Proliferationsanalysen

Nach der Auswertung der Kinetiken und der Zusammenführung aller Ergebnisse wurden UD-SCC-5 (AurkA Phe/Phe) und SAS (AurkA Phe/Ile) als aussagekräftigste Zelllinien für die weiteren Kombinationsversuche ausgewählt. Die Zellen wurden mit den oben beschriebenen Konzentrationen behandelt und danach protokollgemäß ausgewertet.

Wie die folgenden Grafiken zeigen, ergaben die Proliferationsanalysen der beiden Zelllinien interessante Unterschiede. Die homozygote Zelllinie UD-SCC-5 zeigte kein signifikantes Ansprechen bei der Behandlung mit den einzelnen Substanzen. Erst die Kombinationsbehandlung mit Docetaxel konnte die Proliferation signifikant hemmen (Alisertib/Alisertib-Docetaxel $p < 0,0001$, Barasertib/Barasertib-Docetaxel $p < 0,0014$, VX-680/VX-680-Docetaxel $p < 0,0003$).

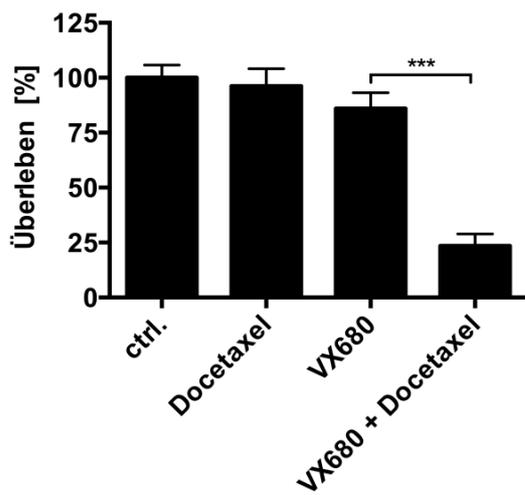
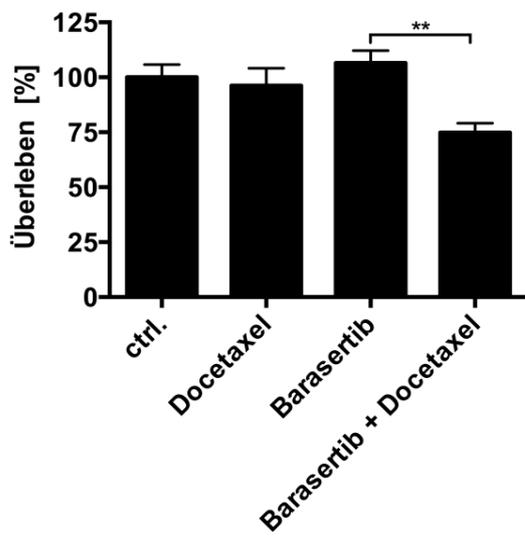
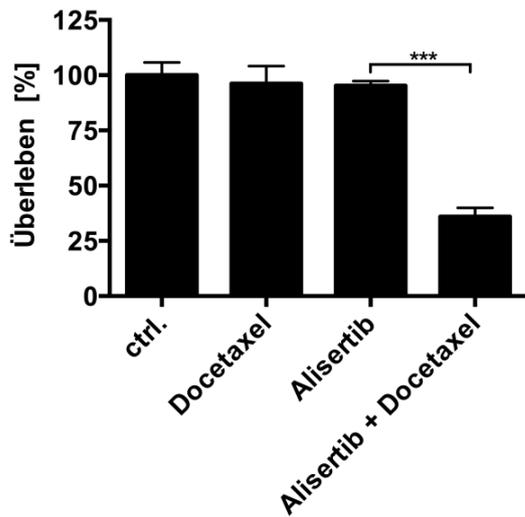


Abbildung 28: Proliferationsanalysen der homozygoten Zelllinie UD-SCC-5

Die heterozygote Zelllinie SAS hingegen zeigte eine Signifikanz des Ansprechens bereits bei der Einzelbehandlung mit den Aurora-Kinase-Inhibitoren. Die Wirkung von Alisertib alleine war jedoch deutlich schwächer ($p < 0,0192$) im Vergleich zu Barasertib ($p < 0,0001$) oder VX-680 ($p < 0,0001$) alleine. Die zusätzliche Kombinationsbehandlung mit Docetaxel zeigte nur mehr bei Alisertib eine hochsignifikante Wirkung ($p < 0,0001$). Das Spindelgift konnte die Wirkung von VX-680 auf die Proliferation von SAS nur mehr gering verbessern ($p < 0,0218$) während die Sensibilisierung von Barasertib mittels Docetaxel überhaupt nicht mehr möglich war.

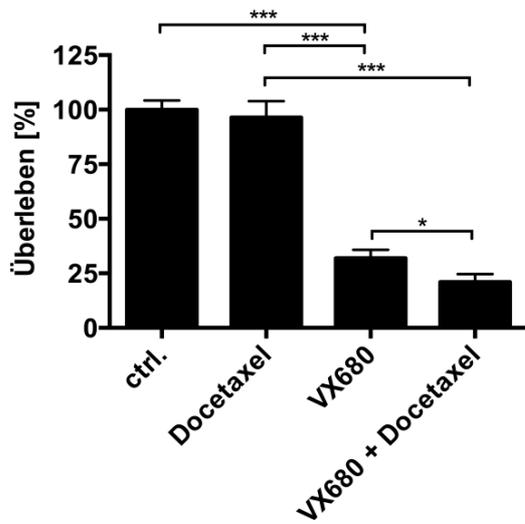
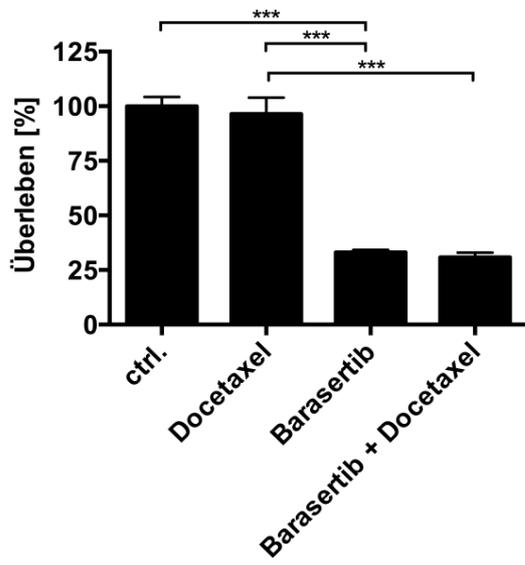
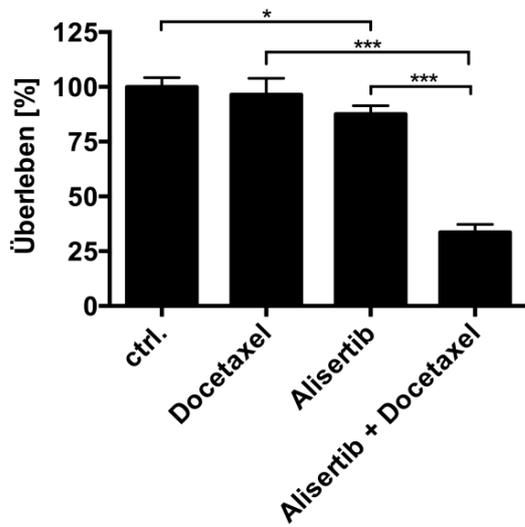


Abbildung 29: Proliferationsanalysen der heterozygoten Zelllinie SAS

Anschließend sollte ein Vergleich zur Standardtherapie des HNSCC gezogen werden, weshalb diese Versuchsreihe mit zusätzlicher Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy erneut durchgeführt wurde. Die folgenden Grafiken veranschaulichen die additive Wirkung beziehungsweise mögliche Sensibilisierung durch eine Bestrahlung.

Das Wachstum von UD-SCC-5 (AurkA Phe/Phe) konnte lediglich mittels einer Kombinationstherapie signifikant gehemmt werden. Die Kombination von Alisertib mit Docetaxel und Bestrahlung ($p < 0,035$) zeigte eine signifikante Proliferationshemmung gegenüber den nicht bestrahlten Proben. Zudem konnte bei der Kombination Barasertib und Docetaxel ($p < 0,0010$) durch die Bestrahlung eine Sensibilisierung und somit eine signifikante Wachstumshemmung beobachtet werden. VX-680 war durch die Zugabe des Spindelgifts nicht mehr zu sensibilisieren. Lediglich die Bestrahlung hemmte die Proliferation der Zellen signifikant ($p < 0,0013$).

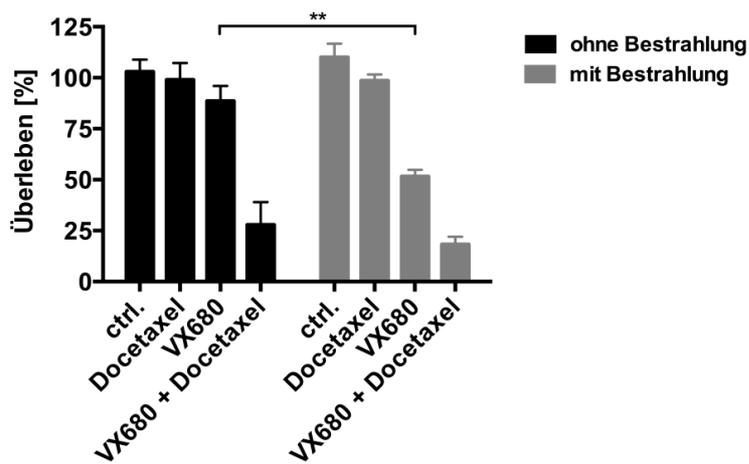
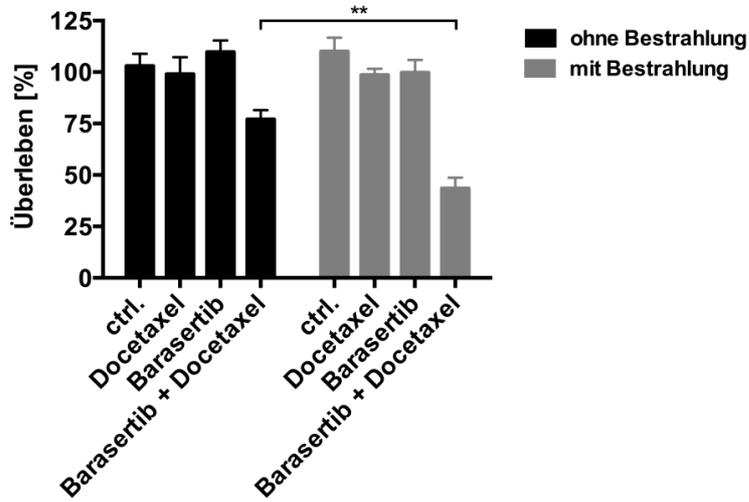
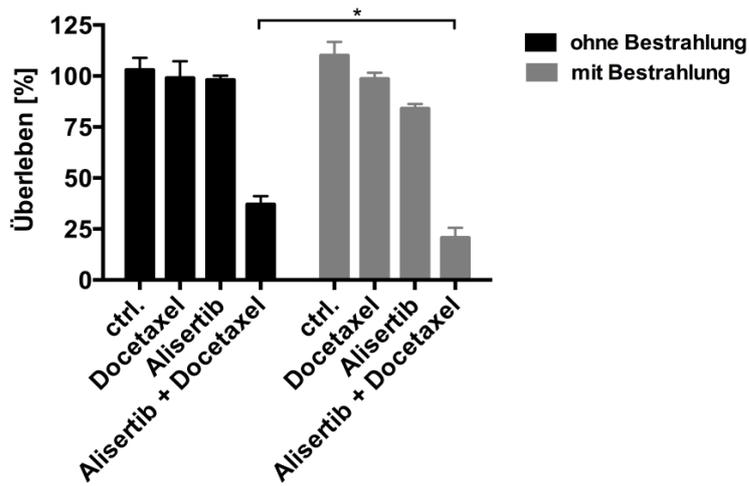


Abbildung 30: Vergleich der Proliferationsanalysen der homozygoten Zelllinie UD-SCC-5 mit und ohne Bestrahlung

Die zusätzliche Wirkung der Bestrahlung war bei der Zelllinie SAS (AurKA Phe/Ile) nur mehr bei Alisertib ($p < 0,0011$) als auch bei Alisertib und Docetaxel ($p < 0,0081$) signifikant nachweisbar. Die Substanzen Barasertib und VX-680 waren hier schon alleine ausreichend wirksam, so dass die Zugabe von Docetaxel oder die Bestrahlung keinen weiteren Effekt mehr zeigten.

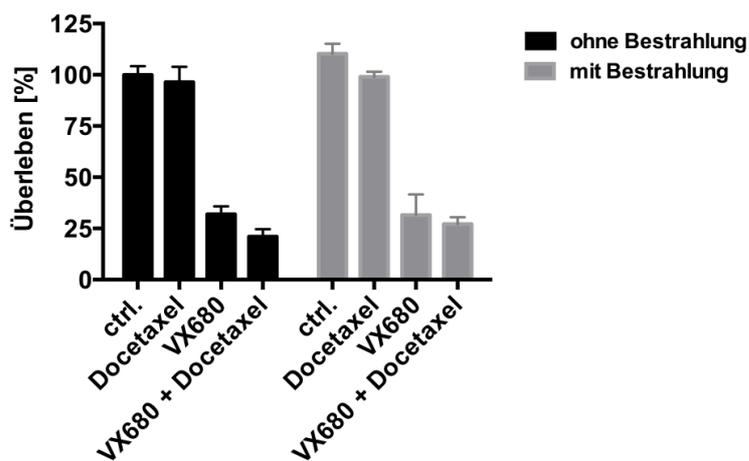
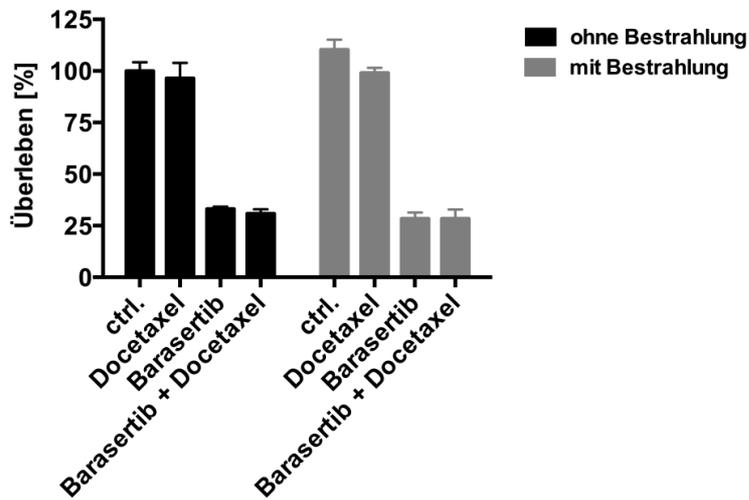
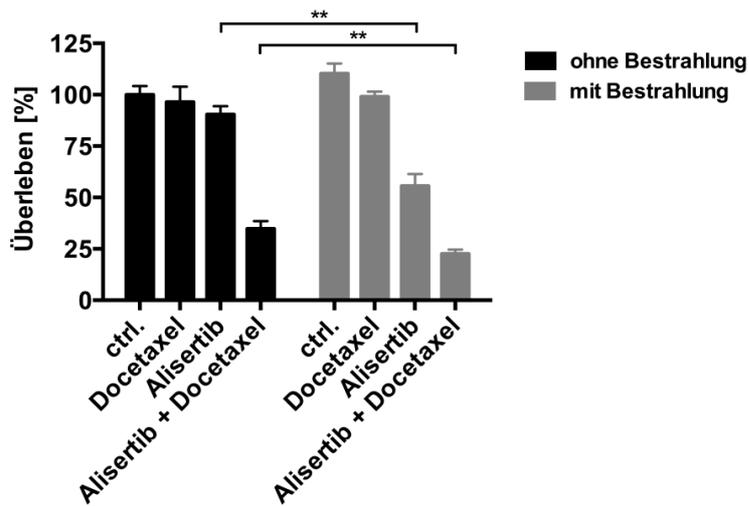


Abbildung 31: Vergleich der Proliferationsanalysen der heterozygoten Zelllinie SAS mit und ohne Bestrahlung

4.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (fluorescence-activated cell sorting) genannt, ist ein Verfahren, das unter anderem zur Bestimmung des DNA-Gehalts verwendet wird. Dies soll den Zusammenhang zwischen dem AurkA-Polymorphismus und den potentiellen Veränderungen des DNA-Gehalts aufzeigen. Diese Analyse wurde wiederum mit den Zelllinien UD-SCC-5 und SAS jeweils dreimal durchgeführt.

Die folgenden beiden Grafiken veranschaulichen den Unterschied des DNA-Gehalts anhand der prozentualen Chromosomenverteilung, der durch die jeweilige Behandlung mit den Substanzen alleine oder kombiniert mit Docetaxel hervorgerufen wurde. Die Chromosomenverteilung von UD-SCC-5 war durchweg diploid mit einem kleinen Anteil an tetraploiden Zellen, wie es für einen malignen Zellverband zu erwarten ist. Folglich kam es durch die Inhibition zu keiner Zunahme der Aneuploidie.

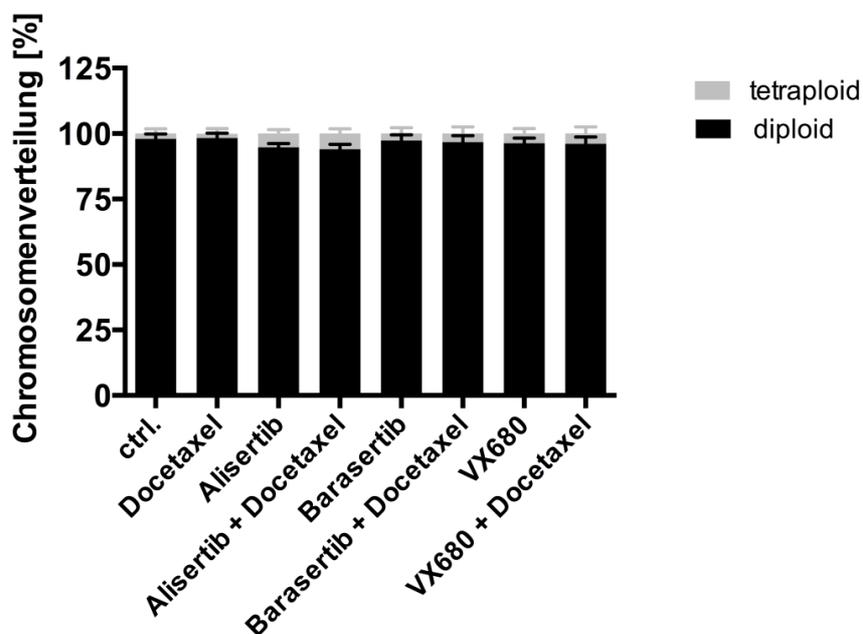


Abbildung 32: Durchflusszytometrie UD-SCC-5

Die heterozygote Zelllinie SAS zeigte ein gänzlich gegensätzliches Bild. Es kam zur Zunahme von tetraploiden und zur Bildung von oktaploiden Zellen, was für eine deutliche Zunahme der Aneuploidie spricht. Durchschnittlich 20 % der Chromosomen der mit Alisertib oder VX-680 behandelten Zellen waren tetraploid. Besonders die

Inhibition mit Barasertib zog die Entwicklung von ca. 60 % oktaploiden und weiteren 25 % tetraploiden Chromosomen nach sich.

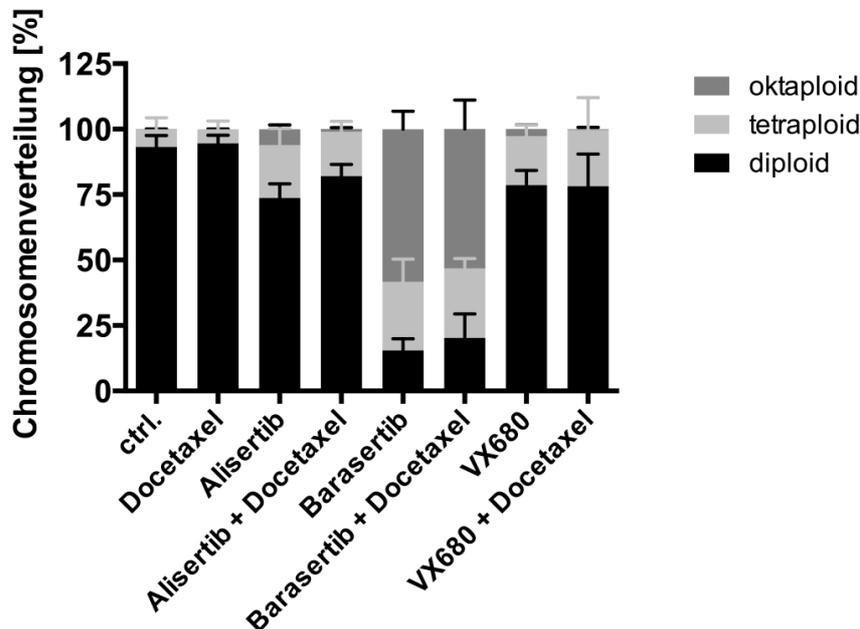


Abbildung 33: Durchflusszytometrie SAS

4.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Ergebnisse der FACS-Analysen zogen die Durchführung einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Bestätigung nach sich. Es galt die Vermutung der Induktion einer Aneuploidie durch die spezifischen Inhibitoren bildlich darzustellen. Die folgende Darstellung und die dazugehörige Tabelle zeigen eine stabile Situation der Chromosomenverteilung bei der homozygoten Zelllinie UD-SCC-5. Die Chromosomenanzahl war normal und hat sich durch die Zugabe der Substanzen Alisertib, Barasertib und VX-680 in bekannter Konzentration nicht wesentlich verändert, sodass man nicht davon ausgehen kann, dass in dieser homozygoten Zelllinie durch die Inhibition Aneuploidie induziert wird.

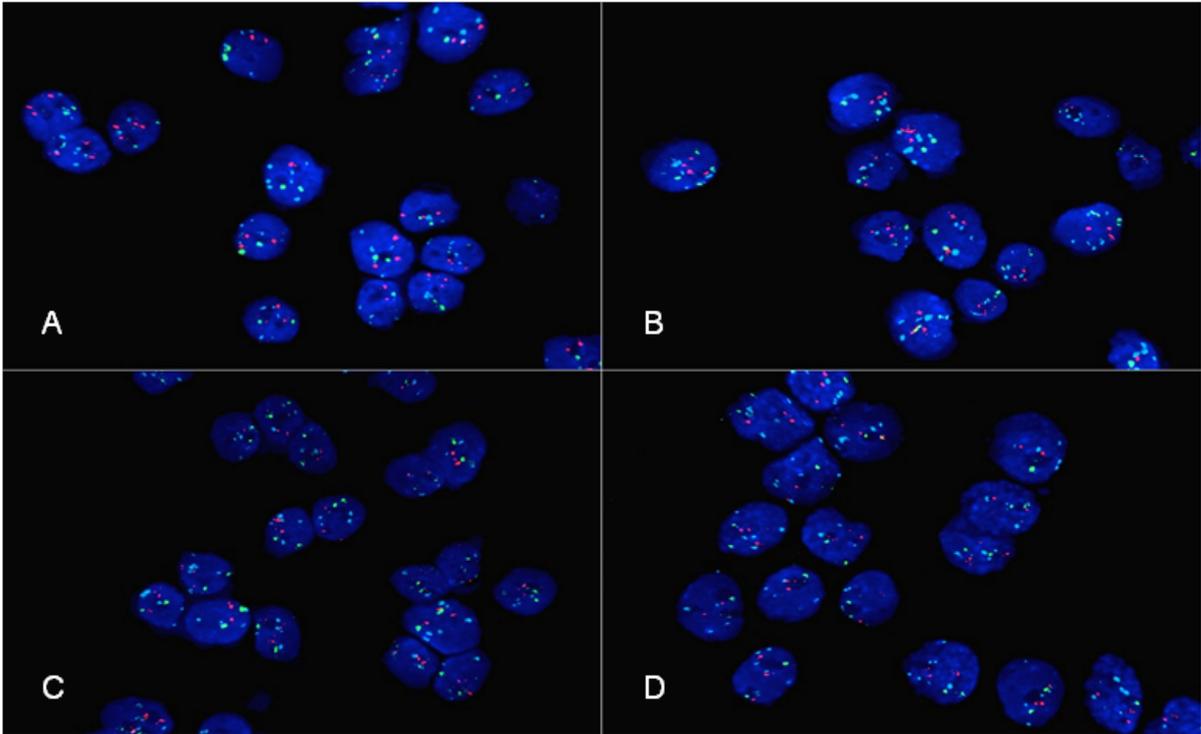


Abbildung 34: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung UD-SCC-5 (Aurka Phe/Phe)

A: ctrl, B: Alisertib, C: Barasertib, D: VX680

Probe	Zellzahl	Zen. 21 rot	Chr.- Anzahl	Zen. 13 grün	Chr.- Anzahl	Zen. 18 blau	Chr.- Anzahl
UD5 ctrl.	50	130	2,60	104	2,08	238	4,76
UD5 + Alisertib	50	128	2,65	96	1,92	248	4,96
UD5 + Barasertib	50	134	2,68	100	2,00	222	4,44
UD5 + VX-680	50	128	2,56	100	2,00	258	5,16

Tabelle 35: Auszählung der FISH-Analyse der homozygoten Zelllinie UD-SCC-5

Wie auch in der FACS-Analyse sichtbar war, zeigte die heterozygote Zelllinie SAS ebenso in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eine Auffälligkeit im Gegensatz zu UD-SCC-5. Die folgenden Fluoreszenzbilder zeigen, dass es bereits bei der Zugabe von Alisertib zu einer leichten Erhöhung der Chromosomenanzahl kam. Barasertib konnte jedoch nachweislich eine Aneuploidie induzieren, was an der Verdopplung aller

3 Zentromersonden zu erkennen ist. Auch in der FACS-Analyse war Barasertib jene Substanz, die für die Bildung von nicht nur tetraploiden sondern auch oktaploiden Zellen verantwortlich war.

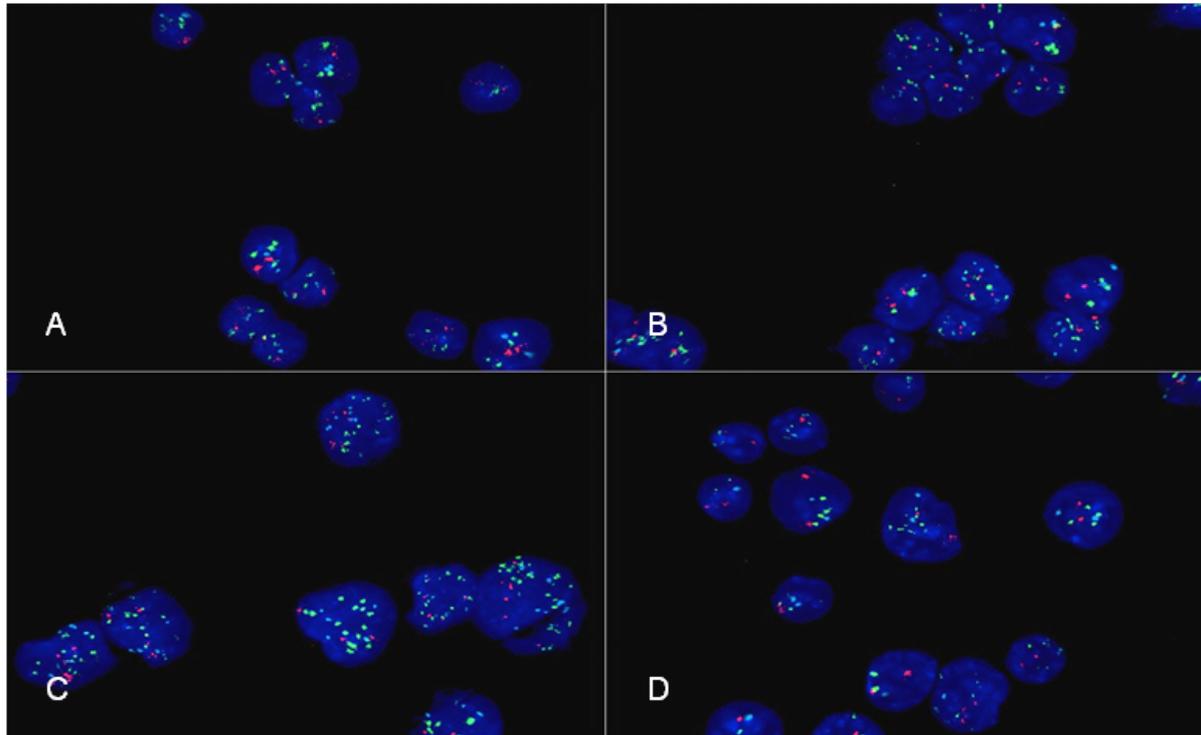


Abbildung 35: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung SAS (AurKA Phe/Ille)

A: ctrl, B: Alisertib, C: Barasertib, D: VX680

Probe	Zellzahl	Zen. 21 rot	Chr.- Anzahl	Zen. 13 grün	Chr.- Anzahl	Zen. 18 blau	Chr.- Anzahl
SAS ctrl.	50	102	2,04	168	3,36	102	2,04
SAS + Alisertib	50	114	2,28	206	4,12	116	2,32
SAS + Barasertib	50	222	4,44	386	7,72	226	4,52
SAS + VX-680	50	112	2,24	222	4,44	118	2,36

Tabelle 36: Auszählung der FISH-Analyse der heterozygoten Zelllinie SAS

4.9 Western Blot-Analysen

Der Western Blot diente der Analyse des Zellverhaltens auf Protein-Ebene. Es sollte das Grundexpressionsmuster der zuvor beschriebenen Proteine erhoben werden. Dieser Versuch wurde analog zu den Proliferationsanalysen wiederum an je einer homozygoten und einer heterozygoten Zelllinie durchgeführt, um einen guten Vergleich der biochemischen Ergebnisse zu bekommen.

Die beiden Zelllinien unterschieden sich in der Expression der Proteine ganz deutlich. Die homozygoten Zellen der Linie UD-SCC-5, bei denen man eine deutliche Expression der Aurora-Kinase A zeigen konnte, exprimierten auch die Proteine p-Akt Ser 473, p-Erk 1/2 Thr 202/Tyr 204 sowie Survivin. Die Zelllinie SAS hingegen, die den heterozygoten Polymorphismus aufweist, zeigte nur eine geringe Expression der genannten Proteine. Hier wurde eine vermehrte Expression von Aurora-Kinase B festgestellt, wodurch sich ein sehr kontroverses Muster ergab. Als Ladekontrolle wurde das Protein Tubulin (51 kDa) mitgeführt. Die folgende Abbildung zeigt die beschriebenen Ergebnisse.

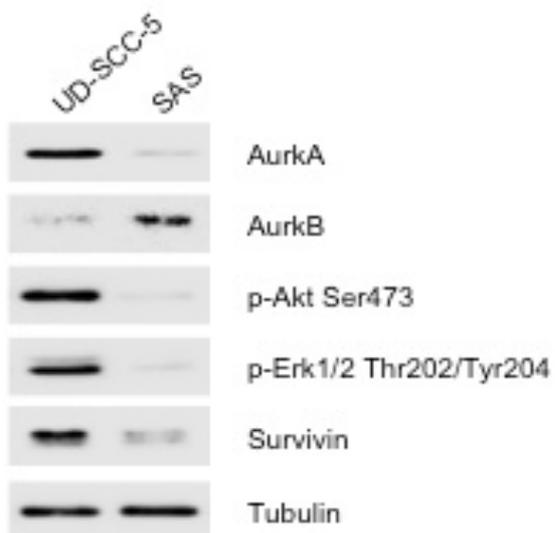


Abbildung 36: Vergleich der Western Blot-Analysen von UD-SCC-5 und SAS

5. Diskussion

Die konventionellen therapeutischen Standards eines Malignoms im Kopf-Hals-Bereich bestehend aus den Komponenten Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie haben sich in den letzten Jahren nicht wesentlich verändert (Bernier, Domenge et al. 2004). Da es auch zu keiner wesentlichen Verlängerung des Gesamtüberlebens kam, muss davon ausgegangen werden, dass diese Therapien ein durchaus limitiertes Potential aufweisen, das Leben der Patienten zu verlängern und dabei die Lebensqualität zu erhalten (Du, Peyser et al. 2014). Die TNM-Klassifikation und die histologische Differenzierung des Tumors scheinen weiterhin die einzigen verlässlichen Parameter zur Abschätzung der Prognose zu sein (Lehnerdt, Hoffmann et al. 2010). Das Verständnis molekularer Mechanismen der Pathophysiologie des HNSCC erscheint unerlässlich, um neue molekulare Marker und somit eine gezielte individuelle Therapie als neue Säule der Standardtherapie dieser Karzinome zu etablieren (Erpolat, Gocun et al. 2012). Bei verschiedenen Karzinomentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass der Rezeptorstatus und das Vorliegen von Biomarkern für die Therapie entscheidend sind. Beispiele hierfür wären Mutationen im KRAS Gen beim Kolorektalen Karzinom (Saridaki, Georgoulis et al. 2010) oder das Auftreten des Östrogen-, Progesteron- und Her2/neu-Rezeptors im Mammakarzinom (Paik, Kim et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Aurora-Kinasen und speziell den Aurora-Kinase A Polymorphismus gelegt. Sie sollten im Hinblick auf klinische und pathologische Parameter wie Gesamtüberleben und Metastasierung genauer untersucht werden. Zudem wurden Zusammenhänge mit Expressionen anderer molekularer Marker wie Survivin und p-Akt Ser 473 gesucht.

Darüber hinaus sollte mittels *in vitro* Experimenten das Ansprechen auf die Strahlentherapie in Abhängigkeit vom Aurora-Kinase A Polymorphismus untersucht und eine Verbesserung des Ansprechens mit Aurora-Kinase Inhibitoren versucht werden.

5.1 Diskussion der Methoden

Die Immunhistochemie gilt als einfaches und vor allem kostengünstiges Verfahren, weist aber auch die Einschränkung auf, dass kaum quantitative Aussagen getroffen werden können. Zudem sollte man bedenken, dass die Aussage über die gefärbten Schnitte subjektiv und somit abhängig von der befundenden Person war. Ein weiterer limitierender Faktor bei der Auswertung der immunhistochemischen Daten war die Zusammenfassung aller Tumorlokalisationen. Zudem sollte die Anzahl der Patienten des Kollektivs für die immunhistochemische Untersuchung kritisch betrachtet werden. Außerdem wurde hier für die Auswertung ein von unserer Arbeitsgruppe entwickelter Score verwendet. Dieser wird nicht von allen Arbeitsgruppen benutzt, wodurch die Ergebnisse der verschiedenen Forschungsgruppen weltweit variieren (Nylander, Dabelsteen et al. 2000).

Für die Durchführung des Crystal-Violett Proliferations-Assays wurde je eine heterozygote (SAS) und eine homozygote (UD-SCC-5) Zelllinie ausgewählt. Der gewöhnliche MTT-Assay misst die katalytische Aktivität noch lebender Zellen, wodurch die Ergebnisse bei Schwankungen dieser Aktivität beeinflusst werden können (Alley, Scudiero et al. 1988). Der Crystal-Violett Proliferations-Assay hingegen stellt eine modifizierte Form des MTT-Assays dar, bei der alle vitalen Zellen angefärbt, lysiert und dann die optische Dichte der Lösung bestimmt wird, was die beschriebenen Schwankungen ausschließt.

Die weiteren Methoden wie Western Blot oder PCR waren gut etabliert und zeigten bei Wiederholungsversuchen eine gute Reproduzierbarkeit.

5.2 Einfluss des AurkA-Polymorphismus auf das Therapieansprechen

Die Einteilung verschiedener Zelllinien nach dem AurkA-Polymorphismus in homozygot (Phe/Phe, Ile/Ile) oder heterozygot (Phe/Ile) war zentraler Bestandteil dieser Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien Cal27 und UD-SCC-5 als homozygot (Phe/Phe) und SAS sowie HN als heterozygot (Phe/Ile) eingeteilt werden können.

In unserem Patientenkollektiv konnte die homozygote Variante (Phe/Phe) im Normalgewebe mit 67 % häufiger angetroffen werden als im Tumorgewebe, wo der

Anteil 49 % ausmachte. Die zweite homozygote Variante Ile/Ile war im Normalgewebe nicht und im Tumorgewebe mit 3 % relativ selten zu finden (Pickhard, Siegl et al. 2014). In der Studie einer chinesischen Arbeitsgruppe wurde 2004 nicht nur eine Assoziation zwischen dem Genotyp der Aurora-Kinase A und dem Auftreten eines Ösophaguskarzinoms sondern auch mit dem Fortschreiten des Tumorstadiums und dem Differenzierungsgrad gefunden (Miao, Sun et al. 2004). Zudem konnte der AurkA-Polymorphismus in anderen Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom (Sun, Bai et al. 2011) und dem hepatozellulären Karzinom (Akkiz, Bayram et al. 2010) nachgewiesen werden. Die prognostische Aussagekraft der verschiedenen Varianten des AurkA-Polymorphismus bleibt jedoch umstritten, da in unserem Kollektiv beispielsweise keine Assoziation mit dem Überleben der Patienten aufgezeigt werden konnte (Pickhard, Siegl et al. 2014). Trotzdem bestätigte sich der aus der Literatur bekannte Verdacht, dass die AurkA Polymorphismusvariante Phe/Ile eine entscheidende Rolle für die Prognose der Patienten und das Ansprechen auf eine spezifische Inhibitionstherapie spielt, da wir *in vitro* nur ein signifikantes Ansprechen auf Aurora-Kinase Inhibition bei der heterozygoten Zelllinie nachweisen konnten (Tang, Qiu et al. 2013).

Auch konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass der genetische Polymorphismus der Aurora-Kinase A mit dem Ansprechen auf den monoklonalen Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (Cetuximab) zusammenhängt. Genauer gesagt sprachen genotypisch homozygote (Phe/Phe) HNSCC Zelllinien im Gegensatz zu heterozygoten (Phe/Ile) Zellen auf eine Cetuximab Monotherapie an. Eine Inhibition der Aurora-Kinase mit spezifischer siRNA in Kombination mit Cetuximab führte auch bei der heterozygoten Zelllinie ebenfalls zu einem signifikanten Ansprechen (Pickhard, Siegl et al. 2014). Für die Relevanz des AurkA Polymorphismus hinsichtlich des Therapieansprechens spricht zudem auch die Tatsache, dass bei Korrelationsanalysen in unserem Kollektiv der AurkA-Polymorphismus mit den verschiedenen Therapieoptionen ($p < 0,044$) signifikant vergesellschaftet war.

5.3 Einfluss des AurkA-Polymorphismus auf eine Strahlensensibilisierung

Die Bestrahlung als eine wichtige Säule der Standardtherapie bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich stand im Mittelpunkt der *in vitro* Experimente. Die in dieser Arbeit dargestellten experimentellen Daten lassen sich allerdings schwer in die aktuelle

Literatur einordnen, da die spezifischen Inhibitoren erstmalig an HNSCC Zelllinien in dieser Art angewendet wurden.

Die systematische Bestrahlung der ausgewählten Zelllinien zeigte ein divergentes Ansprechen der Zellen auf Radiatio, wobei besonders bei der Zelllinie HN ein gutes Ansprechen zu verzeichnen war. Die in der Literatur beschriebene Resistenz von HNSCC gegenüber ionisierender Strahlung stellt ein therapeutisches Problem dar, wodurch auch das Auftreten von Lokalrezidiven zu erklären ist (Yang, McEachern et al. 2011). Ziel der Arbeit war es deshalb durch eine Inhibition der Aurora-Kinasen eine mögliche Sensibilisierung auf Strahlentherapie zu erreichen.

In Konzentrationskinetiken wurde das Ansprechen von HNSCC Zelllinien auf die spezifische Inhibition der Aurora-Kinasen überprüft. Kollareddy et al. beschrieben bereits 2012 die Eigenschaften und limitierenden Faktoren der in klinischen Studien verwendeten Inhibitoren der Aurora-Kinasen. Allerdings wurden die Substanzen hauptsächlich bei Leukämie Zelllinien (ALL, PALL-2, MOLM13, MV4-11) und soliden Tumoren wie dem Kolonkarzinom, dem Glioblastom oder dem Neuroblastom angewendet (Kollareddy, Zheleva et al. 2012). Zudem finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass eine Kombination mit dem Spindelgift Docetaxel einen additiven Effekt hat. Diese Sensibilisierung konnte sowohl bei einer Zelllinie eines Ösophaguskarzinoms (Tanaka, Hashimoto et al. 2007) als auch bei Zellen eines Adenokarzinoms des oberen Gastrointestinaltraktes gezeigt werden (Sehdev, Katsha et al. 2013). Aus diesem Grund wurden auch in dieser Arbeit Kombinationsbehandlungen mit einer simultanen Radiatio durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei der homozygoten Zelllinie eine Sensibilisierung durch Docetaxel in Kombination mit einem Aurora Kinase Inhibitor bei simultaner Strahlentherapie. Bei der heterozygoten Zelllinie war eine Sensibilisierung durch Docetaxel nur bei Inhibition der AurkA und Radiatio möglich. Die Wirkung von Barasertib oder VX-680 war durch Docetaxel oder Strahlentherapie nicht weiter zu steigern.

Die vorher beschriebenen Interaktionen zwischen strukturell verwandten onkogenen Kinasen und den Aurora-Kinase Inhibitoren stellen einen wichtigen Grund für die Veränderung der Wirkung der Inhibitoren dar (Kollareddy, Zheleva et al. 2012). Mithilfe der vorliegenden Daten konnte ein Zusammenhang zwischen dem

AurkA-Polymorphismus und der angewandten Behandlung der Zellen (Inhibitor und/oder Sensibilisierungsgagens und/oder Bestrahlung) hergestellt werden.

5.4 Zusammenhang zwischen Aurora-Kinasen und Aneuploidie

Die beiden Aurora-Kinasen A und B stellen einen wichtigen Bestandteil des Zellteilungsprozesses dar. Während AurkA die Hauptfunktion in der Trennung der Zentrosomen übernimmt, bildet AurkB einen essentiellen Teil des Chromosomalen Passenger Komplexes und ist somit für die Kontrolle der chromosomalen Orientierung verantwortlich (Hochegger, Hegarat et al. 2013).

Bereits 1998 konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Aurora-Kinase A in Tumorzellen von Säugern die Induktion einer Aneuploidie nach sich zieht (Zhou, Kuang et al. 1998). Auch aktuellere Studien machen ein erhöhtes Level an Aurora-Kinase A im Tumor für eine abnorme Spindelbildung und Fehler bei der Zytokinese verantwortlich (Marumoto, Zhang et al. 2005).

Bei der Untersuchung der Aneuploidie mittels Durchflusszytometrie und FISH-Analysen fanden sich bei der homozygoten Zelllinie UD-SCC-5 diploide und nur selten tetraploide Zellen. Dieses Bild änderte sich auch nicht nach Zugabe der verschiedenen Inhibitoren. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei der heterozygoten Zelllinie SAS eine starke Zunahme von tetra- und oktaploiden Zellen. Die FISH-Analyse konnte hierbei die Daten der Durchflusszytometrie bestätigen. Auch hier fand sich eine Zunahme der untersuchten Chromosomen 13, 18 und 21, was vor allem nach einer Behandlung mit Barasertib sehr gut zu sehen war.

Somit ist zu mutmaßen, dass die heterozygote Variante des AurkA-Polymorphismus mit einer Aneuploidie assoziiert ist. Diese Daten können durch Vorarbeiten an den Zelllinien Cal27 (Phe/Phe) und HN (Phe/Ile) gestützt werden, bei denen aneuploide Zellen nur bei der heterozygoten Zelllinie zu finden waren. Zudem konnte die Anzahl aneuploider Zellen durch einen AurkB si-RNA-Knockdown noch signifikant gesteigert werden (Pickhard, Siegl et al. 2014). Bisläng gibt es aber keine Daten, über welchen Mechanismus die Induktion der Aneuploidie erfolgt. Reiter et al. konnten 2006 erstmals am HNSCC zeigen, dass die überexprimierte mRNA der Aurora-Kinase A mit zentrosomalen Unregelmäßigkeiten korreliert (Reiter, Gais et al. 2006). Auch andere Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen den Aurora Kinasen (Giet,

Petretti et al. 2005) und auch speziell der AurkB (González-Loyola, Fernández-Miranda et al. 2015) mit Aneuploidie finden. Diese Daten sind im Einklang mit unseren Western Blot Ergebnissen, bei denen die heterozygote und aneuploide Zelllinie SAS eine hohe Expression der Aurora-Kinase B aufwies. Allerdings existieren noch keine Daten über den Zusammenhang mit dem AurkA-Polymorphismus, was Ziel einer Folgestudie sein sollte.

5.5 Verknüpfung der Aurora-Kinasen mit Survivin und p-Akt Ser 473

Aufgrund der Komplexbildung der Aurora-Kinasen und deren Interaktion mit anderen wichtigen Zellzyklus regulierenden Proteinen sollten diese Zusammenhänge mittels immunhistochemischer Untersuchungen genauer evaluiert werden.

Das für Aurora-Kinase A gefärbte Gewebe zeigte besonders im Vergleich zwischen korrespondierendem Normal- und Tumorgewebe eine statistisch signifikante Überexpression im Tumor ($p < 0,001$). Diese Überexpression konnte bereits im HNSCC (Mehra, Serebriiskii et al. 2013) aber auch in anderen Tumorentitäten des Pankreas (Han, Bearss et al. 2002), des Ovars (Zhou, Kuang et al. 1998), des Kolons (Bischoff, Anderson et al. 1998) und der Brust (Tanaka, Kimura et al. 1999) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden Färbungen von p-Akt Ser 473, p-Histon H3 Ser 10 und Survivin durchgeführt und in die statistische Auswertung miteinbezogen. Auch diese Marker waren im Tumor signifikant überexprimiert, worauf man bereits in der Literatur Hinweise finden konnte (Erpolat, Gocun et al. 2012).

Darüber hinaus konnten signifikante Korrelationen zwischen den einzelnen Markern AurkB und AurkA ($p < 0,001$), AurkB und p-Histon H3 Ser 10 ($p < 0,001$) sowie Survivin und p-Akt Ser 473 ($p < 0,001$) gezeigt werden. Hierbei spielt die Interaktion der Moleküle eine entscheidende Rolle. Survivin ist nicht nur ein bekannter Inhibitor der Apoptose sondern auch ein Teil des Chromosomalen Passenger Komplexes (Hochegger, Hegarat et al. 2013). Demzufolge lässt sich die Interaktion von Survivin, Aurora-Kinase B und p-Histon H3 Ser 10 erklären. Das phosphorylierte Histon H3 Ser 10 wird benötigt, um den Chromosomalen Passenger Komplex zu bilden, der wiederum die Aurora-Kinase B aktiviert (Erpolat, Gocun et al. 2012). Eine Überexpression der genannten Moleküle wie wir sie im Tumor nachweisen konnten,

führt zu einer chromosomalen Instabilität und somit zur Karzinomentstehung (Erpolat, Gocun et al. 2012).

Die Relevanz des Zusammenspiels der genannten Moleküle konnte zudem durch das Aufzeigen von Hochrisikogruppen anhand von Überlebenskurven bestätigt werden. Es zeigten sich hier Signifikanzen für die Kombinationen AurkA + AurkB ($p < 0,044$), AurkA + Survivin ($p < 0,020$) sowie AurkA + p-Akt Ser 473 ($p < 0,031$), was einen Hinweis auf das molekulare Zusammenspiel geben kann.

Bei Korrelationsanalysen mit klinischen Daten zeigten sich zudem Signifikanzen zwischen dem AurkA-Polymorphismus und verschiedenen Therapievarianten ($p < 0,044$) und zwischen dem AurkA-Polymorphismus und dem Stadium ($p < 0,027$). Dies ist im Einklang mit den *in vitro* Daten zu sehen, bei denen abhängig vom Polymorphismus ein unterschiedliches Therapieansprechen auch auf Radiatio gefunden wurde.

Um den Zusammenhang zwischen den Aurora Kinasen und den Molekülen Survivin und p-Akt Ser 473 noch weiter abzuklären und um einen Vergleich zwischen den *in vitro* und den *in vivo* Daten noch besser aufzeigen zu können, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierbei war bei der homozygoten Zelllinie UD-SCC-5 nicht nur die Aurora-Kinase A sondern weiters auch p-Akt Ser 473, p-Erk 1/2 Thr 202/Tyr 204 und Survivin überexprimiert im Gegensatz zur heterozygoten Zelllinie SAS bei der nur AurkB hochreguliert war. Dies deckt sich mit den vorher erwähnten Überlebenskurven, den *in vitro* Daten, bei denen die heterozygote Zelllinie schlechter auf eine Inhibition ansprach, sowie mit der Aussage der aktuellen Literatur, dass eine Überexpression von Survivin und p-Akt Ser 473 mit einem schlechteren Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie und somit einem verkürzten Gesamtüberleben einhergeht (Pickhard, Gröber et al. 2014).

Anhand der Ergebnisse aus immunhistologischen Färbungen, Western Blots und der Hinweise der *in vitro* Daten konnten wir ein Modell zur Veranschaulichung der intrazellulären Signalkaskaden erstellen. Die beteiligten Moleküle dieser Arbeit vor allem die Aurora-Kinasen A und B, Survivin und p-Akt Ser 473 standen hierbei im Vordergrund.

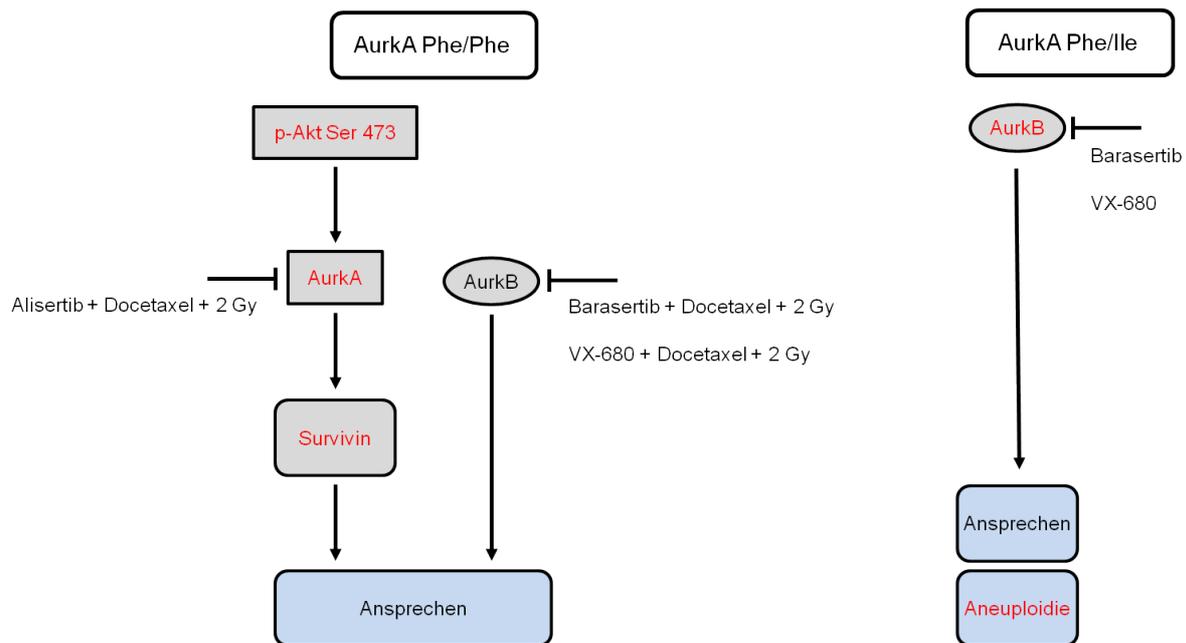


Abbildung 37: Modell zur Veranschaulichung der intrazellulären Signalkaskaden

Die Ergebnisse der Arbeit implizieren, dass bei der homozygoten Zelllinie p-Akt Ser 473, Survivin und AurkA überexprimiert (rot) sind, wodurch eine Sensibilisierung mit Docetaxel und Radiatio bei gleichzeitiger Inhibition der Aurora-Kinasen A und B zu einem verbesserten Ansprechen führten.

Bei der heterozygoten Zelllinie hingegen spielte die AurkA für die verschiedenen Behandlungsschemata keine Rolle. Es zeigte sich lediglich eine Überexpression der AurkB, so dass hier eine alleinige AurkB-Inhibition zu einem verbesserten Ansprechen führte. Zudem fand sich ein Zusammenhang zwischen AurkB und dem Vorliegen einer Aneuploidie.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, sich eingehender mit der Aurora-Kinase Familie bei HNSCC zu beschäftigen, wobei besonders der Aurora-Kinase A Phe31-Ile-Polymorphismus im Vordergrund des Interesses stand.

Hierbei zeigte sich, dass das Auftreten des Aurora-Kinase Polymorphismus bei einem HNSCC Patienten Kollektiv (n=269) im Vergleich zum Normalgewebe umverteilt war (Normalgewebe: Phe/Phe 65,7 %, Phe/Ile 34,3 %, Ile/Ile 0 %; Tumorgewebe: Phe/Phe 48,7 %, Phe/Ile 48,7 %, Ile/Ile 2,6 %). Zudem fand sich bei Korrelationsanalysen mit klinischen Daten ein Zusammenhang zwischen dem AurkA Polymorphismus und verschiedenen Therapievarianten ($p < 0,044$) und zwischen dem AurkA Polymorphismus und dem Stadium ($p < 0,027$).

Auch bei *in vitro* Experimenten zeigte sich abhängig vom Polymorphismus ein unterschiedliches Behandlungsansprechen. So fand sich bei der homozygoten Zelllinie eine Sensibilisierung durch Docetaxel in Kombination mit einem Aurora Kinase Inhibitor bei simultaner Strahlentherapie. Bei der heterozygoten Zelllinie war eine Sensibilisierung durch Docetaxel nur bei Inhibition der AurkA durch Alisertib und Radiatio möglich. Die Wirkung von Barasertib oder VX-680 war durch Docetaxel oder Strahlentherapie nicht weiter zu steigern.

Zuletzt zeigten immunhistologische Färbungen ein Zusammenspiel der Aurora Kinasen und der Moleküle Survivin und p-Akt Ser 473. Mittels Überlebenskurven wurden Hochrisikogruppen gefunden, die eine Über- bzw. Unterexpression der Kombinationen AurkA + AurkB ($p < 0,044$), AurkA + Survivin ($p < 0,020$) sowie AurkA + p-Akt Ser 473 ($p < 0,031$) aufwiesen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der Aurora-Kinase A Phe31-Ile-Polymorphismus ein möglicher prädiktiver Faktor für die Sensibilisierung der Strahlentherapie bei Kopf-Hals-Tumoren ist und zusammen mit der Expression der Aurora-Kinasen A und B als wichtiger Marker in die zukünftig gezieltere Therapie miteinbezogen werden sollte.

7. Literaturverzeichnis

Akkiz, H., Bayram, S., Bekar, A., Akgollu, E. and Ozdil, B. (2010). "Relationship between functional polymorphism in the Aurora A gene and susceptibility of hepatocellular carcinoma." J Viral Hepat **17**(9): 668-674.

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., J., C. M., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. (1988). "Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay." Cancer Research **48**: 589-601.

Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. and Ferris, R. L. (2008). "Head and neck cancer." The Lancet **371**(9625): 1695-1709.

Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J. L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A. and van Glabbeke, M. (2004). "Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer." The New England Journal of Medicine **19**(350): 1945-1952.

Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C. S. M., Novotny, M., Slamon, D. J. and Plowman, G. D. (1998). "A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers." EMBO Journal **17**: 3052-3065.

Boje, C. R. (2014). "Impact of comorbidity on treatment outcome in head and neck squamous cell carcinoma - A systematic review." Radiother Oncol **110**(1): 81-90.

Bose, P., Brockton, N. T. and Dort, J. C. (2013). "Head and neck cancer: from anatomy to biology." Int J Cancer **133**(9): 2013-2023.

Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Califano, J., van der Riet, R., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W. and Sidransky, D. (1996). "Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization." Cancer Res **56**: 2488-2492.

Carmena, M. and Earnshaw, W. C. (2003). "The cellular geography of aurora kinases." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(11): 842-854.

Curry, J., Hayley, A., Lynsey, F., Lyons, J., Reule, M., Thompson, N. and Wallis, N. (2009). "Aurora B kinase inhibition in mitosis." Cell Cycle **8**(12): 1921-1929.

Dar, A. A., Goff, L. W., Majid, S., Berlin, J. and El-Rifai, W. (2010). "Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics?" Mol Cancer Ther **9**(2): 268-278.

Döbrössy, L. (2005). "Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem." Cancer and Metastasis Review **24**: 9-17.

Du, Y., Peyser, N. D. and Grandis, J. R. (2014). "Integration of molecular targeted therapy with radiation in head and neck cancer." Pharmacol Ther **142**(1): 88-98.

Erpolat, O. P., Gocun, P. U., Akmansu, M., Karakus, E. and Akyol, G. (2012). "High expression of nuclear survivin and Aurora B predicts poor overall survival in patients with head and neck squamous cell cancer." Strahlenther Onkol **188**(3): 248-254.

Ewart-Toland, A., Dai, Q., Gao, Y. T., Nagase, H., Dunlop, M. G., Farrington, S. M., Barnetson, R. A., Anton-Culver, H., Peel, D., Ziogas, A., Lin, D., Miao, X., Sun, T., Ostrander, E. A., Stanford, J. L., Langlois, M., Chan, J. M., Yuan, J., Harris, C. C., Bowman, E. D., Clayman, G. L., Lippman, S. M., Lee, J. J., Zheng, W. and Balmain, A. (2005). "Aurora-A/STK15 T+91A is a general low penetrance cancer susceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types." Carcinogenesis **26**(8): 1368-1373.

Giet, R., Petretti, C. and Prigent, C. (2005). "Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link?" Trends Cell Biol **15**(5): 241-250.

González-Loyola, A., Fernández-Miranda, G., Trakala, M., Partida, D., Samejima, K., Ogawa, H., Canamero, M., de Martino, A., Martínez-Ramírez, A., de Cárcer, G., Pérez

de Castro, I., Earnshaw, W. C. and Malumbres, M. (2015). "Aurora B overexpression causes aneuploidy and p21Cip1 repression during tumor development." Mol Cell Biol **35**: 3566–3578.

Gregoire, V., Lefebvre, J. L., Licitra, L. and Felip, E. (2010). "Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **21 Suppl 5**: v184-186.

Han, H., Bearss, D. J., Browne, L. W., Calaluce, R., Nagle, R. B. and Von Hoff, D. D. (2002). "Identification of Differentially Expressed Genes in Pancreatic Cancer Celly Using cDNA Microarray." Cancer Research **62**: 2890-2896.

Hochegger, H., Hegarat, N. and Pereira-Leal, J. B. (2013). "Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle." Open Biol **3**(3): 120185.

Kollareddy, M., Zheleva, D., Dzubak, P., Brahmshatriya, P. S., Lepsik, M. and Hajdich, M. (2012). "Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic." Invest New Drugs **30**(6): 2411-2432.

Kops, G. J., Weaver, B. A. and Cleveland, D. W. (2005). "On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint." Nat Rev Cancer **5**(10): 773-785.

Kundu, S. K. and Nestor, M. (2012). "Targeted therapy in head and neck cancer." Tumour Biol **33**(3): 707-721.

Laemmli, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ Nature **227** (5259): 680-685.

Lampson, M. A. and Cheeseman, I. M. (2011). "Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function." Trends Cell Biol **21**(3): 133-140.

Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. and Brakenhoff, R. H. (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **11**(1): 9-22.

Lehnerdt, G., Hoffmann, T. K., Mattheis, S., Brandau, S., Zeidler, R. and Lang, S. (2010). "Diagnostic and prognostic biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma." HNO **58**(7): 713-723; quiz 724-715.

Leibniz-Institut - DSMZ (2014) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. (<http://www.dsmz.de>) Stand: 05.04.2014.

Lin, C. J., Grandis, J. R., Carey, T. E., Gollin, S. M., Whiteside, T. L., Koch, W. M., Ferris, R. L. and Lai, S. Y. (2007). "Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Established models and rationale for selection." Head & Neck **29**(2): 163-188.

Marumoto, T., Zhang, D. and Saya, H. (2005). "Aurora-A - a guardian of poles." Nat Rev Cancer **5**(1): 42-50.

Mast, G., Zimmermann, F., Ihrler, S., Matthias, C. and Kolk, A. (2009). "Kopf-Hals-Malignome." Manuale Kopf-Hals-Malignome Tumorzentrum München **4**.

Mehra, R., Serebriiskii, I. G., Burtness, B., Astsaturov, I. and Golemis, E. A. (2013). "Aurora kinases in head and neck cancer." The Lancet Oncology **14**(10): e425-e435.

Miao, X., Sun, T., Wang, Y., Zhang, X., Tan, W. and Lin, D. (2004). "Functional STK15 Phe31Ile Polymorphism Is Associated with the Occurrence and Advanced Disease Status of Esophageal Squamous Cell Carcinoma." Cancer Res **64**: 2680-2683.

Nikonova, A. S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I. G., Dunbrack, R. L., Jr. and Golemis, E. A. (2013). "Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division." Cell Mol Life Sci **70**(4): 661-687.

Nylander, K., Dabelsteen, E. and Hall, P. A. (2000). "The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck." J Oral Pathol Med **29**: 413-425.

Paik, S., Kim, C. and Wolmark, N. (2008). "HER2 Status and Benefit from Adjuvant Trastuzumab in Breast Cancer." N Engl J Med **358**: 1409-1411.

Perez-Ordóñez, B., Beauchemin, M. and Jordan, R. C. (2006). "Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck." J Clin Pathol **59**(5): 445-453.

Pickhard, A., Gröber, S., Haug, A., Piontek, G., Wirth, M., Straßen, U., Rudelius, M. and Reiter, R. (2014). "Survivin and pAkt as potential prognostic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck " Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol **117**(6): 733-742.

Pickhard, A., Siegl, M., Baumann, A., Huhn, M., Wirth, M., Reiter, R., Rudelius, M., Piontek, G. and Brockhoff, G. (2014). "The response of head and neck squamous cell carcinoma to cetuximab treatment depends on Aurora kinase A polymorphism." Oncotarget **5**: 5428-5438.

Pitts, T. M., Davis, S. L., Eckhardt, S. G. and Bradshaw-Pierce, E. L. (2013). "Targeting nuclear kinases in cancer: Development of cell cycle kinase inhibitors." Pharmacology & Therapeutics.

Ragin, C. C. R., Modugno, F. and Gollin, S. M. (2007). "The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus." Journal of Dental Research **86**(2): 104-114.

Reiter, R., Gais, P., Jutting, U., Steuer-Vogt, M. K., Pickhard, A., Bink, K., Rauser, S., Lassmann, S., Hofler, H., Werner, M. and Walch, A. (2006). "Aurora kinase A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(17): 5136-5141.

Saridaki, Z., Georgoulas, V. and Souglakos, J. (2010). "Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer." World Journal of Gastroenterology **16**(10): 1177.

Schauer, A., Rothe, H., Balzer, I., Fiebig, I. and Rauschecker, H. (1988). „Immunohistochemical tumor diagnosis in breast cancer--use for assessing the stage and biology of so-called "small breast cancer" Rontgenblatter **41**(8): 340-4.

Sehdev, V., Katsha, A., Ecsedy, J., Zaika, A., Belkhiri, A. and El-Rifai, W. (2013). "The combination of alisertib, an investigational Aurora kinase A inhibitor, and docetaxel

promotes cell death and reduces tumor growth in preclinical cell models of upper gastrointestinal adenocarcinomas." Cancer **119**(4): 904-914.

Silveira, A. P., Goncalves, J., Sequeira, T., Ribeiro, C., Lopes, C., Monteiro, E. and Pimentel, F. L. (2010). "Patient reported outcomes in head and neck cancer: selecting instruments for quality of life integration in clinical protocols." Head Neck Oncol **2**: 32.

Slaughter, D. P., Southwick, H. W. and Smejkal, W. (1953). "Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin." Cancer **6**: 963-968.

Steuer-Vogt, M. K., Bonkowsky, V., Ambrosch, P., Scholz, M., Neiss, A., Strutz, J., Hennig, M., Lenarz, T. and Arnold, W. (2001). "The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial." Eur J Cancer **37**(1): 23-31.

Steuer-Vogt, M. K., Bonkowsky, V., Scholz, M., Fauser, C., Licht, K. and Ambrosch, P. (2006). "[Influence of ML-1 standardized mistletoe extract on the quality of life in head and neck cancer patients]." HNO **54**(4): 277-286.

Sun, H., Bai, J., Chen, F., Jin, Y., Yu, Y. and Fu, S. (2011). "Lack of an association between AURKA T91A polymorphisms and breast cancer: a meta-analysis involving 32,141 subjects." Breast Cancer Res Treat **125**(1): 175-179.

Tanaka, E., Hashimoto, Y., Ito, T., Kondo, K., Higashiyama, M., Tsunoda, S., Ortiz, C., Sakai, Y., Inazawa, J. and Shimada, Y. (2007). "The suppression of aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemosensitivity to docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **13**(4): 1331-1340.

Tanaka, T., Kimura, M., Matsunaga, K., Fukada, D., Mori, H. and Okano, Y. (1999). "Centrosomal Kinase AIK1 Is Overexpressed in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast." Cancer Research **59**: 2041-2044.

Tang, W., Qiu, H., Ding, H., Sun, B., Wang, L., Yin, J. and Gu, H. (2013). "Association between the STK15 F31I polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis involving 43,626 subjects." PLoS One **8**(12): e82790.

Weizmann Institute of Science (2014) The Human Gene Compendium. (<http://www.genecards.org>) Stand: 11.05.2014.

Wittekind, M. TNM-Klassifikation. UICC 7. Auflage; 2010.

Yang, J., McEachern, D., Li, W., Davis, M. A., Li, H., Morgan, M. A., Bai, L., Sebolt, J. T., Sun, H., Lawrence, T. S., Wang, S. and Sun, Y. (2011). "Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases." Mol Cancer Ther 10(4): 658-669.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R. and Sen, S. (1998). "Tumor amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation." Nature Genetics 20: 189-193.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: pT-Klassifikation der UICC	13
Tabelle 2: pN-Klassifikation der UICC	13
Tabelle 3: pM-Klassifikation der UICC	13
Tabelle 4: Histopathologisches Grading von HNSCC	14
Tabelle 5: R-Klassifikation der UICC	14
Tabelle 6: Stadieneinteilung von HNSCC	15
Tabelle 7: Zelllinien	31
Tabelle 8: Medien und Supplemente für die Zellkultur	32
Tabelle 9: Inhibitoren	32
Tabelle 10: Primärantikörper (IHC/IF)	32
Tabelle 11: Primärantikörper (WB)	33
Tabelle 12: Sekundärantikörper	33
Tabelle 13: Reagenzien und Chemikalien	35
Tabelle 14: Gemischte Puffer, Reagenzien und Gele	37
Tabelle 15: Geräte	39
Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien	40
Tabelle 17: Computerprogramme	40
Tabelle 18: Modifikation des Immunreaktiven Scores (IRS=SI+PP)	43
Tabelle 19: Standardeinstellungen des Bestrahlungsgeräts	45
Tabelle 20: Primer für den RLFP-Assay	48
Tabelle 21: Master-Mix	49
Tabelle 22: PCR-Programm	49
Tabelle 23: Mix für Restriktionsverdau	49
Tabelle 24: Zusammensetzung des Laufgels	51
Tabelle 25: Zusammensetzung des Sammelgels	52
Tabelle 26: Definition des Signifikanzniveaus	56
Tabelle 27: Charakterisierung des Kollektivs	58
Tabelle 28: Spearman-Korrelation zwischen AurkA-PM, AurkA, AurkB, Survivin, p-Histon H3 Ser 10 und p-Akt Ser 473	59

Tabelle 29: Spearman-Korrelation der Marker mit den Risikofaktoren Alkohol und Nikotin	59
Tabelle 30: Zusammenhänge zwischen Markerexpression und Geschlecht/Alter/Therapie	60
Tabelle 31: Zusammenhänge zwischen Markerexpression und Lokalisation/Stadium/Ansprechen RCTx/Grading	61
Tabelle 32: Zusammenhänge zwischen Markerexpression und TNM-Klassifikation/Rezidivrate/Metastasen/Zweitkarzinome.....	61
Tabelle 33: Zusammenhang der Markerexpression mit dem disease free survival (DFS) und dem overall survival (OS)	62
Tabelle 34: Zusammenhang der Expression von Markerkombinationen mit dem disease free survival (DFS) und dem overall survival (OS); PM = AurkA-Polymorphismus	64
Tabelle 35: Auszählung der FISH-Analyse der homozygoten Zelllinie UD-SCC-5 ...	84
Tabelle 36: Auszählung der FISH-Analyse der heterozygoten Zelllinie SAS	85

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell zur Entstehung eines HNSCC; modifiziert nach (Califano, van der Riet et al. 1996).....	18
Abbildung 2: prozentuale Häufigkeitsverteilung von HPV im HNSCC; modifiziert nach (Leemans, Braakhuis et al. 2011)	19
Abbildung 3: Lokalisationen und die Hauptfunktionen der Aurora-Kinasen A und B im Zellzyklus; modifiziert nach (Carmena and Earnshaw 2003)	24
Abbildung 4: Aktivierung der Aurora-Kinase A; modifiziert nach (Carmena and Earnshaw 2003)	26
Abbildung 5: Komplexbildung und Aktivierung der Aurora-Kinase B; modifiziert nach (Carmena and Earnshaw 2003)	28
Abbildung 6: Versuchsaufbau des Crystal-Violett Proliferations-Assay	46
Abbildung 7: Versuchsaufbau Western-Blot.....	53
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse der AurkB-Expression	62
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Analyse der p-Akt Ser 473-Expression	63
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Analyse vom Expressionsstatus der Aurora-Kinasen A und B	64
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Analyse vom Expressionsstatus der Aurora-Kinase A und Survivin.....	65
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Analyse vom Expressionsstatus der Aurora-Kinase A und p-Akt Ser 473	66
Abbildung 13: Normalgewebe AurkA	67
Abbildung 14: Normalgewebe AurkB	67
Abbildung 15: Tumorgewebe AurkA.....	67
Abbildung 16: Tumorgewebe AurkB.....	67
Abbildung 17: Charakterisierung der Zelllinien nach deren AurkA-Polymorphismusstatus	68
Abbildung 18: Strahlenkinetik der homozygoten (AurkA Phe/Phe) Zelllinien	69
Abbildung 19: Strahlenkinetik der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien	69
Abbildung 20: Konzentrationskinetik Alisertib der homozygoten (AurkA Phe/Phe) Zelllinien	70

Abbildung 21: Konzentrationskinetik Alisertib der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien	71
Abbildung 22: Konzentrationskinetik Barasertib der homozygoten (AurkA Phe/Phe) Zelllinien	71
Abbildung 23: Konzentrationskinetik Barasertib der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien	72
Abbildung 24: Konzentrationskinetik VX-680 der homozygoten (AurkA Phe/Phe) Zelllinien	72
Abbildung 25: Konzentrationskinetik VX-680 der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien	73
Abbildung 26: Konzentrationskinetik Docetaxel der homozygoten (AurkA Phe/Phe) Zelllinien	73
Abbildung 27: Konzentrationskinetik Docetaxel der heterozygoten (AurkA Phe/Ile) Zelllinien	74
Abbildung 28: Proliferationsanalysen der homozygoten Zelllinie UD-SCC-5.....	75
Abbildung 29: Proliferationsanalysen der heterozygoten Zelllinie SAS.....	77
Abbildung 30: Vergleich der Proliferationsanalysen der homozygoten Zelllinie UD- SCC-5 mit und ohne Bestrahlung.....	79
Abbildung 31: Vergleich der Proliferationsanalysen der heterozygoten Zelllinie SAS mit und ohne Bestrahlung	81
Abbildung 32: Durchflusszytometrie UD-SCC-5.....	82
Abbildung 33: Durchflusszytometrie SAS.....	83
Abbildung 34: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung UD-SCC-5 (AurkA Phe/Phe).....	84
Abbildung 35: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung SAS (AurkA Phe/Ile)	85
Abbildung 36: Vergleich der Western Blot-Analysen von UD-SCC-5 und SAS	86
Abbildung 37: Modell zur Veranschaulichung der intrazellulären Signalkaskaden ...	94

10. Danksagung

Zuerst möchte ich Univ.-Prof. Dr. med. Henning Bier danken, dass er mir die Möglichkeit gab, im Rahmen der onkologischen Forschung seiner Klinik mich eingehend mit diesem Thema zu beschäftigen und meine Dissertation zu verfassen.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anja Pickhard bin ich aus mehreren Gründen zu außerordentlichem Dank verpflichtet. Neben ihrer hervorragenden Tätigkeit als klinische Ärztin, organisierte sie regelmäßige Laborbesprechungen und führte mich stets hilfsbereit und geduldig zum Ziel. Zudem danke ich ihr für die schnelle Korrektur meines Manuskripts.

Ebenso großer Dank gilt Herrn Guido Piontek, der mir besonders bei praktischen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die bereichernden Diskussionen, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die kompetente Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Frau Univ.-Prof. Dr. med. Stephanie E. Combs von der Klinik für Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff von der Frauenklinik der Universität Regensburg danke ich für die Zusammenarbeit und für die Hilfe bei den Experimenten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Laborkollegen, insbesondere Dominik Schüttler und Lena Gebel, für die tolle Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor bedanken. Ebenso vielen Dank an meine Familie und meine Freunde, ohne deren Unterstützung dieser Weg nicht zu beschreiten gewesen wäre.