

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin;  
Medizinische Klinik III, Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. C. Junghanß

# Einfluss klinischer und präklinischer Testsubstanzen auf Wachstum und Vitalität von Kopf-Hals-Tumorzellen *in vitro*

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Hanna Kehnscherper  
aus Rostock

Rostock, 2021

Doktorarbeit  
Universitätsmedizin Rostock

## **Gutachter**

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. habil. Claudia Maletzki

Einrichtung: Universitätsmedizin Rostock  
Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik III  
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Bernd Joachim Krause

Einrichtung: Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin  
Universitätsmedizin Rostock

Drittgutachter: Prof. Dr. med. Peter Brossart

Einrichtung: Klinik und Poliklinik für Innere Medizin –  
Onkologie, Hämatologie,  
Immunonkologie und Rheumatologie

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2021



### Originalarbeiten

1. Riess C, Schneider B, Kehnscherper H, Gesche J, Irmscher N, Shokraie F, Classen CF, Wirthgen E, Domanska G, Zimpfer A, Strüder D, Junghanss C, Maletzki C. Activation of the Kynurenine Pathway in Human Malignancies Can Be Suppressed by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib. *Front Immunol*. 2020 Feb 14;11:55.

### Kongressbeiträge

1. Kehnscherper H, Strüder D, Junghanss C, Maletzki C. Cyclin-abhängige Kinasen als therapeutische Zielstrukturen für Kopf-Halstumoren – eine *in vitro* Analyse. Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Berlin, 11. – 14. Oktober 2019, Posterdiskussion
2. Strüder D, Irmscher N, Kehnscherper H, Junghanss C, Mlynski R, Maletzki C. Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance chemotherapy, immunogenic cell death and radiosensitivity in head and neck cancer – a comprehensive *in vitro* analysis. Meeting on experimental and translational Research in Head and Neck Cancer. Berlin, 17. – 18. Januar 2020, Poster

## Inhaltsverzeichnis

|       |                                                                           |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Einleitung                                                                | 1  |
| 1.1   | HNSCC – Head and neck squamous cell carcinoma                             | 1  |
| 1.1.1 | Epidemiologie                                                             | 1  |
| 1.1.2 | HNSCC – Eine heterogene Erkrankung                                        | 2  |
| 1.1.3 | Molekulare Pathogenese von HPV-negativen HNSCC                            | 3  |
| 1.2   | Therapie von HNSCC                                                        | 8  |
| 1.3   | CDKI – Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren                                | 10 |
| 2     | Zielstellung                                                              | 13 |
| 3     | Material und Methoden                                                     | 14 |
| 3.1   | Materialien                                                               | 14 |
| 3.1.1 | Laborgeräte                                                               | 14 |
| 3.1.2 | Verbrauchsmaterialien                                                     | 15 |
| 3.1.3 | Chemikalien                                                               | 16 |
| 3.1.4 | Medien, Puffer, Lösungen                                                  | 19 |
| 3.1.5 | Software                                                                  | 21 |
| 3.1.6 | Zelllinien                                                                | 21 |
| 3.2   | Grundlegende zellbiologische Methoden                                     | 22 |
| 3.2.1 | Zellkultur und Passagieren                                                | 22 |
| 3.2.2 | Kryokonservierung und Auftauen von Zellen                                 | 23 |
| 3.2.3 | Zellzahlbestimmung                                                        | 23 |
| 3.2.4 | Kristallviolettassay                                                      | 23 |
| 3.3   | Basale Charakterisierung der HNSCC-Zellen                                 | 24 |
| 3.3.1 | <i>In vitro</i> -Chemoresponsivität                                       | 24 |
| 3.3.2 | Radiosensitivität                                                         | 24 |
| 3.3.3 | <sup>18</sup> F-FDG-Aufnahme behandelter HNSCC-Zellen                     | 24 |
| 3.4   | Zielgerichtete Therapie mit CDKI                                          | 25 |
| 3.5   | Kombinationstherapie mit Zytostatika und CDKI – simultan vs. metronomisch | 26 |
| 3.6   | Scratch Assay                                                             | 27 |
| 3.7   | Durchflusszytometrie                                                      | 27 |
| 3.7.1 | Allgemeines Funktionsprinzip                                              | 27 |
| 3.7.2 | Phänotypisierung                                                          | 28 |
| 3.7.3 | Apoptose- / Nekrosebestimmung                                             | 29 |

|       |                                                                                                                                 |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7.4 | Zellzyklusanalyse .....                                                                                                         | 30 |
| 3.7.5 | Nachweis von Calreticulin.....                                                                                                  | 31 |
| 3.7.6 | <i>In vitro</i> -Ko-Kultur mit PBMC.....                                                                                        | 31 |
| 3.8   | Weitere funktionelle Analysen .....                                                                                             | 33 |
| 3.8.1 | Nachweis von Autophagie.....                                                                                                    | 33 |
| 3.8.2 | Western Blot.....                                                                                                               | 34 |
| 3.9   | Statistik .....                                                                                                                 | 37 |
| 4     | Ergebnisse.....                                                                                                                 | 38 |
| 4.1   | Basale Charakterisierung der HNSCC-Zellen.....                                                                                  | 38 |
| 4.1.1 | <i>In vitro</i> -Chemoresponsivität.....                                                                                        | 38 |
| 4.1.2 | Radiosensitivität .....                                                                                                         | 42 |
| 4.1.3 | <sup>18</sup> F-FDG-Aufnahme behandelter HNSCC-Zellen .....                                                                     | 43 |
| 4.1.4 | Basales Expressionslevel von pAKT und AKT .....                                                                                 | 44 |
| 4.2   | Zielgerichtete Therapie mit CDKI.....                                                                                           | 45 |
| 4.3   | Kombinationstherapie mit Zytostatika und CDKI – simultan vs. metronomisch.....                                                  | 49 |
| 4.4   | Scratch Assay .....                                                                                                             | 52 |
| 4.5   | Proteinexpression .....                                                                                                         | 53 |
| 4.6   | Nachweis von Autophagie.....                                                                                                    | 54 |
| 4.7   | Durchflusszytometrie.....                                                                                                       | 56 |
| 4.7.1 | Phänotyp.....                                                                                                                   | 56 |
| 4.7.2 | Apoptose- / Nekrosebestimmung .....                                                                                             | 58 |
| 4.7.3 | Zellzyklusanalyse .....                                                                                                         | 61 |
| 4.7.4 | Nachweis von Calreticulin.....                                                                                                  | 63 |
| 4.7.5 | <i>In vitro</i> -Ko-Kultur mit PBMC.....                                                                                        | 64 |
| 5     | Diskussion .....                                                                                                                | 66 |
| 5.1   | Einfluss von Zytostatika auf die Biomasse von HNSCC-Zellen <i>in vitro</i> .....                                                | 66 |
| 5.2   | Weitere basale Charakterisierung der HNSCC-Zellen.....                                                                          | 68 |
| 5.2.1 | Radiosensitivität .....                                                                                                         | 68 |
| 5.2.2 | <sup>18</sup> F-FDG-Aufnahme behandelter HNSCC-Zellen .....                                                                     | 69 |
| 5.2.3 | Basales Expressionslevel von pAKT und AKT .....                                                                                 | 72 |
| 5.3   | Einfluss der zielgerichteten Therapie mit CDKI auf die Biomasse und<br>Proteinexpression von HNSCC-Zellen <i>in vitro</i> ..... | 73 |
| 5.4   | Effekte der Kombinationstherapie mit Zytostatika und CDKI auf die Biomasse<br>von HNSCC-Zellen <i>in vitro</i> .....            | 74 |

## Inhaltsverzeichnis

|      |                                                                         |     |
|------|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.5  | Scratch Assay .....                                                     | 76  |
| 5.6  | Funktionelle Analysen Therapie-vermittelter zytotoxischer Effekte ..... | 76  |
| 6    | Zusammenfassung .....                                                   | 82  |
| 7    | Abbildungsverzeichnis .....                                             | 84  |
| 8    | Tabellenverzeichnis .....                                               | 85  |
| 9    | Literaturverzeichnis .....                                              | 86  |
| 10   | Anhang .....                                                            | I   |
| 10.1 | Abkürzungsverzeichnis .....                                             | I   |
| 10.2 | Ergänzende Abbildungen und Materialien .....                            | IV  |
| 10.3 | Thesen.....                                                             | XIV |
| 10.4 | Danksagung .....                                                        | XV  |
| 10.5 | Eidesstattliche Versicherung .....                                      | XVI |



## 1 Einleitung

### 1.1 HNSCC – Head and neck squamous cell carcinoma

#### 1.1.1 Epidemiologie

Die *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC), im Deutschen bezeichnet als Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, bilden eine heterogene Gruppe an bösartigen Tumoren. Das HNSCC ist weltweit die siebthäufigste Krebserkrankung mit einer Inzidenz von 880.000 Erkrankungen pro Jahr und einer Mortalitätsrate von 42-50 % (1). Angaben des „Zentrum für Krebsregisterdaten“ des Robert Koch-Instituts zufolge erkrankten im Jahr 2016 in Deutschland 18.669 Menschen an einem HNSCC, wovon rund drei Viertel der Betroffenen Männer waren (13.556 Neuerkrankungen/Jahr) (2). Das mittlere Erkrankungsalter lag bei den Männern bei 65 und bei den Frauen bei 63 Jahren (3). In den letzten Jahren ließ sich bei Frauen in Deutschland in Bezug auf die altersstandardisierte Inzidenz und Sterblichkeit ein steigender Trend beobachten (4). Bei den Männern hingegen war seit einem Anstieg in den 1980er Jahren ein stabiler bzw. leicht rückläufiger Trend zu verzeichnen. Dabei waren jedoch die absoluten Fallzahlen im Vergleich zur weiblichen Bevölkerung insgesamt deutlich höher (4). Zuletzt fand auch eine Zunahme der Häufigkeit bösartiger Tumoren in der Mundhöhle und dem angrenzenden Rachenraum statt, wohingegen die des unteren Rachens und des Kehlkopfes bei den Männern gesunken ist und bei den Frauen unverändert blieb (4).

Im Vergleich zu anderen Ländern Europas wies Deutschland im Jahr 2018 bei den Männern eine altersstandardisierte Inzidenz unterhalb des europäischen Durchschnitts auf. Bei Frauen lag der Wert etwas über dem europäischen Mittelwert (3, 5). Dabei nehmen die bereits bekannten Risikofaktoren und deren Entwicklung eine zentrale Rolle ein. Vor allem der regelmäßige Tabak- und Alkoholkonsum und insbesondere deren Kombination sind von großer Bedeutung. Als weiterer wichtiger Risikofaktor gilt eine chronische Infektion mit dem *Humanen Papillomavirus* (HPV) (4). In Abhängigkeit von den verschiedenen Lokalisationen gibt es zusätzliche Risikofaktoren wie zum Beispiel die Sonnenexposition oder die berufliche Exposition von Chemikalien und Holzstäuben bei Tumoren an der Lippe bzw. des Nasopharynx (4). Das Risiko ist wie bei einer Vielzahl anderer Krebserkrankung auch maßgeblich bei genetischer Disposition sowie einer bestehenden Immunschwäche erhöht (6).

### 1.1.2 HNSCC – Eine heterogene Erkrankung

Mehr als 95 % aller Kopf-Hals-Tumoren sind Plattenepithelkarzinome und fallen somit unter den Begriff HNSCC (7). Ihr Ursprung liegt in den Epithelzellen der oberen Luft- und Speisewege und obwohl durch die Entstehung aus einem Zelltyp schnell der Eindruck einer homogenen Erkrankungsgruppe entsteht, bilden sie keine einzeln abgrenzbare Entität (8). Dies resultiert aus den komplexen anatomischen Ursprungsregionen, den verschiedenen Ätiologien und vielfältigen molekularen Veränderungen (9). Die Zugehörigkeit zur Gruppe der HNSCC wurde aufgrund des zellulären Ursprungs sowie anhand anatomischer Strukturen und der Einteilung funktionell zusammenhängender Regionen festgelegt (9). Inbegriffen sind bösartige Tumoren im Bereich der Mundhöhle und Lippe, des Oro-, Hypo- und Nasopharynx und des Larynx. Darüber hinaus sind Tumoren in der Region der Nase, der Nasennebenhöhlen und der großen Speicheldrüsen zugehörig. Bei Männern werden Kopf-Hals-Tumoren am häufigsten im Oropharynx diagnostiziert. Bei Frauen sind es Tumoren der Mundhöhle und der Lippen (3).

Die Infektion mit dem *Humanen Papillomavirus* stellt epidemiologisch gesehen nicht nur einen anerkannten Risikofaktor für die Entstehung von HNSCC dar. Mittlerweile hat sich der HPV-Status als Abgrenzungsmerkmal zweier Gruppen (HPV-positiv vs. HPV-negativ) innerhalb der HNSCC etabliert. Besonders bei den oropharyngealen Tumoren ließ sich häufig eine Assoziation mit einer chronischen HPV-Infektion nachweisen (10, 11). Dominierend in HPV-DNA-positiven HNSCC ist der HPV16-Typ (10). Die HPV-assoziierten HNSCC stellen eine abgrenzbare klinische Entität innerhalb der HNSCC dar. Sie sind mit einer besseren Prognose assoziiert als Noxen-assoziierte Tumoren (8, 12). Diese Erkenntnisse führten sogar zu einer Erneuerung der Einteilung der TNM-Stadien (*TNM classification of malignant tumours* von der Union for International Cancer Control, UICC und American Joint Committee on Cancer, AJCC) von HNSCC, die neben der anatomische Lage grundlegend für multidisziplinäre Behandlungsentscheidungen in der Patientenversorgung sind (9). Im Jahr 2018 erschien die 8. Auflage der TNM-Klassifikation, welche als Neuerung unterschiedliche Staging-Systeme für p16<sup>INKA4</sup>-positive und p16<sup>INKA4</sup>-negative Oropharynxkarzinome beinhaltet (9, 13). Das Protein p16<sup>INKA4</sup> dient dabei als positiver Surrogatmarker für den HPV-Status (9). Daraus resultiert für HPV-positive HNSCC die Zuteilung zu niedrigeren Stadien als in der vorherigen Version (9). Darüber hinaus konnten epidemiologische Unterschiede festgestellt werden (11). So treten beispielsweise HPV-positive Tumoren des Oropharynx im Vergleich zu HPV-negativen deutlich früher auf (mittleres Erkrankungsalter



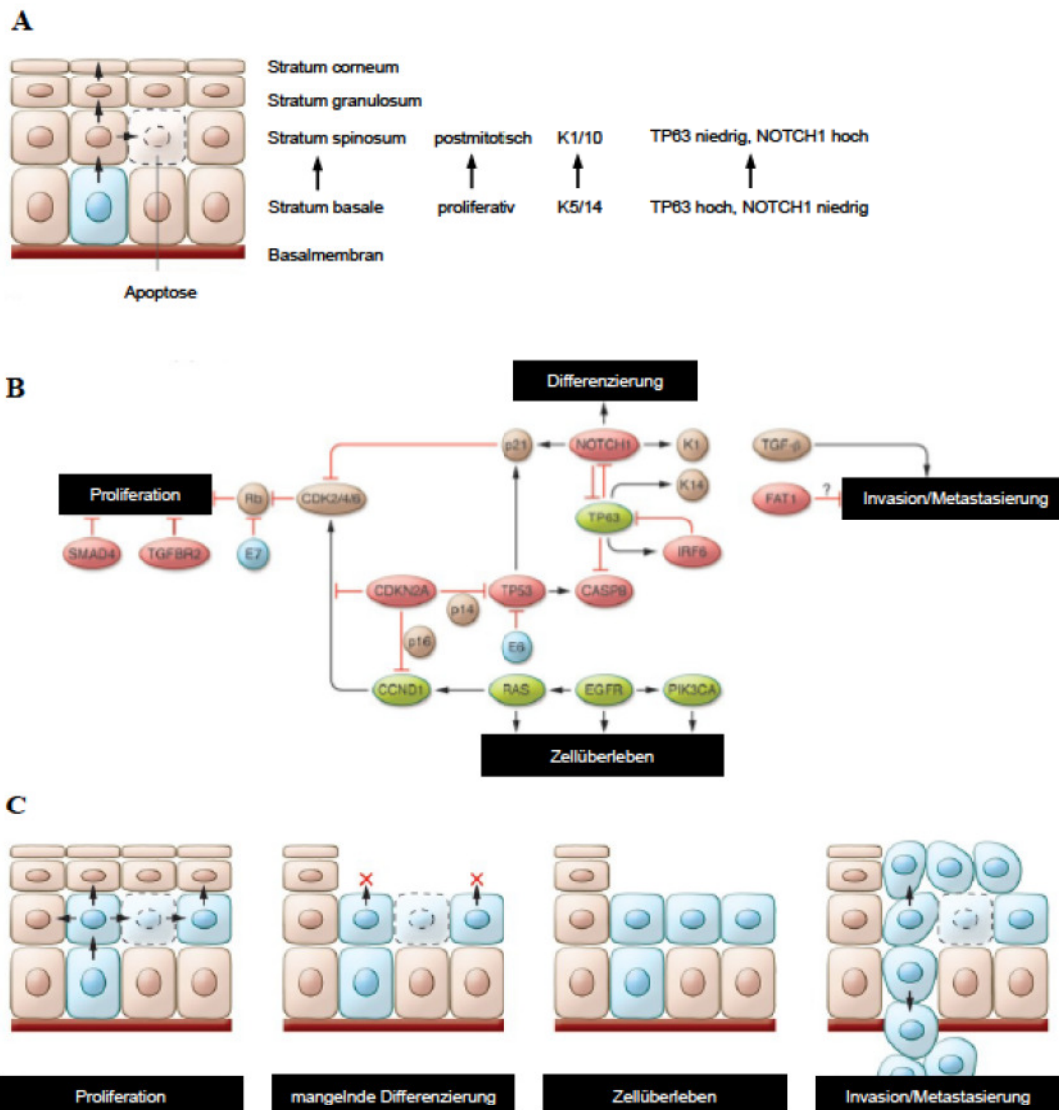
HPV-positiv: 40-60 Jahre vs. HPV-negativ: > 60 Jahre) und zeigen eine Dominanz bei Männern (Verhältnis Männer zu Frauen: HPV-positiv: 8:1 vs. HPV-negativ: 3:1) sowie starke Assoziation mit dem Sexualverhalten (11, 14–16). Auch in Hinblick auf die Mutationsprofile bieten HNSCC durch eine Vielzahl an Genveränderungen und deren Kombinationen ein heterogenes Bild. Im folgenden Abschnitt werden die häufigsten Genveränderungen in HPV-negativen HNSCC dargestellt.

### 1.1.3 Molekulare Pathogenese von HPV-negativen HNSCC

Um die molekulare Pathogenese von HNSCC besser zu verstehen, wurden in den vergangenen Jahren sowohl komplexe Sequenzierungsanalysen als auch Einzel-Gen-Studien durchgeführt. Auf deren Basis konnte ein Model zur molekularen Tumorgenese von HNSCC erstellt werden (6). Das Wissen über die genetischen Veränderungen in HNSCC bietet die Möglichkeit, potentielle pharmakologische Targets zu identifizieren und schafft die Grundlage für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien (6).

Unter Berücksichtigung der bisher beschriebenen *molecular landscapes* und der identifizierten Genveränderungen in HNSCC basiert die Tumorgenese hauptsächlich auf der Dysregulation folgender vier Prozesse: 1. Zellzyklus-Kontrolle (z. B. *CDKN2A*, *CCND1*), 2. zelluläres Überleben und Proliferation (z. B. *TP53*, *EGFR*, *PIK3CA*), 3. Zelldifferenzierung (z. B. *NOTCH1*), 4. Adhäsion und Invasion (z. B. *FAT1*) (6, 17–20).

Die Mundhöhle als mögliche Lokalisation von HNSCC ist mit einer Schleimhaut aus mehrschichtigem Plattenepithel ausgekleidet, das abhängig von Region und Funktion unverhornt, aber zu kleinerem Anteil auch verhornt ist. Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung des verhornten Plattenepithels, die für die Tumorgenese entscheidenden dysregulierten Prozesse und eine Übersicht der zugrunde liegenden Signalwege in HNSCC.



**Abbildung 1: Kennzeichen der Tumorgenese von HNSCC.**

(A) Der normale Prozess der Morphogenese des Plattenepithels der adulten Schleimhaut wird kontrolliert von TP63 und NOTCH1. Ersteres wird in den Keratozyten des Stratum basale exprimiert. Es wirkt proliferativ und kontrolliert die Expression von Basalmarkern (z. B. Keratin 5/14 (K5/14)). Die Expression von NOTCH1 führt zur terminalen Differenzierung zu Zellen des Stratum spinosum und granulosum. Selten unterliegen Stammzellen im Stratum basale (hellblau) terminaler Differenzierung durch asymmetrische Zellteilung. Abnormale Proliferation wird primär durch eine Differenzierungs-assoziierte Unterbrechung des Zellzyklus und durch Apoptose (gestrichelte Linie) verhindert. (B) Veränderte Signalwege, die im Zusammenhang mit der HNSCC-Pathogenese stehen. Dargestellt sind mutmaßliche und etablierte Tumorsuppressoren (rot), Onkogene (grün), virale Proteine (blau) und weitere relevante Gene und Proteine (braun). (C) Schematische Darstellung der dysregulierten Prozesse der Tumorgenese von HNSCC. Abgewandelte Abbildung, Quelle: Rothenberg SM, Ellisen LW. 2012 (21).

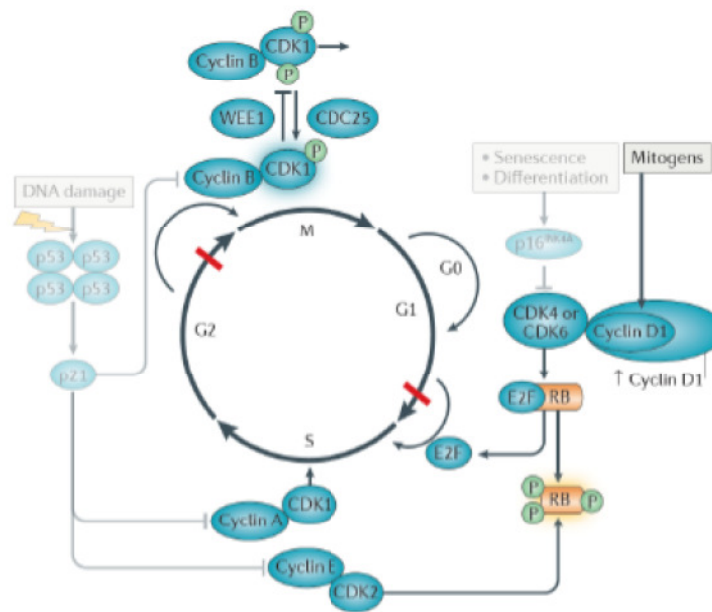


Zusätzlich zu Mutationen spielen die Aktivierung von Protoonkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch hetero- oder homozygoten Verlust sowie epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle (9). Im Folgenden wird zunächst auf die veränderte Zellzyklusregulation in HNSCC eingegangen, die in Abbildung 2 dargestellt ist. Zentrale Bedeutung haben dabei genetische Aberrationen, die über gekoppelte Signalwege direkt oder indirekt den Zellzyklus regulieren (9). Die häufigsten und schon in der frühen Karzinogenese auftretenden genetischen Veränderungen in HPV-negativen HNSCC sind der Verlust der Heterozygotie der chromosomalen Regionen 3p und 9p21, Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* auf dem Chromosom 17p13 und eine Amplifikation von *Cyclin D1* auf 11q13 (6, 7, 22).

Das auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 lokalisierte Tumorsuppressorgen *CDKN2A* kodiert das Protein p16<sup>INK4A</sup>, welches an den Komplex aus Cyclin D und CDK4 (*Cyclin-dependent kinase* 4) bzw. Cyclin D und CDK6 bindet und diesen dadurch inhibiert (9).

Eine homozygote Deletion von *CDKN2A* tritt in 30 % aller HNSCC auf, wodurch die hemmende Wirkung von p16<sup>INK4A</sup> auf den Zellzyklus entfällt (6). Durch die zusätzliche Amplifikation des *CCND1*-Gens (kodiert für Cyclin D1), die in ca. einem Drittel aller HNSCC auftritt, kommt es im Zellzyklus zur Überwindung des G1-S-Checkpoints. Es folgt die ungeplante DNA-Replikation (Abb. 2). Mit dieser Dysregulation des Zellzyklus im G1-S-Übergang wird, um eine korrekte Zellteilung zu gewährleisten, die Regulation in der S-Phase bzw. an dem G2-M-Checkpoint und der M-Phase umso bedeutender (6, 9).

Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* sind die häufigste Genveränderung in HNSCC, die in 60-80 % aller Fälle vorkommt (6, 7). Unter HPV-negativen HNSCC tritt sie bei ca. 86 % auf (18). Die beschriebene Überwindung des G1-S-Checkpoints und die folgende ungeplante Replikation der DNA gehen mit Schädigung der selbigen einher, woraufhin die Aktivierung des Proteins p53 initiiert werden würde, um den Zellzyklus zu unterbrechen und DNA-Schäden zu beheben (23). Bei vorliegender Inaktivierung kann diese Reparatur nicht erfolgen, was die Tumorprogression weiter fördert. Wie in Abbildung 2 dargestellt hat p53 globale Funktionen in der Zellzyklusregulation, zu diesen unter anderem die Induktion des Proteins p21 zählt. Das p21 inhibiert die an der Zellzykluskontrolle beteiligten CDK (24). Bei Vorliegen somatischer Mutationen in *TP53* entfallen diese protektiven Funktionen, wodurch die Regulation des Zellzyklus verändert wird. Doch trotz Wegfalls des Zellzyklusarrests durch p53 benötigen maligne Zellen für ihre Zellteilung einen regelrechten M-Phase-Einstieg mit komplett replizierten Chromosomen, was Cyclin-abhängige-Kinasen als potentielles pharmakologisches Target für die Behandlung von HNSCC interessant macht (9).



**Abbildung 2: Zellzyklusregulation in HNSCC.**

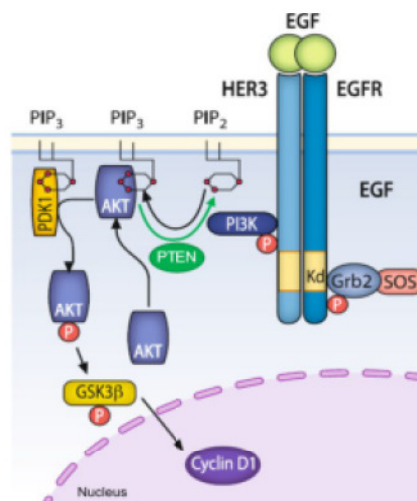
Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch Cyclin-CDK-Komplexe, die direkt oder über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren an verschiedenen Stellen des Zellzyklus eingreifen. Durch sie kommt es zur Überwindung der zwei Checkpoints (rote Balken). Zur Überbrückung des G1-S-Checkpoints destabilisiert der Cyclin D1-CDK4/6-Komplex durch Phosphorylierung die inhibitorische Bindung des Retinoblastom-Proteins (RB) an den Transkriptionsfaktor E2F. Bei dem G2-M-Checkpoint wirkt der Cyclin B-CDK1-Komplex regulatorisch. Die Aktivität der Cyclin-CDK-Komplexe wird wiederum durch Inhibitoren wie p16<sup>INKA4</sup> und p21 sowie Veränderungen der Cyclin-Expression oder Phosphorylierung (WEE1-Kinase) reguliert. Die Gene *CDKN2A* (kodiert p16<sup>INKA4</sup>) und *TP53* sind in HNSCC oft durch Genalterationen inaktiviert (dargestellt durch blassere Farben). Cyclin D1 hingegen wird häufig durch die Amplifikation des *CCND1*-Gens verstärkt exprimiert (vergrößertes Oval). Die generelle Überwindung des G1-S-Checkpoints mit ungeplantem S-Phasen-Einstieg und verstärkter DNA-Replikation in HNSCC erfordert eine vermehrte Regulation des Zellzyklus in der S-Phase, dem G2-M-Checkpoint und der M-Phase. Ist p53 mutiert, wird der Zellzyklus nicht für mögliche DNA-Reparaturen unterbrochen. Quelle: Leemans CR et al. 2018 (9).

Die Funktion des p53 kann neben einer Mutation auch durch andere Ursachen bedingt inhibiert sein. So kann es beispielsweise durch das, bei HPV-positiven HNSCC vorkommende, virale Onkogen *E6* bzw. das dadurch kodierte Protein E6 gehemmt werden (6). Da alle Untersuchungen in dieser Arbeit ausschließlich an HPV-negativen HNSCC-Zelllinien durchgeführt wurden, wird nachfolgend nicht weiter auf die genetischen Veränderungen in HPV-positiven HNSCC eingegangen.

Abgesehen von der Zellzyklusregulation sind in HNSCC ebenfalls Prozesse des Zellüberlebens und der Proliferation modifiziert. Neben den bereits beschriebenen



Genveränderungen sind aktivierende Mutationen in den Onkogenen *PIK3CA* und *EGFR* und dem Tumorsuppressor *PTEN* von Bedeutung (18). Es folgt eine verstärkte Aktivität des PI3K-AKT-Signalwegs, der über die Regulation von Cyclin D1 Einfluss auf den Zellzyklus hat (Abb. 3) (25). Aktiviert wird der Signalweg durch Rezeptor-Tyrosinkinasen. Diese umfassen unter anderem den zur ErbB-Membranrezeptor-Familie gehörigen *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (26). Die Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K) wird durch EGRF aktiviert und phosphoryliert das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ), wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat ( $PIP_3$ ) entsteht (27). An das entstandene  $PIP_3$  binden über die Pleckstrin-Homologie-Domäne zytosolische Moleküle wie die Protein-kinase B, auch AKT genannt (28). Die aktivierte Serin/Threonin-Kinase AKT phosphoryliert wiederum die Glykogensynthasekinase  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Über die GSK3 $\beta$  schließt sich die Regulation des Zellzyklus durch Cyclin D1 an (Abb. 3).



**Abbildung 3: PI3K-AKT-Signalweg.**

Der PI3K-AKT-Signalweg wird durch Stimulation des membranständigen *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) ausgelöst und es kommt zur Aktivierung der PI3-Kinase (PI3K). Durch Phosphorylierung katalysiert die PI3K die Umwandlung von dem membranständigen Phospholipid  $PIP_2$  zu  $PIP_3$ . Zytosolische Moleküle, wie die Serin/Threonin-Kinase AKT lokalisieren zur Plasmamembran und binden an  $PIP_3$ . Nach Phosphorylierung durch die ebenfalls an  $PIP_3$  gebundene PDK1 überträgt AKT das Phosphat auf die GSK3 $\beta$ . Es schließt sich die Regulation der Cyclin D1-Expression im Zellkern an. Als Gegenspieler zur PI3K dephosphoryliert PTEN das  $PIP_3$  zu  $PIP_2$ . *PI3K*: Phosphatidylinositid-3-Kinase; *PIP<sub>2</sub>*: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; *PIP<sub>3</sub>*: Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat; *PDK1*: Phospholipid-dependent Kinase; *PTEN*: Phosphatase and tensin homolog; *GSK3 $\beta$* : Glykogensynthasekinase  $3\beta$ . Abgewandelte Abbildung, Quelle: Heinrich PC et al. 2014 (25).



Das EGFR-Protein ist wie in einer Vielzahl epithelialer Tumoren auch in HNSCC überexprimiert (29, 30). Die vielfältigen Funktionen von EGFR umfassen das Rekrutieren und Aktivieren verschiedener Effektormoleküle. Es werden dadurch Signalwege (z. B. RAS-MAPK-, PI3K-AKT-, Phospholipase C-Signalweg) aktiviert, die potentielle onkogenetische Regulatoren von Zellwachstum, Invasion, Angiogenese und Metastasierung sind (31, 32). EGFR ist zusätzlich in der Lage in den Zellkern zu translozieren und dort als Transkriptionsfaktor bzw. Ko-Aktivator von Transkriptionsproteinen (z. B. STAT) zu agieren. So wird beispielsweise das an der Zellzyklusregulation beteiligte *CCND1*-Gen induziert (7, 33). Zu den verschiedenen *EGFR*-Aberrationen zählen neben aktivierenden somatischen Punktmutationen eine spezifische mutierte Form des *EGFR* (*EGFRvIII*) und Amplifikationen des *EGFR*-Gens (7). Angaben des Cancer Genome Atlas zufolge treten letztere in 11 % der HPV-negativen HNSCC auf, 4 % aller Fälle tragen aktivierende *EGFR*-Mutationen (18).

Neben *EGFR* ist *PIK3CA* ein weiteres pathogenetisch relevantes Gen bei HNSCC. Laut Analysen des Cancer Genome Atlas ist das *PIK3CA*-Gen in ca. einem Drittel der Fälle mutiert und damit das am dritthäufigste mutierte Gen in HPV-negativen HNSCC (34, 35). Das *PIK3CA*-Gen kodiert für die katalytische Untereinheit von der PI3K (21, 36).

Hinsichtlich der Umsetzung von  $PIP_2$  zu  $PIP_3$  hat die PI3K mit der Phosphatase PTEN einen Gegenspieler, der als Tumorsuppressor durch Dephosphorylierung die gegenläufige Reaktion katalysiert (25, 26). Inaktivierende *PTEN*-Mutationen treten in ca. 8 % aller HNSCC auf und tragen zu einem verstärkt aktivierten PI3K-Signalweg und somit zur Tumorgenese bei (37). HNSCC sind durch komplexe molekulare Alterationen charakterisiert, welche eine klinisch heterogene Gruppe und damit eine besondere Herausforderung für die Therapie darstellen. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

## 1.2 Therapie von HNSCC

Die Behandlung von HNSCC erfolgt multimodal. In Abhängigkeit von dem vorliegenden TNM-Stadium werden für das Therapiemanagement die klassischen drei Säulen der Onkologie bestehend aus chirurgischer Resektion, Bestrahlung sowie (neo-)adjuvanter Chemotherapie in verschiedenen Variationen kombiniert angewendet (16, 38, 39). Bei ca. 40 % der Patienten wird der Tumor in einem frühen Stadium diagnostiziert (Stadien I und II) (16). Bei diesen Stadien erfolgt die Behandlung üblicherweise nur mittels chirurgischer Resektion und Radiotherapie (9). Patienten mit fortgeschrittenen HNSCC (Stadien III und IVA/B) erhalten eine Kombination aus chirurgischer Behandlung und adjuvanter Radiochemotherapie bzw. seltener einer neoadjuvanten Radiochemotherapie. Nicht-resektable



Tumoren werden palliativ mit einer Radiochemotherapie behandelt (9, 16, 40). Etwa die Hälfte der Patienten erleidet ein Rezidiv, am häufigsten in Form eines Lokalrezidivs, gefolgt von Fernmetastasen. Zweitumoren im Kopf-Hals-Bereich, der Lunge oder anderen Regionen treten mit einer jährlichen Rate von 2-3 % besonders bei HPV-negativen und nicht-oropharyngealen HNSCC auf (9, 41). Im bereits metastasierten Stadium kann bei Patienten mit einem guten Performance-Status (ECOG: 1-2) eine palliative Behandlung mit dem Ziel der Lebensverlängerung mittels kombinierter Chemotherapie erfolgen. Bei einem schlechten Performance-Status folgt eine Einzel-Chemotherapie oder die palliative Behandlung im Sinne der „Best Supportive Care“-Behandlung (16, 38, 39). Dabei kommen vor allem platinhaltige Zytostatika wie Cisplatin und Carboplatin sowie 5-Fluoruracil (5-FU), Gemcitabin, Methotrexat und Taxane zum Einsatz (42). Zytostatika sind eine heterogene Gruppe an Medikamenten und weisen eine Vielzahl verschiedener Wirkmechanismen auf. 5-FU und Gemcitabin gehören zu der Gruppe der Antimetaboliten und hemmen als Pyrimidinanaloga die DNA-Replikation (43). Der Wirkmechanismus von 5-FU besteht in dem Einbau von Fluoronukleotiden in die RNA und DNA und der Inhibition des Nukleotid-Synthese-Enzyms Thymidylat-Synthase (44). Die platin-haltigen Zytostatika Cisplatin und Carboplatin hemmen beispielsweise die DNA-Replikation über die Bildung von *cross-links* zwischen beiden DNA-Strängen, wohingegen Taxane als sogenannte Spindelgifte einen Stillstand der Mitose in der Metaphase bewirken (45–47).

Die Chemotherapie ist mit einer hohen Toxizität und einer Vielzahl an teilweise schweren Nebenwirkungen bis hin zu Organfunktionsstörungen verbunden. Ziel ist es, auf Grundlage der Erkenntnisse über molekulare Veränderungen in HNSCC möglichst zielgerichtete und personalisierte Therapien zu entwickeln, um Off-Target-Effekte und Toxizitäten zu verringern (7, 48). Vorreiter ist die anti-EGFR-basierte Antikörpertherapie mit Cetuximab. Der monoklonale Antikörper wird bereits seit 2006 klinisch zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen HNSCC eingesetzt. Die Zulassung von Cetuximab basiert auf den Ergebnissen einer internationalen Phase-III-Studie, in der die Wirksamkeit in Kombination mit Radiotherapie im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie untersucht wurde (49, 50). Trotz der vielversprechenden initialen Daten hat auch diese Therapie ihre Grenzen, da nur ein Teil der Patienten effektiv auf Cetuximab anspricht. Das macht zum einen die Suche nach Biomarkern für eine Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber dem Anti-EGFR-Antikörper unabdingbar (50), doch fordert zum anderen dazu auf, in Hinblick auf verbesserte Therapieoptionen an der Wirkung und Einsetzbarkeit weiterer zielgerichteter Substanzen zu forschen. Die Vielzahl der

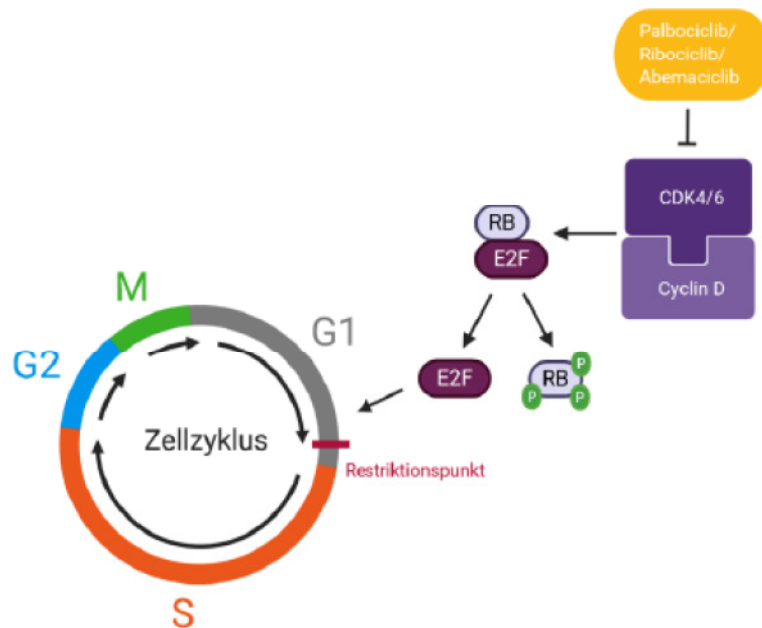
beschriebenen molekularen Veränderungen in HNSCC bieten dafür weitere potentielle Angriffspunkte.

### 1.3 CDKI – Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren

Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK) sind Serin/Threonin-Kinasen, die für die Passage des Zellzyklus benötigte Strukturen darstellen und somit eine Schlüsselrolle für die Zellproliferation und das Tumorstadium übernehmen (51). Um ihre enzymatische Aktivität auszuüben interagieren CDK mit Cyclinen, indem sie mit ihnen Komplexe bilden (52). Humane Zellen weisen 20 CDK und 29 Cycline auf (53). Die verschiedenen CDK übernehmen neben der regulatorischen Funktion in der Zellzykluskontrolle (CDK1/2/3/4/6/7/8/10) weitere Funktionen in Prozessen wie beispielsweise die Kontrolle von Gentranskription (CDK7/8/9/10/12), DNA-Schädigung und -Reparatur (CDK1/3/9/12) (54). CDK4/6 interagieren mit Cyclin D1 und regulieren am Restriktionspunkt den Übergang von der G1- in die S-Phase (Abb. 4) (9). Im weiteren Verlauf wird die S-Phase von CDK2 und die M-Phase von CDK1 kontrolliert (Abb. 2) (55). Wie zuvor beschrieben ist bei HPV-negativen HNSCC der Cyclin-D1-CDK4/6-Komplex häufig überexprimiert und es kommt zur Progression des Zellzyklus. Vor diesem Hintergrund stellt die therapeutische Inhibition von CDK4/6 einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Im Fokus aktueller Forschung steht, inwiefern CDKI (Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren) ergänzend zu den bereits etablierten Therapien von HNSCC eingesetzt werden können. Bisherige Studien liefern widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Vorteile durch die Kombination von CDK4/6-Inhibitoren mit einer Standard-Chemotherapie bei HNSCC, was weitere Forschung in diesem Gebiet erfordert (55).

Es gibt bereits drei spezifische CDK4/6-Inhibitoren, die zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden. Zu diesen zählen Palbociclib und Ribociclib, welche seit 2016 bzw. 2017 in Europa für die Behandlung von Hormonrezeptor-positivem/HER2-negativem lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs zugelassen sind (56). Darüber hinaus laufen aktuell mehrere Phase-I/II-Studien zur Behandlung von HNSCC mit CDK4/6-Inhibitoren sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit Zytostatika, Cetuximab und Immuntherapeutika (55). Eine Übersicht aller aktuell laufenden Studien findet sich in *clinicaltrials.gov* (57). Abemaciclib ist nach Palbociclib und Ribociclib als dritter selektiver CDK4/6-Inhibitor seit 2018 in Europa für die Therapie von Hormonrezeptor-positivem/HER2-negativem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Brustkrebs zugelassen (58). Erste präklinische Daten bestätigen überdies die Wirksamkeit bei HNSCC-Zellen (59).

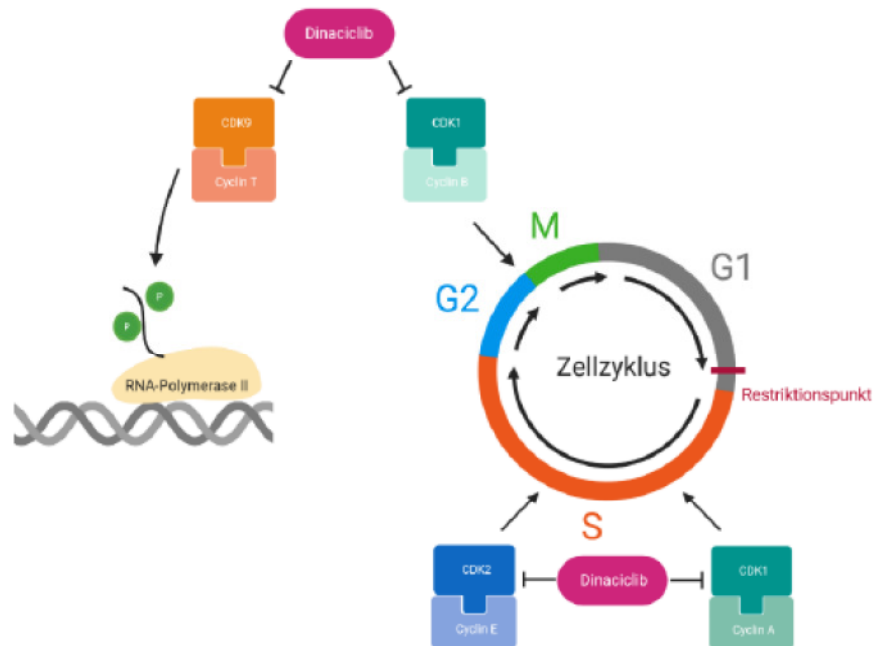




**Abbildung 4: Wirkmechanismus selektiver CDK4/6-Inhibitoren.**

Die Cyclin-abhängigen-Kinasen4/6 aktivieren im Komplex mit Cyclin D über die Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins (RB) den Transkriptionsfaktor E2F und wirken regulatorisch auf die Überwindung des Restriktionspunktes des Zellzyklus. Die CDK-Inhibitoren Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib greifen über die Hemmung der CDK4/6 auf diese Regulation des Zellzyklus ein. Abbildung erstellt auf *biorender.com* (60).

Neben diesen selektiven CDK4/6-Inhibitoren stehen weitere globaler wirkende CDKI im Interesse der Forschung. Verschiedene präklinische Studien weisen auf synergistische Effekte von pan-CDKI mit Zytostatika wie Cisplatin und 5-FU hin (55). Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Dissertation neben den selektiven CDK4/6-Inhibitoren auch der CDK1/2/5/9-Inhibitor Dinaciclib in die Untersuchungen eingeschlossen (61). Neben den CDK4 und CDK6 wird der Zellzyklus durch weitere CDK reguliert. Einfluss auf die S- und M-Phase haben beispielsweise CDK1 und CDK2, die ebenfalls im Komplex mit Cyclinen agieren (Abb. 2 und 5). CDK9 wird eine Schlüsselrolle in der Transkriptionsregulierung durch die RNA-Polymerase II zugeschrieben (62). Die klinische Wirksamkeit von Dinaciclib wird gegenwärtig Entitäten-übergreifend in mehreren Studien evaluiert (61).



**Abbildung 5: Wirkmechanismus des CDKI Dinaciclib.**

Der CDKI Dinaciclib hemmt die CDK1/2/5/9. Über die Inhibition der CDK1 und CDK2, die im Komplex mit Cyclinen agieren, wirkt Dinaciclib an mehreren Stellen regulierend auf die Progression des Zellzyklus. Über die Inhibition der CDK9 wird die Phosphorylierung und somit die Funktion der RNA-Polymerase II herunterreguliert. Der Übergang in die produktive Transkriptionselongation zur Bildung vollständiger mRNA-Transkripte wird behindert (63). Abbildung erstellt auf *biorender.com* (60).

## 2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, das antitumorale und immunmodulatorische Potential von CDKI in Mono- und Kombinationstherapie mit konventionellen Zytostatika gegenüber HNSCC-Zellen *in vitro* zu evaluieren und damit eine Basis für weiterführende Arbeiten zu schaffen.

In die Untersuchungen wurden die drei klinisch relevanten Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin sowie die CDKI Palbociclib, Abemaciclib und Dinaciclib eingeschlossen. Zunächst erfolgte eine basale Charakterisierung der vier gewählten HNSCC-Zelllinien durch Ermittlung der Chemoresponsivität und Radiosensitivität.

Ausgehend von den erhobenen Befunden sollten Kombinationen eingesetzt werden, um potentiell synergistische Effekte zu identifizieren. Wesentliches Ziel war es, die Sensitivität gegenüber CDKI durch Kombination mit zytostatischen Substanzen zu verbessern sowie Unterschiede zwischen der simultanen bzw. metronomischen Behandlung zu identifizieren. Um die Effekte der einzelnen Therapieschemata differenziert zu untersuchen und die zugrunde liegenden Mechanismen besser verstehen zu können, erfolgten ergänzende funktionelle Analysen mittels Western Blot und Durchflusszytometrie. Zusammenfassend ergaben sich für diese Arbeit folgende Untersuchungsschwerpunkte:

- Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin
- Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der CDKI Palbociclib, Abemaciclib und Dinaciclib
- Untersuchung des Kombinationseffekts von Zytostatika und CDKI auf die Biomasse der HNSCC-Zellen
- Funktionelle Analyse der Therapie-vermittelten zytotoxischen Effekte



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Laborgeräte

| <b>Gerät</b>                                        | <b>Hersteller</b>                     | <b>Hauptsitz</b>                             |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|
| BD FACS Verse™                                      | BD Biosciences                        | Heidelberg, Deutschland                      |
| Brutschrank                                         | Heraeus instruments                   | Hanau, Deutschland                           |
| Captair™ Chem Filterabzug                           | Erlab                                 | Val-de-Reuil, Frankreich                     |
| Eismaschine                                         | Scotsman                              | Mailand, Italien                             |
| Elektrophoresekammer<br>Criterion™                  | Bio-Rad                               | Hercules, USA                                |
| Evos XL Core Imaging System                         | Life Technologies                     | Darmstadt, Deutschland                       |
| Freezing Container<br>Mr. Frosty™                   | Thermo Fisher Scientific              | Waltham, USA                                 |
| Gamma-Bestrahlungsanlage<br>IBL 637                 | CIS Bio International S.A.            | Saclay, Frankreich                           |
| Glomax® Multi Detection<br>System                   | Promega                               | Madison, USA                                 |
| Kühlschrank 4 °C /<br>Gefrierschrank -20 °C         | Elektrolux                            | Stockholm, Schweden                          |
| Kühlschrank 4 °C /<br>Gefrierschrank -20 °C         | Liebherr                              | Bulle FR, Schweiz                            |
| Laser-Scanning-Mikroskop<br>Zeiss LSM 780           | Carl Zeiss<br>Microscopy GmbH         | Jena, Deutschland                            |
| Lichtmikroskop<br>Eclipse TE200                     | Nikon                                 | Tokio, Japan                                 |
| Mehrkanalpipette                                    | Eppendorf AG                          | Hamburg, Deutschland                         |
| Multipette                                          | Eppendorf AG                          | Hamburg, Deutschland                         |
| Neubauer Zählkammer                                 | Marienfeld GmbH & Co<br>KG            | Lauda-Königshofen,<br>Deutschland            |
| LI-COR Odyssey Infrared<br>Imaging System           | LI-COR                                | Lincoln, USA                                 |
| Pipetboy Accu-jet® pro                              | Brand                                 | Wertheim, Deutschland                        |
| Pipette (2,5 µl, 10 µl, 100 µl,<br>200 µl, 1000 µl) | Eppendorf AG;<br>Gilson               | Hamburg, Deutschland<br>Limburg, Deutschland |
| PowerPac Basic Stromquelle                          | Bio-Rad                               | Hercules, USA                                |
| Scanner<br>Immunospot DC Suite                      | Cellular Technology Ltd.              | Bonn, Deutschland                            |
| ST 5 CAT Shaker                                     | Ingenieurbüro, CAT M<br>Zipperer GmbH | Baden-Württemberg,<br>Deutschland            |

|                                               |                          |                                       |
|-----------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| <b>ST 5 Plattenschüttler</b>                  | CAT                      | Ballrechten-Dottingen,<br>Deutschland |
| <b>Sterilwerkbank<br/>HERAsafe™</b>           | Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA                          |
| <b>ThermoMixer® Comfort</b>                   | Eppendorf AG             | Hamburg, Deutschland                  |
| <b>Trans-Blot® Turbo™ Transfer<br/>System</b> | Bio-Rad                  | Hercules, USA                         |
| <b>UW 2070 Ultraschallgerät</b>               | Bandelin electronic      | Berlin, Deutschland                   |
| <b>Vortex-Gerät Reax top</b>                  | Heidolph                 | Schwabach, Deutschland                |
| <b>Wasserbad</b>                              | GFL GmbH                 | Burgwedel, Deutschland                |
| <b>Zentrifuge 5418</b>                        | Eppendorf AG             | Hamburg, Deutschland                  |
| <b>Zentrifuge Rotina 35R</b>                  | Hettich                  | Tuttlingen, Deutschland               |
| <b>Zentrifuge Rotina 38R</b>                  | Hettich                  | Tuttlingen, Deutschland               |
| <b>Zentrifuge Rotina 420</b>                  | Hettich                  | Tuttlingen, Deutschland               |

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

| <b>Verbrauchsmaterial</b>                                     | <b>Hersteller</b>        | <b>Hauptsitz</b>                   |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| <b>96-Well-Platte F-bottom, steril</b>                        | Greiner Bio-One          | Kremsmünster, Österreich           |
| <b>96-Well-Platte U-bottom, steril</b>                        | Greiner Bio-One          | Kremsmünster, Österreich           |
| <b>96-Well-Storage Platte 340 µl<br/>(FACS-Platte)</b>        | Corning                  | New York City, USA                 |
| <b>Aluminiumfolie 20 µm Stärke</b>                            | Roth                     | Karlsruhe, Deutschland             |
| <b>Chamber Slides 4-Well,<br/>Nunc Lab-Tek</b>                | Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA                       |
| <b>Combitips advanced®, steril<br/>(5 ml, 10 ml)</b>          | Eppendorf AG             | Hamburg, Deutschland               |
| <b>Dako Pen</b>                                               | Dako                     | Glostrup, Dänemark                 |
| <b>Deckgläser (22 x 22 mm)</b>                                | IDL GmbH Mitte           | Schmitte, Deutschland              |
| <b>Deckgläser (24 x 32 mm)</b>                                | Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA                       |
| <b>Eppendorf Safe-Lock Tubes<br/>(1,5 ml, 2,0 ml)</b>         | Eppendorf AG             | Hamburg, Deutschland               |
| <b>FACS-Röhrchen</b>                                          | Sarstedt AG & Co         | Nümbrecht, Deutschland             |
| <b>FALCON® Polypropylen (PP)-<br/>Röhrchen (15 ml, 50 ml)</b> | Greiner Bio-One          | Kremsmünster, Österreich           |
| <b>Fertiggele</b>                                             | Bio-Rad                  | Hercules, USA                      |
| <b>Gelloader-Pipettenspitzen</b>                              | Biozym Scientific GmbH   | Hessisch Oldendorf,<br>Deutschland |
| <b>Nunc™ Kryo Tube™ (0,5 ml,<br/>1,0 ml)</b>                  | Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA                       |
| <b>Objektträger (76 x 26 mm)</b>                              | Engelbrecht              | Edermünde, Deutschland             |

|                                                                              |                                                                      |                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pasteurpipette (150 mm)</b>                                               | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG;<br>FisherScientific         | Sondheim vor der Rhön,<br>Deutschland<br>Hampton, USA                      |
| <b>Pasteurpipette (230 mm)</b>                                               | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG,<br>FisherScientific         | Sondheim vor der Rhön,<br>Deutschland<br>Hampton, USA                      |
| <b>Peha-soft nitrile fino puderfrei Einmal-Handschuhe, unsteril</b>          | Paul Hartmann AG                                                     | Heidenheim, Deutschland                                                    |
| <b>Pipettenspitzen (0,1 – 10 µl, 2 – 200 µl, 50 – 100 µl, 200 - 1000 µl)</b> | Eppendorf AG;<br>Thermo Fisher Scientific;<br>Biozym Scientific GmbH | Hamburg, Deutschland<br>Waltham, USA<br>Hessisch Oldendorf,<br>Deutschland |
| <b>PVDF-Fertigmembran</b>                                                    | Bio-Rad                                                              | Hercules, USA                                                              |
| <b>Reaktionsgefäß, braun (1,5 ml)</b>                                        | Sarstedt AG & Co                                                     | Nümbrecht, Deutschland                                                     |
| <b>Serologische Pipette, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)</b>        | Greiner Bio-One                                                      | Kremsmünster, Österreich                                                   |
| <b>Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Pack</b>                            | Bio-Rad                                                              | Hercules, USA                                                              |
| <b>Zellkultur Multiwell-Platte, Cellstar™ (6, 12, 24-Well)</b>               | Greiner Bio-One                                                      | Kremsmünster, Österreich                                                   |
| <b>Zellkultur Slide (8-Well)</b>                                             | Sarstedt AG & Co                                                     | Nümbrecht, Deutschland                                                     |
| <b>Zellkulturflasche (25 cm², 75 cm², 175 cm²)</b>                           | Greiner Bio-One                                                      | Kremsmünster, Österreich                                                   |

### 3.1.3 Chemikalien

| <b>Chemikalie</b>                                   | <b>Hersteller</b>                                                        | <b>Hauptsitz</b>               |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>100x Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail</b> | Cell Signaling Technology Europe B.V.                                    | Frankfurt/Main,<br>Deutschland |
| <b>10x RIPA-Puffer</b>                              | Cell Signaling Technology Europe B.V.                                    | Frankfurt/Main,<br>Deutschland |
| <b><sup>18</sup>F-FDG</b>                           | Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Rostock | Rostock, Deutschland           |
| <b>5-Fluorouracil</b>                               | VEZ Universität Rostock                                                  | Rostock, Deutschland           |
| <b>Abemaciclib</b>                                  | Selleckchem                                                              | München, Deutschland           |
| <b>Acridinorange</b>                                | AppliChem                                                                | Darmstadt, Deutschland         |
| <b>Bacilol® AF</b>                                  | BODE Chemie GmbH                                                         | Hamburg, Deutschland           |
| <b>Biocoll-Separating Solution</b>                  | Biochrom                                                                 | Berlin, Deutschland            |
| <b>Blocking-Puffer</b>                              | LI-COR                                                                   | Lincoln, USA                   |
| <b>Bradfordreagenz</b>                              | Bio-Rad                                                                  | Hercules, USA                  |
| <b>Bromphenolblau</b>                               | Roth                                                                     | Karlsruhe, Deutschland         |



|                                                                           |                          |                         |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>Calcein AM</b>                                                         | Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA            |
| <b>CFDA (5-(and-6-) Carboxyfluorescein diacetate. Succinimidyl ester)</b> | Biotium, Inc.            | Fremont, USA            |
| <b>Cisplatin</b>                                                          | VEZ Universität Rostock  | Rostock, Deutschland    |
| <b>Criterion™ TGX Precast Gels</b>                                        | Bio-Rad                  | Hercules, USA           |
| <b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>                                            | AppliChem                | Darmstadt, Deutschland  |
| <b>Dinaciclib</b>                                                         | Selleckchem              | München, Deutschland    |
| <b>Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat</b>                                 | Merck Millipore          | Darmstadt, Deutschland  |
| <b>DMEM/Ham's F12 (1:1)</b>                                               | PAN-Biotech GmbH         | Aidenbach, Deutschland  |
| <b>Ethanol 96 %</b>                                                       | Walter-CMP GMBH & CO. KG | Kiel, Deutschland       |
| <b>Fetales Kälberserum (FBS)</b>                                          | PAN-Biotech GmbH         | Aidenbach, Deutschland  |
| <b>Gemcitabin</b>                                                         | VEZ Universität Rostock  | Rostock, Deutschland    |
| <b>Glycerin</b>                                                           | Merck Millipore          | Darmstadt, Deutschland  |
| <b>Glycin</b>                                                             | Roth                     | Karlsruhe, Deutschland  |
| <b>Kaliumchlorid</b>                                                      | Merck Millipore          | Darmstadt, Deutschland  |
| <b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>                                           | Roth                     | Karlsruhe, Deutschland  |
| <b>Kristallviolett</b>                                                    | AppliChem                | Darmstadt, Deutschland  |
| <b>L-Glutamin</b>                                                         | PAN-Biotech GmbH         | Aidenbach, Deutschland  |
| <b>Mercaptoethanol</b>                                                    | Roth                     | Karlsruhe, Deutschland  |
| <b>Methanol</b>                                                           | J.T. Baker               | Deventer, Niederlande   |
| <b>Natriumazid</b>                                                        | Roth                     | Karlsruhe, Deutschland  |
| <b>Natriumchlorid</b>                                                     | Roth                     | Karlsruhe, Deutschland  |
| <b>Palbociclib</b>                                                        | Selleckchem              | München, Deutschland    |
| <b>Penicillin/Streptomycin</b>                                            | Biochrom                 | Berlin, Deutschland     |
| <b>Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4</b>                            | Sigma-Aldrich            | St. Louis, USA          |
| <b>Ponceau S-Lösung</b>                                                   | Serva                    | Heidelberg, Deutschland |
| <b>Popidiumjodid (PI)</b>                                                 | AppliChem                | Darmstadt, Deutschland  |
| <b>SDS (Natriumdodecylsulfat)</b>                                         | Serva                    | Heidelberg, Deutschland |
| <b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)</b>                             | Roth                     | Karlsruhe, Deutschland  |
| <b>Trypanblau (0,02 %)</b>                                                | Sigma-Aldrich            | St. Louis, USA          |
| <b>Trypsin/EDTA (0,25 %/0,02 %)</b>                                       | Biochrom GmbH            | Berlin, Deutschland     |
| <b>Tween 20</b>                                                           | Roth                     | Karlsruhe, Deutschland  |
| <b>Yo-Pro 1</b>                                                           | Invitrogen               | Oregon, USA             |

### Antikörper für den Western Blot

| Antikörper                         | Hersteller                               | Hauptsitz                   |
|------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|
| <b>CDK2</b>                        | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |
| <b>CDK4</b>                        | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |
| <b>CDK6</b>                        | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |
| <b>CDK7</b>                        | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |
| <b>CDK9</b>                        | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |
| <b>AKT</b>                         | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |
| <b>pAKT</b>                        | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |
| <b><math>\alpha</math>-Tubulin</b> | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |
| <b>GAPDH</b>                       | Cell Signaling Technology<br>Europe B.V. | Frankfurt/Main, Deutschland |

### Antikörper für die Durchflusszytometrie

| Antikörper          | Konjugat     | Klon       | Hersteller                 | Hauptsitz              |
|---------------------|--------------|------------|----------------------------|------------------------|
| <b>CD152</b>        | PE           | BNI3       | Biolegend                  | San Diego, CA          |
| <b>CD223</b>        | FITC         | 11C3C65    | Biolegend                  | San Diego, CA          |
| <b>CD273</b>        | APC          | 24F.10C12  | Biolegend                  | San Diego, CA          |
| <b>CD274</b>        | PECy7        | 29E.2A3    | Biolegend                  | San Diego, CA          |
| <b>CD276</b>        | PE           | DCN.70     | Biolegend                  | San Diego, CA          |
| <b>CD366</b>        | APC          | F38-2E2    | Biolegend                  | San Diego, CA          |
| <b>CD70</b>         | FITC         | 113-16     | Biolegend                  | San Diego, CA          |
| <b>Calreticulin</b> | unkonjugiert | polyklonal | Antibodies-<br>Online GmbH | Aachen,<br>Deutschland |

### **3.1.4 Medien, Puffer, Lösungen**

#### **Vollmedium**

500 ml DMEM/Ham's F12 (1:1)

50 ml FBS

6-8 ml L-Glutamin (final 3mM)

Mischung Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml, 5ml/500ml Medium)

#### **1x PBS**

1 Beutel Phosphate Buffered Saline (PBS)

ad 1000 ml Aqua dest.

#### **Freezingmedium**

45 ml FBS

5 ml DMSO

#### **Kristallviolettlösung (final: 0.2 %)**

200 mg Kristallviolett

2 ml Ethanol absolut

ad 100 ml Aqua dest.

#### **10x Acridinorangelösung**

200 mg Acridinorange

450 mg Natriumchlorid

ad 500 ml Aqua dest.

#### **SDS-Lösung**

1 g SDS

ad 100 ml Aqua dest.

#### **Ethanol 70 %**

36 ml Ethanol 96 %

15 ml Aqua dest.



1x Elektrophoresepuffer

0,075 M TRIS  
0,5 M Glycin  
0,01 M SDS  
ad 9000 ml Aqua dest.

1x RIPA-Lysepuffer

100 µl 10x RIPA-Puffer  
900 µl Aqua ad Injectiva  
10 µl 100x Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail

2x Probenpuffer

0,01 M SDS  
22 vol % Glycerin  
0,005 M EDTA (5 mM, pH 8)  
25 vol % Sammelgelpuffer  
1 Spatelspitze Bromphenolblau  
ad 100 ml Aqua dest.

Anode II-Puffer (pH 10,4)

0,3 M TRIS  
20 vol % Methanol  
ad 1000 ml Aqua dest.

10x PBS/Tween-Puffer (pH 7,4)

2,5 M Natriumchlorid  
0,05 M Kaliumchlorid  
0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat  
0,04 M Kaliumdihydrogenphosphat  
0,5 % vol % Tween 20  
ad 2000 ml Aqua dest.

#### Stripping-Puffer (pH 2)

0,02 M Glycin  
0,07 M SDS  
ad 1000 ml Aqua dest.

#### Sammelgelpuffer (pH 6.8)

0,5 M TRIS  
0,01 M SDS  
ad 100 ml Aqua dest.

#### CFDA Working-Stock (4 mM)

1 mg CFDA  
250 µl DMSO

### 3.1.5 Software

| Software                                            | Hersteller        | Hauptsitz                        |
|-----------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------|
| GraphPad Prism 6                                    | GraphPad Software | San Diego, USA                   |
| IC <sub>50</sub> Calculator                         | AAT Bioquest      | California, USA                  |
| Image Studio Lite 5 Software                        | LI-COR            | Lincoln, USA                     |
| Microsoft Office 2016<br>(Excel, Word, Power Point) | Microsoft         | Unterschleißheim,<br>Deutschland |
| ZEN                                                 | Carl Zeiss        | Jena, Deutschland                |

### 3.1.6 Zelllinien

Die Untersuchungen wurden an vier epithelialen HNSCC-Zelllinien aus unterschiedlichen Regionen des Kopf-Hals-Bereiches durchgeführt. Sie wurden kommerziell von den Zellbanken CLS, DSMZ und Merck KGaA erworben. Alle Zelllinien sind HPV-negativ und tragen ein individuelles Mutationsprofil (64–67). Drei Zelllinien weisen eine bei HNSCC sehr häufige Mutation im Tumorsuppressorgen *TP53* auf. Außerdem liegt bei allen vier Zelllinien eine Mutation bzw. Kopienzahlvariation (CNV, *copy number variation*) im *PIK3CA*-Gen vor. Die Zelllinien Detroit 562 und FaDu weisen zudem die für HNSCC typische genetische Veränderung im Tumorsuppressorgen *CDKN2A* auf. Im Gegensatz zu den drei anderen Zelllinien, welche aus einem Primärtumor etabliert wurden, stammt die Zelllinie Detroit 562 aus einer Metastase.

**Tabelle 1: Charakteristika der untersuchten HNSCC-Zelllinien.**

| Zelllinie                              | CAL-33                                                                            | Detroit 562                                                                       | FaDu                                                                                 | PE/CA-PJ15                                                                          |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Morphologie<br>(Lichtmikroskopie, 10x) |  |  |    |  |
| Ursprung                               | Zunge                                                                             | Pharynx                                                                           | Hypopharynx                                                                          | Zunge                                                                               |
| Alter [Jahre]                          | 69                                                                                |                                                                                   | 56                                                                                   | 45                                                                                  |
| Geschlecht                             | männlich                                                                          | weiblich                                                                          | männlich                                                                             | männlich                                                                            |
| Wachstumsart                           | adhärent                                                                          |                                                                                   |                                                                                      |                                                                                     |
| Verdopplungszeit* [h]                  | 33,1                                                                              | 58,6                                                                              | 25,7                                                                                 | 25,3                                                                                |
| HPV-Status                             | negativ                                                                           |                                                                                   |                                                                                      |                                                                                     |
| Mutationsprofil                        | PIK3CA <sup>mut</sup><br>TP53 <sup>mut</sup>                                      | PIK3CA <sup>mut</sup><br>TP53 <sup>mut</sup><br>CDKN2A <sup>mut</sup>             | PIK3CA (CNV)<br>TP53 <sup>mut</sup><br>CDKN2A <sup>mut</sup><br>SMAD4 <sup>mut</sup> | PIK3CA (CNV)                                                                        |

\*experimentell in Vorversuchen bestimmt (s. Anhang, Punkt 10.2)

## 3.2 Grundlegende zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Zellkultur und Passagieren

Die Zellen wurden im Brutschrank unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) und unter Verwendung von Vollmedium, basierend auf DMEM/Ham's F12-Medium (Punkt 3.1.4), kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Für das Ernten der Zellen aus den Kulturflaschen wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 3-5 ml 1x PBS gewaschen. Die adhären Zellen wurden zunächst durch Zugabe von 1x Trypsin/EDTA von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst. Nach 8 bis 12 min Inkubation im Brutschrank und anschließender Kontrolle des Ablösens der Zellen unter dem Lichtmikroskop wurde die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt. Zum Passagieren wurden 5 ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche (25/75/175 cm<sup>2</sup>) überführt und mit Medium (5/10/20 ml) aufgefüllt. Zu der restlichen Zellsuspension wurde frisches Medium gegeben.



### 3.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und zentrifugiert (8 min, 200 x g). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Freezingmedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Es folgte das Wegfrieren der Zellen über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  und anschließend in Flüssigstickstoff bis zur weiteren Verwendung.

Zum Auftauen wurden die weggefrorenen Zellen im Wasserbad langsam erwärmt. In einem 15 ml PP-Röhrchen wurden 4 ml Medium vorgelegt und die Zellsuspension hinzugegeben. Nach dem Zentrifugieren (8 min, 200 x g) und Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und die Zellen in eine Kulturflasche überführt.

### 3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Um tote von vitalen Zellen unterscheiden zu können, wurden zunächst die geernteten und resuspendierten Zellen mit Trypanblau versetzt. Der Farbstoff dringt durch die Membran toter Zellen und färbt diese blau an. Vitale Zellen bleiben ungefärbt und erscheinen bei anschließender Zählung unter dem Mikroskop hell (68). Dafür wurden 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit 50  $\mu\text{l}$  Trypanblau gut durchmischt. Die Zählkammer wurde mit 10  $\mu\text{l}$  dieser Suspension befüllt. Nach Zählung der vitalen Zellen in vier Großquadranten, wurde die Gesamtzellzahl nach folgender Gleichung (mit Verdünnungsfaktor = 2) berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadranten}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl.

### 3.2.4 Kristallviolettassay

Mit dem Kristallviolettassay kann die relative Dichte von adhärent wachsenden Zellen bestimmt werden. Folglich kann eine quantitative Aussage über die Vitalität einer *in vitro*-Kultur getroffen werden. Im Zuge des Zelltodes lösen sich die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturplatte ab. Durch Zugabe von Kristallviolett, welches an Proteine und DNA der Zellen bindet, werden die noch adhären Zellen angefärbt. Daraufhin kann mittels Absorptionsmessung die Biomasse der gefärbten Zellen in einer Monolayerschicht bestimmt werden. Diese schnelle und zuverlässige Methode eignet sich, um beispielsweise Aussagen zur Wirkung von Zytostatika auf eine Zellkultur zu treffen (69–71).

Zur Vorbereitung wurde das Medium verworfen und die 96-Well-Platte auf einem Papiertuch trockengeklopft. Nachdem die Wells mit 1x PBS gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe der Kristallviolett-Lösung 50 µl/Well. Nach 10 min Inkubation auf dem Schüttler bei RT wurde die Lösung verworfen, die Wells zweimal vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und die Platte über Nacht bei RT luftgetrocknet. Für die Quantifizierung wurde nach Zugabe einer SDS-Lösung (1 %, 100 µl/Well) und 10 min Inkubation auf dem Schüttler bei RT die Absorption mit Hilfe des Glomax bei 570 nm (Referenzwellenlänge: 620 nm) gemessen.

### **3.3 Basale Charakterisierung der HNSCC-Zellen**

#### **3.3.1 *In vitro*-Chemoresponsivität**

Die an den Zelllinien getesteten Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin wurden in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe mit sieben Konzentrationen (5-FU: 0,5 µM – 7680,0 µM; Cisplatin:  $16 \times 10^{-3}$  µM – 5 µM; Gemcitabin:  $0,2 \times 10^{-3}$  µM – 3,8 µM) zu den Zellen gegeben. Es wurden zunächst  $5 \times 10^3$  Zellen in 100 µl Medium pro Well in eine sterile 96-Well-Platte eingesät (drei Replikate pro Konzentration). Die Versuchsplatten verblieben zum Adhären der Zellen für 24 h im Brutschrank. Der Versuch wurde sowohl mit Behandlung der Zellen in einem Zyklus (72 h Inkubationszeit) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h Inkubationszeit) durchgeführt. Vor Zugabe der Substanz im zweiten Zyklus wurde das alte Medium in den Wells durch frisches Medium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Auswertung mittels Kristallviolettassay (Punkt 3.2.4).

#### **3.3.2 Radiosensitivität**

Zur Untersuchung der Radiosensitivität wurden die HNSCC-Zellen aus der Kulturflasche geerntet und je  $1,5 \times 10^4$  Zellen davon in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in einer Gamma-Bestrahlungsanlage mit sieben Strahlendosen von 1 Gy bis 100 Gy. Die bestrahlten Zellen wurden zu je  $5 \times 10^3$  Zellen pro Well in 200 µl Medium (drei Replikate pro Strahlendosis) in eine 96-Well-Platte eingesät. Die Platten verblieben 72 h im Brutschrank. Die Auswirkung der Bestrahlung auf die Zellproliferation wurde mittels Kristallviolettassay untersucht (Punkt 3.2.4).

#### **3.3.3 $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme behandelter HNSCC-Zellen**

$^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxyglukose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) ist ein Glukoseanalogon, welches für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur nichtinvasiven Untersuchung des Glukosemetabolismus im Menschen beispielsweise im Rahmen des Tumorstagings verwendet wird (72, 73). Es



wurde die Beeinflussung der Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FDG von HNSCC-Zellen durch die Vorbehandlung mit Zytostatika bzw. CDKI untersucht. Die Herstellung von  $^{18}\text{F}$ -FDG erfolgte durch die Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Rostock (s. Anhang). Zunächst wurden in eine 6-Well-Platte pro Well  $3 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium eingesät. Es erfolgte die Behandlung der Zellen mit 5-FU (2460 nM) bzw. Palbociclib (1000 nM) in einem Zyklus für 72 h. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurde das Medium aus den Wells abgesaugt, einmal mit 1 ml 1 x PBS gespült und anschließend je 2 ml 1x PBS zugegeben. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden Wells ohne Zellen (gefüllt mit 2 ml 1x PBS) mitgeführt und im weiteren Vorgehen wie Proben behandelt. Zu jeder Probe wurde 1 MBq  $^{18}\text{F}$ -FDG zugegeben und für 90 min im Brutschrank inkubiert. Außerdem wurden zur Ermittlung von Standardwerten je 1 MBq  $^{18}\text{F}$ -FDG direkt in die Gamma-Counter-Röhrchen gegeben und die Aktivität mit dem Gamma-Counter gemessen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt und jedes Well zweimal mit 1 ml 1x PBS gespült. Zum Lysieren der Zellen wurden 400 µl 0,1 M NaOH zugegeben und 10 min inkubiert. Danach erfolgte die vollständige Überführung aus den Wells in Gamma-Counter-Röhrchen und die Gamma-Counter-Messung.

### **3.4 Zielgerichtete Therapie mit CDKI**

Analog zu den Versuchen zur Ermittlung der Chemoresponsivität wurde der Einfluss der CDKI Palbociclib, Abemaciclib und Dinaciclib auf die Vitalität der HNSCC-Zellen getestet. Es wurden pro Well  $5 \times 10^3$  Zellen in 100 µl Medium eingesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank zum Adhärenieren wurden die Substanzen in sieben Konzentrationen (s. Tabelle 2) zu den Zellen gegeben. Die Behandlung erfolgte sowohl in einem als auch in zwei Zyklen mit 72 h Inkubationszeit pro Zyklus. Ausgewertet wurde mittels Kristallviolettassay (Punkt 3.2.4).



**Tabelle 2: Konzentrationen der CDKI zur Behandlung der HNSCC-Zellen.**

| Verdünnung | Konzentration [nM] |             |            |
|------------|--------------------|-------------|------------|
|            | Palbociclib        | Abemaciclib | Dinaciclib |
| 1          | 16,0               |             | 1,5        |
| 2          | 31,0               |             | 3,1        |
| 3          | 62,5               |             | 6,3        |
| 4          | 125,0              |             | 12,5       |
| 5          | 250,0              |             | 25,0       |
| 6          | 500,0              |             | 50,0       |
| 7          | 1000,0             |             | 100,0      |

### 3.5 Kombinationstherapie mit Zytostatika und CDKI – simultan vs. metronomisch

Nach der Untersuchung der Therapie mit den Einzelsubstanzen wurde die kombinierte Gabe von Zytostatika und CDKI getestet. Dabei wurde die simultane von der metronomischen Substanzbehandlung unterschieden. Bei beiden Varianten erfolgte die Substanzgabe in zwei Zyklen mit je 72 h Inkubationszeit pro Zyklus. Es wurden pro Well 3 x 10<sup>3</sup> Zellen in 100 µl Medium eingesät und die Substanzen nach 24 h dazugegeben. Vor der Zugabe der Substanzen im zweiten Zyklus wurde das Medium entfernt und durch frisches ersetzt. Die Auswertung erfolgte mittels Kristallviolettassay (Punkt 3.2.4). Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Konzentrationen für die Kombinationsbehandlung mit zwei Substanzen.**

| Substanz    | Konzentration [nM] |
|-------------|--------------------|
| 5-FU        | 2460,00            |
| Cisplatin   | 156,00             |
| Gemcitabin  | 0,12               |
| Palbociclib | 1000,00            |
| Dinaciclib  | 25,00              |

Um den Effekt der Kombinationstherapie zu analysieren, wurde das *Bliss Independence-Modell* genutzt und der Kombinationsindex (*Combination Index*, CI) berechnet. Dieses Modell beschreibt, dass die kombinierten Substanzen unabhängig voneinander wirken, ohne das Wirken der anderen Substanz zu stören, wobei jedoch beide zu einem gemeinsamen Ergebnis beitragen. Die Wahrscheinlichkeit für den beobachteten Kombinationseffekt  $E_{AB}$  (mit  $0 \leq E_{AB} \leq 1$ ) wird mit dem zu erwarteten additiven Effekt der Einzelsubstanzen ( $E_A + E_B(1 - E_A) = E_A + E_B - E_A E_B$ ; mit  $0 \leq E_A \leq 1$  und  $0 \leq E_B \leq 1$ ) ins Verhältnis gesetzt (74). Daraus resultiert die Berechnung des CI.

$$CI = \frac{E_A + E_B - E_A E_B}{E_{AB}}$$

**Formel 2: Berechnung des Kombinationsindex.**

CI – Kombinationsindex; E – Effekt; A – Substanz 1; B – Substanz 2;  $E_{AB}$  – Kombinationseffekt zweier Substanzen

Es kann somit eine Aussage über die Wirkung der beiden Substanzen in Kombination getroffen werden. Dabei werden die berechneten Werte folgendermaßen bewertet:  $CI < 1$  = synergistische Wirkung;  $CI = 1$  = additive Wirkung;  $CI > 1$  = antagonistische Wirkung (74).

### 3.6 Scratch Assay

Bei einem *Scratch Assay* wird das Schließen einer zuvor gesetzten Wunde in einem zellulären Monolayer beobachtet. Dafür wurden in eine 6-Well-Platte  $5 \times 10^5$  Zellen in 4 ml Medium pro Well eingesät. Im Brutschrank konnten die Zellen innerhalb von 24 h adhären. Mit einer sterilen 200 µl Pipettenspitze wurde in jedem Well eine Wunde gesetzt. Das Medium wurde abgesaugt und die Wells mit je 2 ml 1x PBS gewaschen. Es erfolgte die Behandlung der Zellen mit den Substanzen 5-FU, Palbociclib und Dinaciclib (Konzentrationen siehe Tabelle 3, Punkt 3.5). Anschließend wurde die sich schließende Wunde täglich unter dem Mikroskop begutachtet und fotografisch dokumentiert.

### 3.7 Durchflusszytometrie

#### 3.7.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Mit der Durchflusszytometrie, auch bekannt als FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*), können Zellen detektiert, gezählt und auf phänotypische Eigenschaften hin untersucht werden. Die suspendierten Zellen fließen dabei einzeln an einem Laserstrahl vorbei. Die resultierende Beugung bzw. Streuung des Laserlichts wird von zwei optischen

Sensoren detektiert. Durch Erfassen des Vorwärtstreulicht, welches ein Maß für die Ablenkung ist, können Informationen über die Zellgröße gewonnen werden. Das Seitwärtstreulicht, bedingt durch die Brechung des Lichts im rechten Winkel, gibt Auskunft über Eigenschaften der Zellen wie zum Beispiel die Granularität (75, 76).

Erweitert wird das Untersuchungsspektrum der Methode durch das Markieren der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern. Das monochromatische Licht des Lasers regt beim Vorbeifließen der Zellen Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs an. Dadurch erreichen diese kurzfristig ein höheres Energieniveau und geben die Energie danach in Form von Photonen wieder ab. Das Messen der abgegebenen Photonenkonzentration durch einen Detektor gibt Rückschlüsse auf die Menge an gebundenen Antikörpern, da zwischen ihnen eine direkte Proportionalität besteht. Damit können Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine quantitativ bestimmt und so Merkmale des Phänotyps erfasst werden. Da die Fluoreszenzfarbstoffe spezifische und bekannte Emissionsspektren aufweisen, gibt es die Möglichkeit der gleichzeitigen Analyse mit mehreren Fluorochromen in einer FACS-Messung (75, 76). In dieser Arbeit wurden alle durchflusszytometrischen Analysen am BD FACS Verse™ durchgeführt. Hierzu wurden 10.000 Events im Live Gate gemessen und mithilfe der BD FACSuite™-Software ausgewertet.

### 3.7.2 Phänotypisierung

Zunächst wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium in eine 6-Well-Platte eingesät und 24 h lang inkubiert. Um eventuelle Veränderungen im Phänotyp der Zellen durch die Therapie mit Zytostatika bzw. CDKI zu untersuchen, wurde die Phänotypisierung parallel an behandelten und unbehandelten Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die eingesäten Zellen für 24 h mit Zytostatika bzw. CDKI behandelt (Konzentrationen s. Tabelle 4). Die unbehandelten Zellen wurden ausschließlich mit frischem Medium versetzt. Danach wurden die Färbeansätze vorbereitet und in einer 96-Well-Platte mit 2 µl pro Antikörper (1 µg/Ansatz) vorgelegt. Die Zellen wurden mittels 1x Trypsin/EDTA geerntet und zu den Färbeansätzen gegeben.

#### Färbeansätze:

1. ungefärbt
2. CD223 FITC / CD152 PE / CD366 APC / CD274 PECy7
3. CD70 FITC / CD276 PE / CD273 APC



Zum Färben wurde die Platte für 30 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 200 µl/Well 1x PBS wurde die Reaktion abgestoppt. Die Platte wurde zentrifugiert (5 min, 300 x g), der Überstand dekantiert und die Pellets in 200 µl 1x PBS resuspendiert.

**Tabelle 4: Konzentrationen für die Untersuchung des Phänotyps.**

| Substanz    | Konzentration [nM] |
|-------------|--------------------|
| 5-FU        | 2460,0             |
| Cisplatin   | 156,0              |
| Gemcitabin  | 0,2                |
| Palbociclib | 5000,0             |
| Abemaciclib | 5000,0             |
| Dinaciclib  | 5000,0             |

### 3.7.3 Apoptose- / Nekrosebestimmung

Die Apoptose und Nekrose sind zwei durch morphologische Charakteristika deutlich unterscheidbare Mechanismen des Zelltodes (77). Die Apoptose ist der programmierte Zelltod, bei dem zunächst die Zellmembran intakt bleibt und die Zelle durch Aktivierung von Enzymen von innen heraus zerstört wird. Die Nekrose, auch akzidenteller Zelltod genannt, wird durch einen akuten, schädigenden Einfluss ausgelöst. Daraufhin werden intrazelluläre Proteine freigesetzt, die eine inflammatorische Reaktion stimulieren (78). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Behandlung mit Zytostatika bzw. CDKI unter Verwendung der fluoreszierenden Farbstoffe Yo-Pro 1 und Propidiumjodid (PI) bestimmt. Das grün fluoreszierende Yo-Pro 1 eignet sich zur Identifizierung von Apoptose, da apoptotische Zellen für diesen an Nukleinsäuren bindenden Farbstoff durchlässig werden. Das rot fluoreszierende PI wird jedoch von Zellen mit einer intakten Plasmamembran ausgeschlossen, wodurch hauptsächlich nekrotische und spät-apoptotische Zellen markiert werden (79, 80). Bei der Auswertung beider Fluoreszenzsignale kann die Population an vitalen (Yo-Pro 1/PI: -/-), früh-apoptotischen (Yo-Pro 1/PI: +/-), spät-apoptotischen (Yo-Pro 1/PI: +/+) und nekrotischen (Yo-Pro 1/PI: -/+) Zellen bestimmt werden. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten mit  $5 \times 10^5$  Zellen und 2 ml Medium pro Well eingesät. Nach dem Adhärenz über Nacht wurden die Zellen für 24 h bzw. 72 h mit den Substanzen (s. Tabelle 5) behandelt.

**Tabelle 5: Konzentrationen für die funktionellen Analysen.**

| Substanz    | Konzentration [nM] |
|-------------|--------------------|
| 5-FU        | 2460               |
| Cisplatin   | 156                |
| Palbociclib | 1000               |
| Dinaciclib  | 25                 |

Das Ernten der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben (Punkt 3.7.2). Nach dem Überführen der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen folgte das Waschen mit 1x PBS und das Zentrifugieren (8 min, 300 x g). Anschließend wurde das Zellpellet in 200 µl Yo-Pro 1-Färbelösung (Stammlösung: 1 mM; 1:5000) resuspendiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wurde das Pellet in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Kurz vor der Messung erfolgte die Zugabe von je 50 µl PI (Stammlösung: 20 µg/ml). Für Yo-Pro 1 erfolgte die Messung bei einer Exzitations- und Emissionswellenlängen von 491 nm/509 nm, bei PI von 488 nm/615 nm.

#### 3.7.4 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse nach Nicoletti basiert auf der Messung des DNA-Gehaltes der Zellkerne. Dazu werden die Zellen durch eine hypotone Lösung lysiert und die DNA der Zellkerne somit der Anfärbung mit PI direkt zugänglich gemacht. PI fungiert bei dieser Methode als DNA-Interkalator. Somit korreliert die gemessene Fluoreszenzintensität mit dem DNA-Gehalt, der während des Zellzyklus charakteristischen Änderungen unterliegt. Die Interphase kann anhand des DNA-Gehaltes im Histogramm in G1-, S- und G2/M-Phase unterteilt werden. In der G1-Phase liegt das genetische Material noch in einem diploiden Chromosomensatz (2n) vor. In der S-Phase folgt die Replikation, wonach in der G2/M-Phase zwei diploide Chromosomensätze (4n) vorliegen, die auf die Tochterzellen aufgeteilt werden (81).

Das Einsäen, Behandeln (24 h und 72 h) und Ernten der Zellen erfolgte analog zum Vorgehen bei der Apoptose- / Nekrosebestimmung (Punkt 3.7.3). Anschließend wurde die Suspension mit den geernteten Zellen zentrifugiert (8 min, 300 x g), mit 200 µl 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Zu jeder Probe wurde 1 ml 70 %iger eiskalter Ethanol gegeben und währenddessen gevortext. Die Proben wurden mindestens über Nacht bei 20 °C gelagert, danach zentrifugiert (5 min, 300 x g) und mit 2 ml 1x PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden



in 200 µl RNase (1 mg/ml verdünnt mit PBS/0,1 % Tween 20) aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurden 50 µl PI (Stammlösung: 20 µg/ml) zugegeben. Die Messung erfolgte bei einer Exzitations- und Emissionswellenlänge von 488 nm/615 nm.

### 3.7.5 Nachweis von Calreticulin

Calreticulin ist, wie das homologe Calnexin, ein Kalzium-bindendes Chaperon, das im endoplasmatischen Retikulum unvollständig gefaltete Proteine bindet. Es dient der Unterstützung und qualitativen Kontrolle der oligomeren Assemblierung (Calnexin-Calreticulin-Zyklus). Durch Bindung an die DNA nimmt Calreticulin Einfluss auf die Transkription verschiedener Gene. Außerdem übernimmt es Funktionen im Zytoplasma, der extrazellulären Matrix und an der Zelloberfläche (82, 83). In dieser Arbeit wurde der Anteil von transloziertem Calreticulin als Marker für den immunogenen Zelltod nach Behandlung der HNSCC-Zellen mit Zytostatika bzw. CDKI untersucht.

Das Einsäen, Behandeln und Ernten der Zellen erfolgte wie zuvor dargelegt (Punkt 3.7.3, Konzentrationen s. Tabelle 5) für 24 h. Die erhaltene Zellsuspension wurde pelletiert (8 min, 200 x g), der Überstand dekantiert und das Pellet in 700 µl 1x PBS resuspendiert. Die Zellen wurden entsprechend der Färbeansätze gefärbt:

#### Färbeansätze:

1. ungefärbt
2. sekundärer FITC-konjugierter Antikörper
3. Calreticulin + sekundärer FITC-konjugierter Antikörper

Zunächst erfolgte die Calreticulinfärbung für den 3. Färbeansatz (2 µl Antikörper/Ansatz). Hierzu wurden von der Zellsuspension 100 µl pro Ansatz in die FACS-Röhrchen überführt und gevortext. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurde die Reaktion durch Zentrifugation (8 min, 300 x g) abgestoppt und der Überstand dekantiert. Für die nicht mit Calreticulin gefärbten Ansätze wurden die Zellen in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Für die Färbeansätze 2 und 3 wurde der sekundäre Antikörper 1:100 mit 1x PBS verdünnt und jeweils 100 µl zu den Proben gegeben. Im Anschluss an die Inkubation (30 min, 4 °C) und dem Abstoppen der Reaktion mit 1x PBS folgte das Zentrifugieren und das Resuspendieren in 200 µl 1x PBS.

### 3.7.6 *In vitro*-Ko-Kultur mit PBMC

In dem Versuch wurde eine allogene Ko-Kultur von HNSCC-Zellen mit peripheren mononukleäre Zellen des Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von vier Spendern untersucht. Es erfolgten metronomische und simultane Behandlungsansätze, um



potentielle Therapie-bedingte autoimmunologische Effekte zu erfassen. Die Konzentrationen wurden auf Grundlage der IC<sub>30</sub>-Werte aus den vorangegangenen Versuchen gewählt und können Tabelle 5 (Punkt 3.7.3) entnommen werden.

#### Zellen ernten, färben und einsäen

Die Zellen wurden wie in Punkt 3.2 beschrieben geerntet und gezählt.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und pelletiert (8 min, 300 x g). Nach dem Waschen mit 10 ml 1x PBS und erneutem Pelletieren wurden die Zellen in 1 ml der Farbstofflösung resuspendiert. Zur Herstellung der Farbstofflösung wurde das CFDA (Stammlösung: 10 mM) mit 1x PBS im Verhältnis von 1:2000 verdünnt. Die Zellen wurden mit der Färbelösung 15 min lang im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml kaltem 1x PBS abgestoppt und die Zellen pelletiert. Es folgte ein weiteres Waschen und Pelletieren mit 10 ml 1x PBS und das Resuspendieren der Zellen in 2 ml Medium. Nach dem Zählen der Zellen wurden in eine 24-Well-Platte  $2 \times 10^4$  Zellen in 1 ml Medium pro Well eingesät.

#### Dichtegradient zur Isolation von PBMC

Es wurden die PBMC von vier Spendern isoliert. Zur Vorbereitung wurde die Biocoll-Separating Solution auf RT erwärmt und den Spendern ein EDTA-Röhrchen Blut abgenommen. Das Vollblut wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Das Blutentnahmehöhrchen wurde mit 10 ml 1x PBS gespült und der Inhalt zum Vollblut pipettiert. Es folgte das Auffüllen des PP-Röhrchens mit 1x PBS auf 25 ml und das langsame Unterschichten mit 14 ml Biocoll-Separating Solution. Nach dem Zentrifugieren (15 min, bei 900 x g, ohne Bremse) wurde die oberste Phase verworfen und der Interphasering mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml PP-Röhrchen transferiert. Anschließend wurde mit sterilem 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt und 50 µl der Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl entnommen (Punkt 3.2.3). Die verbleibende Suspension wurde abzentrifugiert (10 min, 300 x g, mit Bremse) und der Überstand abgesaugt. Die PBMC wurden nach Zugabe von 20 ml Medium über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

#### Behandlung der Zellen

In der einen Versuchsgruppe erfolgte die Behandlung der Zellen metronomisch. Dabei wurden die eingesäten Zellen zum Adhärenz 24 h lang inkubiert, für 24 h mit Zytostatika bzw. CDKI vorbehandelt (Konzentrationen s. Tabelle 5, Punkt 3.7.3) und nach Zugabe der Spender-PBMC weitere 72 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Bei der zweiten Gruppe erfolgte der simultane Behandlungsansatz ohne Vorbehandlung der Zellen. Zur

Vergleichbarkeit wurden die Zellen hierbei analog zum metronomischen Behandlungsansatz nach dem Adhärenzieren für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Behandlung (Konzentrationen s. Tabelle 5, Punkt 3.7.3) simultan mit der Zugabe der PBMC durchgeführt, gefolgt von 72 h Inkubation im Brutschrank. Als Kontrollgruppe wurden unbehandelte HNSCC-Zellen nach gleichem Schema mit den PBMC ko-kultiviert und ebenfalls für 72 h im Brutschrank inkubiert. Bei allen drei Behandlungsansätzen (metronomisch, simultan, unbehandelt) wurden 500 µl der Spender-PBMC (Ratio: 1:10) in die Wells mit den HNSCC-Zellen pipettiert.

#### Zellen ernten und durchflusszytometrische Quantifizierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die PBMC mit dem Medium abgenommen, die Wells mit 100 µl 1x PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen je 200 µl Trypsin zugegeben. Alle Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren (8 min, 200 x g) und erneutem Waschen wurden die Zellen in 200 µl 1x PBS aufgenommen. Pro Probe wurden 50 µl Beads (Stammlösung:  $1,4 \times 10^5$  Beads/ml; 1:35 in 1x PBS verdünnt) zugegeben. Kurz vor der Messung wurden 50 µl PI zu den Proben pipettiert, um den Anteil an toten Zellen zu bestimmen. Die Zellen wurden bei Exzitations- und Emissionswellenlängen von 491 nm/509 nm (CFDA) und 488 nm/615 nm (PI) unter Berücksichtigung von 5.000 Events (Gate bezogen auf die Beads) gemessen. Zur Auswertung wurde die gemessene Zellzahl ins Verhältnis zu 5.000 Beads gebracht, um die absolute Zellzahl zu erhalten. Die Zellzahl wurde dann in Relation zur Kontrolle gesetzt.

### **3.8 Weitere funktionelle Analysen**

#### **3.8.1 Nachweis von Autophagie**

Das Ziel dieser Methode ist es, die Autophagie als weitere Form des Zelltodes nach Behandlung mit Zytostatika bzw. CDKI zu untersuchen. Die Zellen wurden dazu mit Acridinorange und Calcein AM angefärbt. Acridinorange ist eine schwache Base, die membrangängig ist. Bei niedrigem pH wird es protoniert und ist positiv geladen. In diesem Zustand kann es Zellmembranen nicht mehr frei passieren. Es akkumuliert und wird in sauren Vesikeln wie Lysosomen, Endosomen und Autophagosomen lebender Zellen eingeschlossen. Im Gegensatz zu der grün-fluoreszierenden, monomeren Form lumineszieren die Aggregate von Acridinorange in den Vesikeln rot (84). Somit kann die autophagozytotische Aktivität im Zusammenhang mit der Substanzbehandlung der Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Calcein AM ist ein zellendurchlässiger, nicht-fluoreszierender Farbstoff. Nach der



Aufnahme in die vitale Zelle wird es durch intrazelluläre Esterasen in ein grün-fluoreszierendes Calcein umgewandelt (85). Die Exzitations- und Emissionswellenlänge liegt bei 495 nm/515 nm. Bei toten Zellen fehlen die nötigen Esterasen, wodurch bei Detektion nur vitale Zellen erfasst werden.

Zur Vorbereitung wurde die 10x Acridinorangelösung mit 1x PBS im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Diese wurde wiederum mit Calcein AM (Stammlösung: 4 mM) im Verhältnis von 1:250 verdünnt. Die Zellen wurden in *Chamber Slides* mit je  $2 \times 10^4$  Zellen in 500 µl Medium pro Kammer eingesät. Nach 24 h Adhärenz wurden diese mit Zytostatika bzw. CDKI (Konzentrationen s. Tabelle 5; Punkt 3.7.3) behandelt und 24 h inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, vorsichtig mit 1x PBS gespült und in jedes Well 50 µl der vorbereiteten Acridinorange/Calcein AM-Lösung gegeben. Es folgten 15 min Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µl 1x PBS pro Kammer abgestoppt, der Überstand abgesaugt und die Kammern erneut mit 400 µl 1x PBS befüllt. Bis zur mikroskopischen Auswertung mit dem Laser-Scanning-Mikroskop wurden die gefärbten Zellen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

### 3.8.2 Western Blot

Mit der Methode des Western Blots wurde das Vorhandensein bzw. der Aktivitätszustand spezifischer Proteine untersucht. Dazu wurden zunächst die Zellen mit RIPA-Puffer und Ultraschall lysiert, die Proteine mittels Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt und das Gel auf eine Membran gebロットet. Daraufhin wurde die Membran mit primären Antikörpern inkubiert, die spezifisch an die nachzuweisenden Zielproteine binden. Die Detektion erfolgte nach Bindung fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper. Anhand seiner Größe konnte das Protein auf der Membran identifiziert werden. Bei der Auswertung mit dem LI-COR Odyssey Infrared Imaging System ließen sich zusätzlich quantitative Aussagen hinsichtlich des Proteins treffen, da ein direkter Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Intensität der fluoreszierenden Bande besteht.

#### Zellen einsäen und behandeln

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten mit  $3 \times 10^6$  Zellen und 2 ml Medium pro Well eingesät. Im Versuch zum Nachweis von CDK2/4/6/7/9 wurden die Zellen für 24 h mit 5-FU, Cisplatin, Palbociclib und Dinaciclib behandelt (Konzentrationen s. Tabelle 5; Punkt 4.7.3). Ergänzend wurde die basale Abundanz von AKT und phosphoryliertem AKT (pAKT) erfasst.



#### Herstellung des RIPA-Puffer-Lysates

Zum Lysieren der Zellen wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium in ein Reaktionsgefäß pipettiert und zentrifugiert (5 min, 2000 x g). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet nochmals für 2 min trocken zentrifugiert und anschließend in 80 µl 1x RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Nach dem Vortexen wurde das Lysat 20-30 min lang auf Eis gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

#### Lysieren mit Ultraschall

Vor der Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte das Lysieren mit Ultraschall. Dazu wurden die RIPA-Puffer-Lysate auf Eis aufgetaut und zweimal 8 s lang mit Ultraschall lysiert.

#### Proteinbestimmung nach Bradford

Mit dem Bradfordassay können Proteinkonzentrationen in Lysaten bestimmt werden. Dazu wird der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau (Bradfordreagenz) verwendet. Es kommt zur Farbveränderung von rot zu blau durch Proteinbindung und der daraus folgenden Verschiebung von der protonierten zur deprotonierten Form des Reagenzes. Es wird eine Eichkurve mit mehreren Standardverdünnungen von 1-25 µg/ml erstellt. Dadurch kann nach Absorptionsmessung mittels Photometer die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

Nach der Ultraschalllyse wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 12000 x g, 4 °C) und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit Aqua dest. wurden daraus Verdünnungen von 1:400, 1:600 und 1:800 in einem Volumen von 800 µl angesetzt. Zu den verdünnten Lysaten und den Standardverdünnungen wurden je 200 µl Bradfordreagenz pipettiert. Die gefärbten Proben bzw. Standardproben wurden dann in Triplets mit je 200 µl in eine 96-Well-Platte mit flachen Böden pipettiert. Es folgte die Absorptionsmessung bei 600 nm mit dem Glomax. Aus den Ergebnissen wurde die Standardkurve ermittelt und die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

Die restlichen Proteinlysate wurden im Verhältnis von 1:1 mit 2x Probenpuffer (5 % Mercaptoethanol) gemischt, im Heizblock bei 95-99 °C für 10 min denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt und bei -80 °C eingefroren.

#### Durchführung des Western Blots

Die Durchführung des Western Blots beginnt mit der Gelelektrophorese. Die dafür benötigte Elektrophoresekammer wurde mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt und die Fertiggele eingesetzt. Von jeder Probe wurden 30 µg Protein in einem Reaktionsgefäß mit

1x Probenpuffer auf ein Volumen von 20 µl eingestellt. Es folgte das Befüllen der Geltaschen mit den Proben unter Verwendung von Gelloader-Pipettenspitzen. Die erste und letzte Tasche wurde mit 3 µl bzw. 8 µl Proteingrößenstandard (mit 1x Probenpuffer auf 20 µl aufgefüllt) beladen. Leere Taschen wurden mit 1x Probenpuffer befüllt. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für 10 min gestartet, bei 200 V für weitere 10 min und bei 250 V bis zum vollständigen Durchlaufen der Farbstofffront fortgeführt. Anschließend wurden die Proteinbanden durch den Semi-dry Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Für das Blotten wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System genutzt (10 min, 2,5 A, 25 V). Die Membran wurde für 5 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt, mit Aqua dest. entfärbt und anhand der Markerbanden geschnitten. Die Membranen wurden in dunklen Inkubationsschälchen dreimal 5 min in Anode II-Puffer geschwenkt und dreimal 5 min in 1x PBST gewaschen. Zum Blocken wurden die Membranen auf dem Schüttler 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C in 1:3 Blocking-Puffer/1x PBST inkubiert.

**Tabelle 6: Antikörper für Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot.**

| Antikörper    | Wirt      | Verdünnung | Größe [kDa] |
|---------------|-----------|------------|-------------|
| CDK2          | Kaninchen | 1:1000     | 33,0        |
| CDK4          | Kaninchen | 1:1000     | 30,0        |
| CDK6          | Kaninchen | 1:1000     | 36,0        |
| CDK7          | Maus      | 1:1000     | 40,0        |
| CDK9          | Kaninchen | 1:1000     | 42,5        |
| AKT           | Kaninchen | 1:500      | 60,0        |
| pAKT (Ser473) | Kaninchen | 1:500      | 60,0        |
| α-Tubulin     | Maus      | 1:500      | 55,0        |
| GAPDH         | Maus      | 1:20.000   | 37,0        |

Die Primärantikörper wurden mit 1:5 Blocking-Puffer/1x PBST verdünnt (Verdünnungen s. Tabelle 6) und die Membranen für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Unter Zugabe von 10 µl 10 %igem Natriumazid wurden die Primärantikörper bei -20 °C bis zur nächsten Verwendung eingefroren. Nach viermaligem Waschen der Membranen für 4 min mit PBST wurden die fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper mit 1:5 Blocking-Puffer/1x PBST im Verhältnis von 1:5000 verdünnt und die Membranen damit für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Membranen wurden viermal 4 min in PBST gewaschen, in

PBS gelegt und anschließend mit dem LI-COR Odyssey Infrared Imaging System detektiert. Die Auswertung erfolgte mit der Image Studio Lite 5-Software. Für die Detektion weiterer Proteine auf denselben Membranen wurden diese 5 min in PBST gewaschen. Danach wurde Stripping-Puffer zugegeben und zunächst 45 min bei 56 °C, dann 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach viermaligem Waschen für 4 min in PBST wurden die Membranen wie oben beschrieben geblockt und mit Primärantikörpern inkubiert.

### 3.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 6 verwendet. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung ( $\pm$  SD) dargestellt. Zur Auswertung der Messwerte hinsichtlich der Signifikanz wurde der t-Test (two-tailed) mit einem Konfidenzintervall von  $\alpha = 0,05$  verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $\leq 0,05$  angenommen. Die Kennzeichnung der p-Werte wurde wie folgt festgelegt:  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$ .



## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde das antitumorale und immunmodulatorische Potential verschiedener CDKI gegenüber HNSCC-Zelllinien sowohl in Mono- als auch Kombinationstherapie mit konventionellen Zytostatika *in vitro* evaluiert. Im Rahmen der Vorversuche erfolgte zunächst eine basale Charakterisierung von vier HNSCC-Zelllinien (CAL-33, Detroit 562, FaDu und PE/CA-PJ15). Die weiterführenden Untersuchungen zur detaillierten Charakterisierung der direkten und indirekten zytotoxischen Effekte sowie funktionellen Analysen erfolgten an zwei ausgewählten Zelllinien (CAL-33 und Detroit 562). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind nachfolgend dargestellt. Zur Übersichtlichkeit werden repräsentative Daten der Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 gezeigt. Weitere Ergebnisse, die für die Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 erhoben wurden, sind entsprechend dem Anhang zu entnehmen.

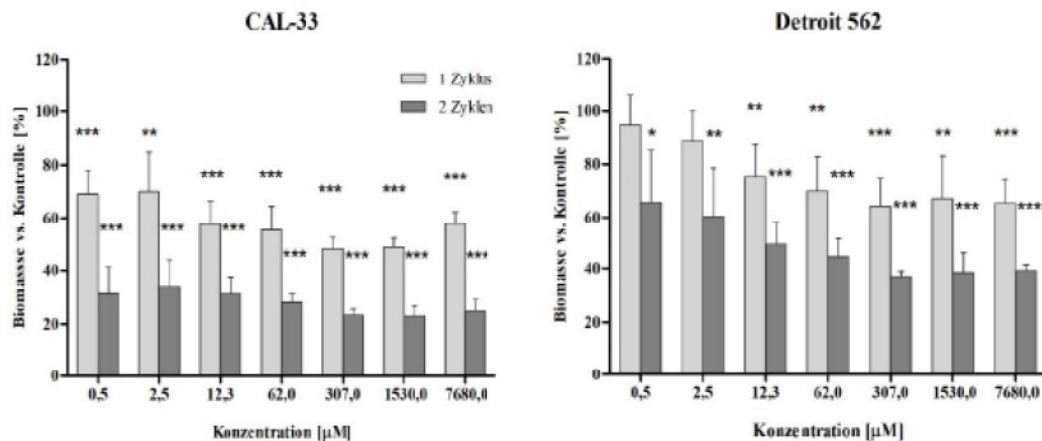
### 4.1 Basale Charakterisierung der HNSCC-Zellen

#### 4.1.1 *In vitro*-Chemoresponsivität

Um die Chemoresponsivität *in vitro* zu untersuchen, wurden die HNSCC-Zellen mit den konventionellen Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin behandelt. Dabei wurden die Substanzen in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe bestehend aus sieben Konzentrationen getestet. Die Behandlung erfolgte sowohl einfach (in einem Zyklus, 72 h) als auch zweifach (in zwei Zyklen, 2 x 72 h). Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Biomasse der Zellen sind normalisiert zur Kontrollgruppe, bestehend aus unbehandelten Zellen, als Konzentrations-Wirkungs-Kurve dargestellt (Abb. 6-8 und 27-29). Die resultierenden  $IC_{50}$ -Werte für die einzelnen Substanzen und Zelllinien sind in Tabelle 7 (s. Seite 42) zusammengefasst.

#### Behandlung der Zellen mit 5-FU

5-FU wurde in Konzentrationen von 0,5  $\mu$ M bis 7680,0  $\mu$ M eingesetzt. Bei allen Zelllinien wurde eine dosisabhängige Reduktion der Biomasse und eine deutlich stärkere Wachstums- hemmung nach zweifacher Behandlung nachgewiesen (Abb. 6 und Anhang Abb. 27). Bei den CAL-33-Zellen war bereits nach einem Zyklus für alle Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Biomasse zu verzeichnen. Der  $IC_{50}$ -Wert betrug 162,8  $\mu$ M. Bei zwei Zyklen lag der  $IC_{50}$ -Wert unterhalb der kleinsten getesteten Konzentration von 0,5  $\mu$ M. Bei den Detroit 562-Zellen zeigte 5-FU einen geringeren Effekt mit  $IC_{50} > 7680,0 \mu$ M für die einfache und  $IC_{50} = 54,5 \mu$ M für die zweifache Behandlung.



**Abbildung 6: Einfluss von 5-FU auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

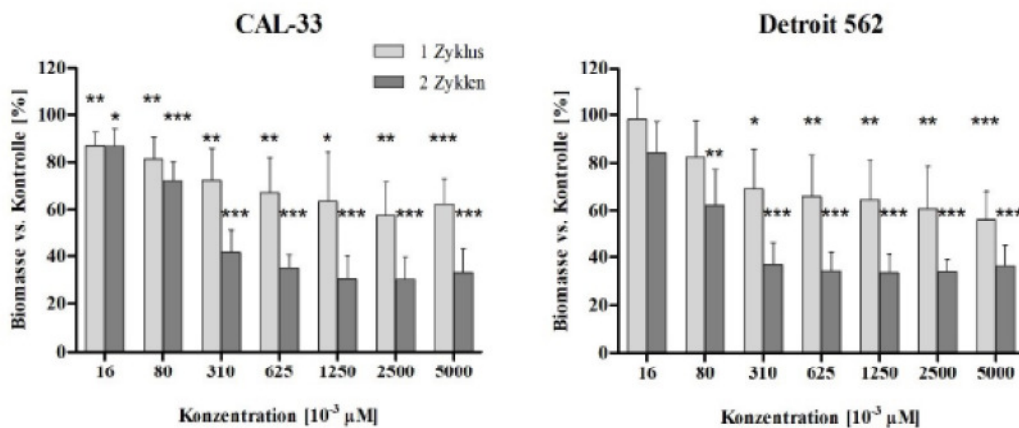
Die Behandlung mit 5-FU erfolgte sowohl in einem Zyklus (72 h, hellgrau) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h, dunkelgrau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 4$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 erhoben (s. Anhang Abb. 27). Zusammenfassend konnte eine zelllinienspezifische und dosisabhängige Wirksamkeit von 5-FU auf die untersuchten Zelllinien detektiert werden, mit höherer Sensitivität bei den CAL-33- und FaDu-Zellen.

#### Behandlung der Zellen mit Cisplatin

Cisplatin wurde in geringeren Konzentrationen von 16 nM bis 5000 nM getestet. Es resultierte eine typische Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit einer zunächst stark zunehmenden Biomassereduktion und dem Erreichen eines Plateaus auf niedrigem Biomasselevel im Bereich höherer Konzentrationen (Abb. 7). Bei beiden Zelllinien (CAL-33 und Detroit 562) zeigte die einfache Behandlung mit Cisplatin einen moderaten wachstumshemmenden Effekt, sodass sich  $IC_{50}$ -Werte  $> 5000$  nM ergaben. Die Zelllinie CAL-33 zeigt bei zweifacher Behandlung ab der dritten Konzentrationsstufe (310 nM) ein deutliches Ansprechen auf Cisplatin. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 235,5 nM. Die Detroit 562-Zellen verhielten sich ähnlich mit  $IC_{50} = 220,7$  nM.





**Abbildung 7: Einfluss von Cisplatin auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

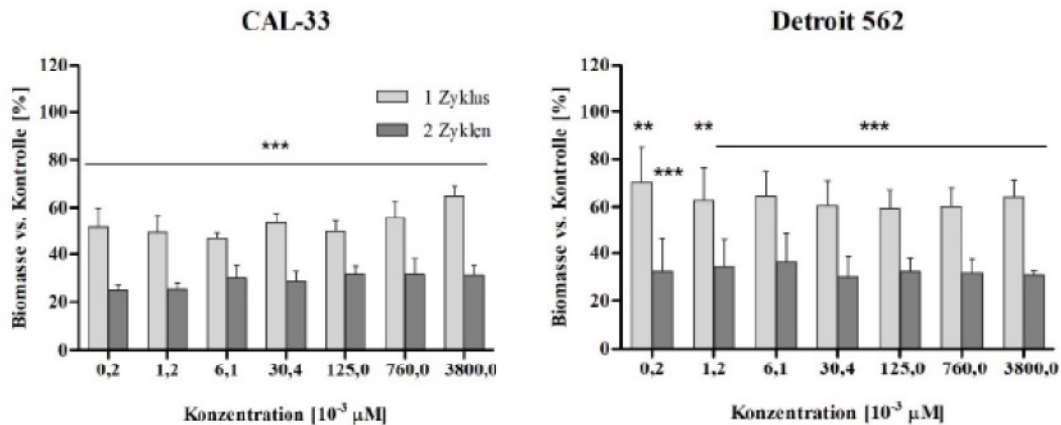
Die Behandlung mit Cisplatin erfolgte sowohl in einem Zyklus (72 h, hellgrau) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h, dunkelgrau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelten Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

In Analogie zu den Befunden der Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 bewirkte Cisplatin auch bei den anderen Zelllinien moderate Effekte nach einfacher Behandlung, welche bei wiederholter Gabe zu einer dosisabhängigen, zelllinienspezifischen Reduktion der Biomasse führten (s. Anhang Abb. 28). Im Bereich geringer Konzentrationen war die Zelllinie PE/CA-PJ15 am wenigsten sensitiv gegenüber Cisplatin, jedoch zeigte sich bei den höheren Konzentrationen eine mit den anderen Zelllinien vergleichbare Biomassereduktion. Der  $IC_{50}$ -Wert bei PE/CA-PJ15 lag bei 709,0 nM.

#### Behandlung der Zellen mit Gemcitabin

Gemcitabin zeigte bei allen vier Zelllinien im gesamten Konzentrationsbereich von 0,2 nM bis 3800,0 nM einen vergleichbaren Effekt, sodass sich keine typische Konzentrations-Wirkungs-Kurven ergaben (Abb. 8 bzw. Anhang Abb. 29). Bei den CAL-33-Zellen war bei einfacher und zweifacher Behandlung ab der geringsten Konzentration eine starke Reduktion der Biomasse zu verzeichnen ( $IC_{50} < 0,2$  nM). Ähnliche Effekte wurden bei den Detroit 562-Zellen nachgewiesen, aber bei einer insgesamt etwas geringeren Sensitivität.





**Abbildung 8: Einfluss von Gemcitabin auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Behandlung mit Gemcitabin erfolgte sowohl in einem Zyklus (72 h, hellgrau) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h, dunkelgrau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

Die Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 zeigten ebenfalls bereits bei der geringsten Konzentration ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit Gemcitabin, welches mit einer signifikanten Biomassereduktion einherging (s. Anhang Abb. 29). Allerdings führte eine Konzentrationssteigerung zu keiner weiteren Reduktion der Biomasse. Wie auch bei den anderen zwei Zelllinien lag bei zweifacher Behandlung eine gegenüber der einfachen Behandlung stärkere Biomassereduktion vor.

In Tabelle 7 sind die  $IC_{50}$ -Werte für die Behandlung der HNSCC-Zellen mit 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin zusammengefasst dargestellt. Bei allen Substanzen und Zelllinien ergaben sich bei zweifacher Behandlung deutlich kleinere  $IC_{50}$ -Werte als bei einmaliger Substanzgabe. Darüber hinaus wurden zelllinienspezifische Unterschiede mit insgesamt bestem Ansprechen auf Gemcitabin identifiziert.

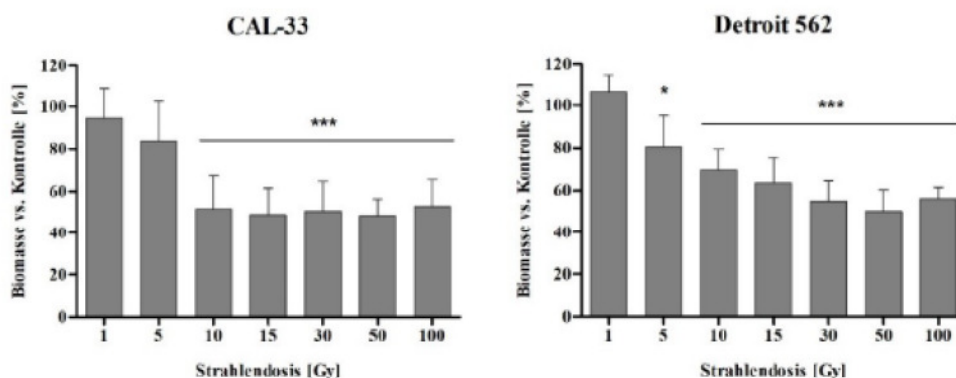
**Tabelle 7: IC<sub>50</sub>-Werte der Behandlung mit Zytostatika.**

| IC <sub>50</sub> [µM] | 5-FU     |          | Cisplatin |                          | Gemcitabin               |                          |
|-----------------------|----------|----------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       | 1 Zyklus | 2 Zyklen | 1 Zyklus  | 2 Zyklen                 | 1 Zyklus                 | 2 Zyklen                 |
| CAL-33                | 162,8    | < 0,5    | > 5,0     | 235,5 x 10 <sup>-3</sup> | < 0,2 x 10 <sup>-3</sup> | < 0,2 x 10 <sup>-3</sup> |
| Detroit 562           | > 7680,0 | 54,5     | > 5,0     | 220,7 x 10 <sup>-3</sup> | > 3,8                    | < 0,2 x 10 <sup>-3</sup> |
| FaDu                  | 83,7     | 8,4      | > 5,0     | 273,1 x 10 <sup>-3</sup> | < 0,2 x 10 <sup>-3</sup> | < 0,2 x 10 <sup>-3</sup> |
| PE/CA-PJ15            | > 7680,0 | 48,4     | > 5,0     | 709,0 x 10 <sup>-3</sup> | 0,2                      | < 0,2 x 10 <sup>-3</sup> |

Dargestellt sind die IC<sub>50</sub>-Werte der Behandlung der vier HNSCC-Zelllinien mit den Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin. Die Werte wurden für die Behandlung in einem Zyklus (72 h) und in zwei Zyklen (2 x 72 h) ermittelt. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus n ≥ 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

#### 4.1.2 Radiosensitivität

In weiterführenden Untersuchungen wurde die Abhängigkeit der zellulären Biomasse von der Strahlendosis im Bereich von 1 Gy bis 100 Gy erfasst. Die Ergebnisse sind normalisiert zur unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es zeigte sich bei allen vier Zelllinien eine typische Dosis-Wirkungskurve (Abb. 9 bzw. Anhang Abb. 30). Bei allen Zelllinien war jedoch erst ab einer Strahlendosis von 5 Gy bzw. 10 Gy ein signifikanter Effekt mit resultierend hohen LD<sub>50</sub>-Werten zu verzeichnen (s. Tabelle 8). Somit wurde bei allen Zelllinien eine intrinsische Strahlenresistenz nachgewiesen.



**Abbildung 9: Einfluss von  $\gamma$ -Strahlung auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Bestrahlung wurde mit  $\gamma$ -Strahlung in sieben Dosen durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 4 unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbestrahlte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch p ≤ 0,05 = \* und p ≤ 0,001 = \*\*\* gekennzeichnet.

**Tabelle 8: LD<sub>50</sub>-Werte der Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlung.**

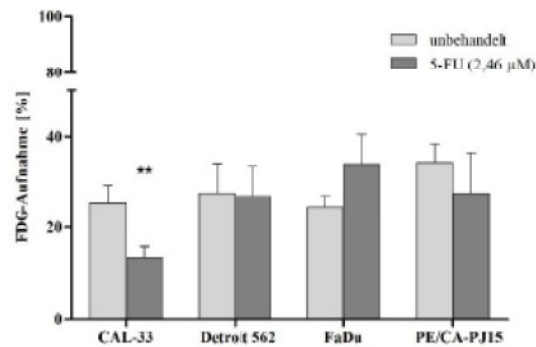
| Zelllinie   | LD <sub>50</sub> [Gy] |
|-------------|-----------------------|
| CAL-33      | 23,7                  |
| Detroit 562 | 34,0                  |
| FaDu        | 18,2                  |
| PE/CA-PJ15  | 21,1                  |

Dargestellt sind die LD<sub>50</sub>-Werte für die Behandlung der vier HNSCC-Zelllinien mit  $\gamma$ -Strahlung. Die LD<sub>50</sub>-Werte wurden aus n = 4 unabhängigen Versuchen ermittelt.

#### 4.1.3 <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme behandelter HNSCC-Zellen

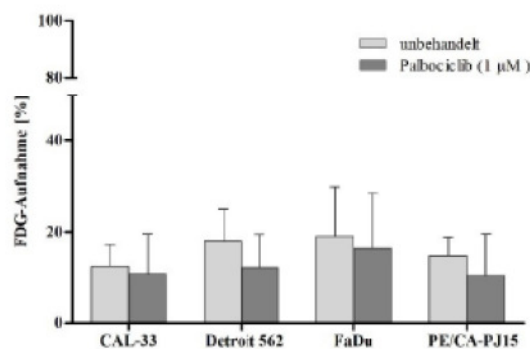
Untersucht wurde die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme in die HNSCC-Zellen nach Behandlung mit 5-FU bzw. Palbociclib als Vorbereitung auf zukünftige *in vivo*-Untersuchungen. Die Ergebnisse sind dargestellt als <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme in Prozent, genormt auf die gemessene Standardprobe. Verglichen wurden unbehandelte Zellen mit Zellen, die mit 5-FU behandelt wurden (Abb. 10). Bei den Detroit 562-Zellen hatte die Behandlung mit 5-FU keine Auswirkung auf die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme. Bei den PE/CA-PJ15- und CAL-33-Zellen war eine Abnahme zu beobachten, welche bei den CAL-33-Zellen am stärksten ausgeprägt und signifikant war. Im Gegensatz zu den anderen HNSCC-Zelllinien wurde bei den FaDu-Zellen nach Behandlung mit 5-FU eine Zunahme der <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme um 9 % detektiert. Die Behandlung mit Palbociclib führte bei allen vier Zelllinien zu einer nicht signifikanten Abnahme der <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme (Abb. 11).





**Abbildung 10: Einfluss von 5-FU auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme von HNSCC-Zellen.**

Die Zellen wurden einmalig für 72 h mit 5-FU (Konzentration: 2,46 µM) behandelt. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme ist bezogen auf die Standardmessungen nach Abzug der Leerwerte. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber den unbehandelten Zellen sind durch  $p \leq 0,01 = **$  gekennzeichnet.

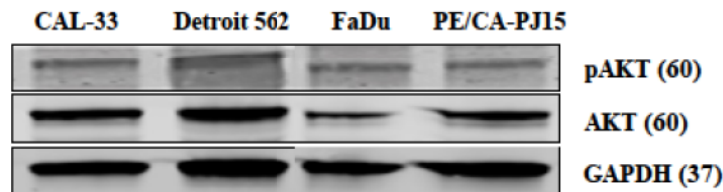


**Abbildung 11: Einfluss von Palbociclib auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme von HNSCC-Zellen.**

Die Behandlung mit Palbociclib (Konzentration: 1 µM) erfolgte einmalig für 72 h. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme ist bezogen auf die Standardmessungen nach Abzug der Leerwerte. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen).

#### 4.1.4 Basales Expressionslevel von pAKT und AKT

In Abbildung 12 ist das Ergebnis der Western Blot-Analyse der Proteine pAKT und AKT dargestellt. Bei allen vier Zelllinien konnte die basale Expression von pAKT und AKT nachgewiesen werden. AKT wurde von allen Zelllinien in hohem Maße exprimiert, deren phosphorylierte Form hingegen weniger stark. Zwischen den Zelllinien wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Abundanz der beiden Proteine nachgewiesen.

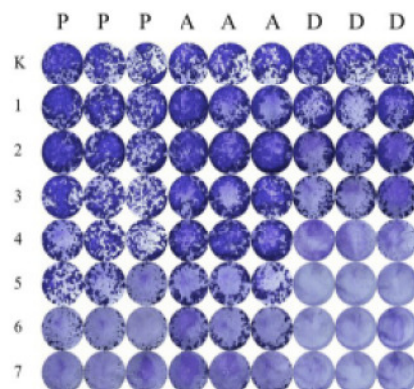


**Abbildung 12: Western Blot-Analyse der Proteinexpression von pAKT und AKT.**

Der Nachweis der Proteinexpression von pAKT und AKT erfolgte an unbehandelten Zellen. Die Proteingrößen in kDa sind in Klammern hinter der Proteinbezeichnung angegeben. Als interne Ladekontrolle diente GAPDH.

## 4.2 Zielgerichtete Therapie mit CDKI

In Analogie zur Chemosensitivität wurde die Wirksamkeit der zielgerichteten CDKI *in vitro* getestet. Die hochselektiven CDK4/6-Inhibitoren Abemaciclib und Palbociclib sowie der CDK1/2/5/9-Inhibitor Dinaciclib wurden in aufsteigenden Konzentrationen in einfacher (ein Zyklus, 72 h) und zweifacher (zwei Zyklen, 2 x 72 h) Behandlung an den vier HNSCC-Zelllinien getestet. Die Auswertung erfolgte mittels quantitativer Biomassebestimmung nach Kristallviolett-färbung. Abbildung 13 zeigt exemplarisch die konzentrationsabhängige Reduktion der Biomasse durch Behandlung mit den CDKI nach zwei Behandlungszyklen am Beispiel der Detroit 562-Zellen. Die selektiven CDKI Palbociclib und Abemaciclib wurden im Bereich von 16,0 nM bis 1000,0 nM eingesetzt. Die einzelnen Konzentrationen können Tabelle 2 (Punkt 3.4) entnommen werden. Für Palbociclib und Abemaciclib zeigte sich erst bei den hohen Konzentrationen ein deutlicher Effekt (Konzentrationsstufe 6: 500,0 nM). Bei Dinaciclib, getestet im Bereich von 1,5 nM bis 100,0 nM, war hingegen bereits ab 12,5 nM (Konzentrationsstufe 4) eine deutliche Verminderung der Biomasse nachweisbar.



**Abbildung 13: Mikroskopische Darstellung von Detroit 562-Zellen nach Behandlung mit CDKI und Kristallviolett-färbung.**

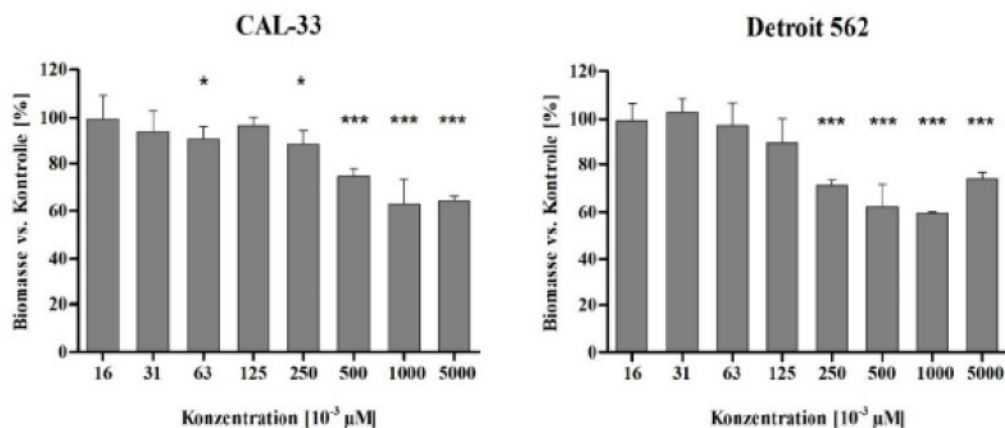


Die Behandlung der Zellen mit den CDKI erfolgte mit aufsteigenden Konzentrationen (1-7) in zwei Zyklen (2 x 72 h). Palbociclib und Abemaciclib wurden im Konzentrationsbereich von 16,0 nM-1000,0 nM, Dinaciclib von 1,5 nM-100,0 nM getestet. Die fotografische Dokumentation der 96-Well-Platte wurde nach Anfärben mit Kristallviolett durchgeführt. Die Zellen in der Kontrollgruppe wurden nicht behandelt. K – Kontrolle, P – Palbociclib, A – Abemaciclib, D – Dinaciclib.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Biomasse der Zellen sind normalisiert zur Kontrollgruppe bestehend aus unbehandelten Zellen als Konzentrations-Wirkungs-Kurve dargestellt (Abb. 14-16 bzw. Anhang Abb. 31-33). Die resultierenden IC<sub>50</sub>-Werte für die einzelnen Substanzen und Zelllinien sind in Tabelle 9 (s. Seite 49) zusammengefasst.

#### Behandlung mit Palbociclib

Die einmalige Gabe von Palbociclib hatte in dem getesteten Konzentrationsbereich von 16,0 nM bis 5000,0 nM keinen Einfluss auf die Biomasse. Folglich wurde auf die Darstellung der Ergebnisse für einen Behandlungszyklus verzichtet. Signifikante Biomassereduktionen nach zwei Behandlungszyklen wurden bei den Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 ab Konzentrationen von ca. 250,0 nM erfasst (Abb. 14). Mit den getesteten Konzentrationen bis 5 µM konnte keine Reduktion der Biomasse auf 50 % erreicht werden. Die anderen beiden Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 zeigten eine intrinsische Resistenz gegenüber Palbociclib (s. Anhang Abb. 31).



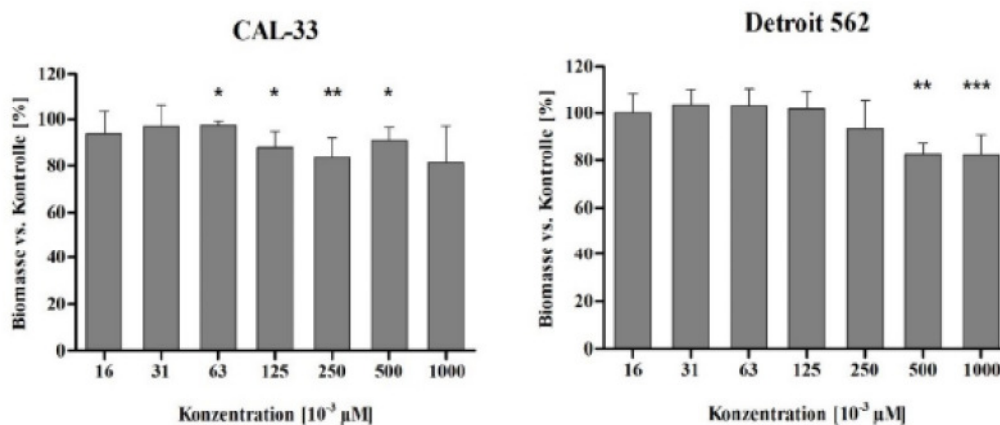
**Abbildung 14: Einfluss von Palbociclib auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Behandlung mit Palbociclib erfolgte in zwei Zyklen (2 x 72 h). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,05 = *$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.



### Behandlung mit Abemaciclib

Der zweite CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib zeigte ein ähnliches Wirkverhalten wie Palbociclib. Nach einem Behandlungszyklus konnte keine Biomassereduktion nachgewiesen werden, sodass nur die Ergebnisse für die zweifache Behandlung dargestellt sind. Nach zwei Behandlungszyklen war bei allen vier Zelllinien eine moderate Biomassereduktion zu verzeichnen. Bei den CAL-33- und Detroit 562-Zellen war die Hemmung im höheren Konzentrationsbereich signifikant (Abb. 15). Die FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen zeigten hingegen auch bei der höchsten getesteten Konzentration keine signifikante Biomassereduktion nach der Behandlung mit Abemaciclib (s. Anhang Abb. 32). Bei keiner der Zelllinien wurde eine Biomassereduktion auf 50 % erreicht.

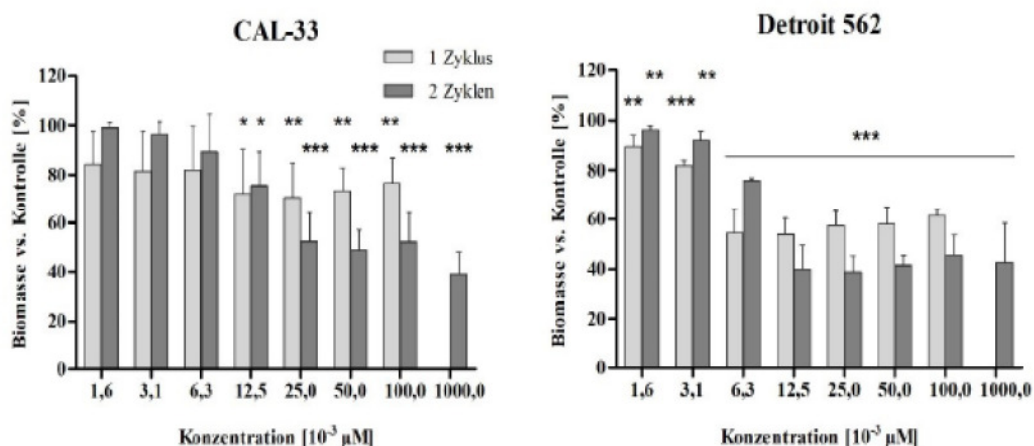


**Abbildung 15: Einfluss von Abemaciclib auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Behandlung mit Abemaciclib erfolgte in zwei Zyklen (2 x 72 h). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

### Behandlung mit Dinaciclib

Der CDK1/2/5/9-Inhibitor Dinaciclib beeinflusste dosisabhängig das Wachstum aller Zelllinien (Abb. 16 bzw. Anhang Abb. 33). Die CAL-33-Zellen zeigte insgesamt die geringste Sensitivität gegenüber Dinaciclib. Bei den Detroit 562-Zellen war bereits ab der niedrigsten Konzentration ein stärkeres Ansprechen auf die Behandlung mit Dinaciclib ( $IC_{50} = 7,7 \text{ nM}$ ) mit einer signifikanten Reduktion der Biomasse zu beobachten. Für die Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 wurden ähnliche Ergebnisse erhoben (s. Anhang Abb. 33). Die stärkere Biomassereduktion nach zweifacher Behandlung im Vergleich zur einfachen war bei allen vier Zelllinien erst ab Konzentrationen  $\geq 12,5 \text{ nM}$  zu verzeichnen.



**Abbildung 16: Einfluss von Dinaciclib auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Behandlung mit Dinaciclib erfolgte sowohl in einem Zyklus (72 h, hellgrau) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h, dunkelgrau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle wurden durch  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

Insgesamt zeigte Dinaciclib im Vergleich zu den beiden selektiven CDKI Palbociclib und Abemaciclib insbesondere nach wiederholter Substanzgabe eine deutlich stärkere antitumorale Wirkung. Darüber hinaus zeigten sich zelllinienspezifische Unterschiede mit höherer Sensitivität gegenüber den CDKI bei den CAL-33- und Detroit 562-Zellen. In Tabelle 9 sind die  $IC_{50}$ -Werte der HNSCC-Zellen nach Behandlung mit Palbociclib, Abemaciclib und Dinaciclib zusammengefasst dargestellt. Die  $IC_{50}$  für Abemaciclib und Palbociclib lagen bei allen Zellen überhalb des getesteten Konzentrationsbereiches. Demgegenüber waren alle Zelllinien sensitiv gegenüber Dinaciclib mit unterschiedlichen



IC<sub>50</sub>-Werten, die nach jeweils doppelter Substanzgabe deutlich geringer waren als bei einmaliger Applikation. Während die anderen drei Zelllinien kleine IC<sub>50</sub>-Werte von 7,7 nM bis 14,5 nM vorwiesen, zeigte sich bei den CAL-33-Zellen mit IC<sub>50</sub> = 310,0 nM ein etwas schwächerer Effekt der Behandlung.

**Tabelle 9: IC<sub>50</sub>-Werte der Behandlung mit CDKI.**

| IC <sub>50</sub> [nM] | Palbociclib | Abemaciclib | Dinaciclib |          |
|-----------------------|-------------|-------------|------------|----------|
|                       | 2 Zyklen    | 2 Zyklen    | 1 Zyklus   | 2 Zyklen |
| CAL-33                | > 5000,0    | > 1000,0    | > 100,0    | 310,0    |
| Detroit 562           | > 5000,0    | > 1000,0    | > 100,0    | 7,7      |
| FaDu                  | > 5000,0    | > 1000,0    | > 100,0    | 13,6     |
| PE/CA-PJ15            | > 5000,0    | > 1000,0    | > 100,0    | 14,5     |

Dargestellt sind die IC<sub>50</sub>-Werte der Behandlung der vier HNSCC-Zelllinien mit den CDKI Palbociclib, Abemaciclib und Dinaciclib. Die Werte wurden für die Behandlung in zwei Zyklen (2 x 72 h) und für Dinaciclib zusätzlich in einem Zyklus (72 h) ermittelt. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus n ≥ 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

### 4.3 Kombinationstherapie mit Zytostatika und CDKI – simultan vs. metronomisch

Im Anschluss an die Untersuchungen der Monotherapien wurden verschiedenen Kombinationstherapien getestet. Dazu wurden die Zytostatika 5-FU, Cisplatin bzw. Gemcitabin und die CDKI Palbociclib bzw. Dinaciclib im simultanen sowie metronomischen Behandlungsansatz zu den HNSCC-Zellen gegeben. Es erfolgte die Auswertung hinsichtlich möglicher additiver bzw. synergistischer Effekte dieser kombinierten Substanzgabe. Die Konzentrationen für die Kombinationsbehandlung wurden anhand der Ergebnisse der Einzelsubstanzbehandlung festgelegt. Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die der IC<sub>50</sub> bzw. IC<sub>30</sub> entsprachen. Diese können der Tabelle 3 entnommen werden (Punkt 3.5). In Tabelle 10 sind die Kombinationsindizes (CI) für die vier Zelllinien und die einzelnen Kombinationen der Substanzen bei simultaner Gabe dargestellt. Die CI der Kombinationen mit synergistischer Wirkung sind grün hinterlegt. Die Abbildungen 34-41 im Anhang zeigen für die verschiedenen Kombinationen die Reduktion der Biomasse in Abhängigkeit von der simultanen und metronomischen Gabe der Substanzen. Mit der Berechnung des Kombinationsindex CI (Punkt 3.5; Formel 2) für die einzelnen Kombinationen wurde die Wirkung der Kombinationstherapie quantitativ erfasst.



Die simultane Kombination von 5-FU bzw. Cisplatin mit Palbociclib wirkte bei den Detroit 562- und FaDu-Zellen synergistisch ( $CI < 1$ ). Hervorzuheben sind dabei die besonders kleinen CI für die Kombination von 5-FU mit Palbociclib (Detroit 562: 0,57; FaDu: 0,62), welche auf einen starken synergistischen Effekt hindeuten. Ebenso wurden bei jeweils einer Zelllinie synergistische Effekte durch die Kombination von 5-FU (bei Detroit 562) bzw. Cisplatin (bei FaDu) mit Dinaciclib erzielt. Die kombinierte Gabe von Palbociclib und Dinaciclib wirkte bei der Zelllinie Detroit 562 synergistisch.

Bei den CAL-33- und PE/CA-PJ15-Zellen wurden bei keiner der getesteten Kombinationsansätze synergistische Effekte beobachtet. Dies gilt in vergleichbarer Weise für Gemcitabin. Die Kombinationen mit diesem Zytostatikum zeigten bei allen Zelllinien antagonistische Wirkungen mit einem  $CI > 1$ .

**Tabelle 10: CI der Kombinationsbehandlungen mit Zytostatika und CDKI.**

|             | CI | F    | C    | G    | D    |
|-------------|----|------|------|------|------|
| CAL-33      | P  | 1,01 | 1,09 | 1,22 | 1,28 |
|             | D  | 1,29 | 1,20 | 1,26 | x    |
| Detroit 562 | P  | 0,57 | 0,97 | 1,03 | 0,95 |
|             | D  | 0,95 | 1,18 | 1,26 | x    |
| FaDu        | P  | 0,62 | 0,81 | 1,08 | 1,07 |
|             | D  | 1,05 | 0,90 | 1,17 | x    |
| PE/CA-PJ15  | P  | 1,28 | 1,32 | 1,18 | 1,09 |
|             | D  | 1,04 | 1,03 | 1,20 | x    |

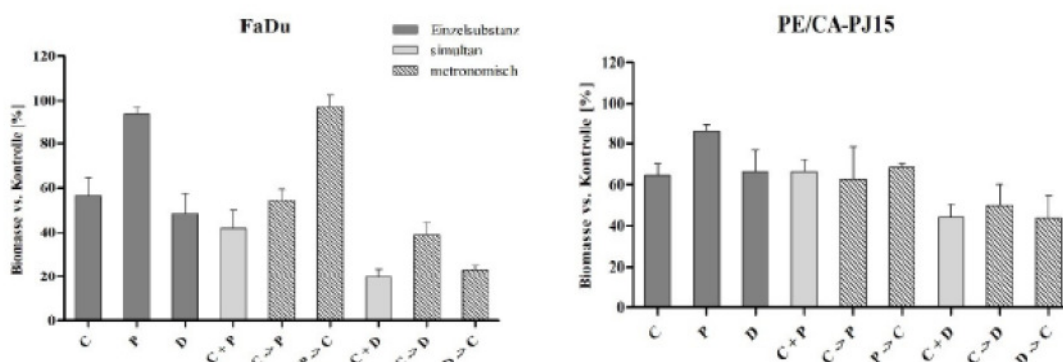
Die CI der Kombinationstherapien wurden mit dem *Bliss Independence*-Modell ermittelt. Die grüne Hinterlegung zeigt Kombinationen zweier Substanzen mit synergistischer Wirkung bei simultaner Gabe. F – 5-FU, C – Cisplatin, G – Gemcitabin, P – Palbociclib, D – Dinaciclib;  $CI < 1$  = synergistische Wirkung,  $CI = 1$  = additive Wirkung,  $CI > 1$  = antagonistische Wirkung.

Die in den Abbildungen 34-41 (s. Anhang) dargestellten Ergebnisse zeigen bei der Kombinationstherapie einen stärkeren Effekt bei der simultanen Substanzgabe, als bei der metronomischen. Besonders bei den Kombinationen der Zytostatika mit Palbociclib ergaben sich bessere Wirksamkeiten, wenn die beiden Substanzen simultan zu den Zellen gegeben wurden im Vergleich zum metronomischen Behandlungsansatz. Hervorzuheben sind dabei die Ergebnisse für die FaDu-Zelllinie nach der Kombinationstherapie mit Palbociclib und Cisplatin (Abb. 17) bzw. Palbociclib und Gemcitabin (s. Anhang Abb. 39). Exemplarisch

dafür sind in Abbildung 17 die Ergebnisse der Biomassebestimmung nach Behandlung mit dem CDKI Palbociclib kombiniert mit Cisplatin für die FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen dargestellt. Die Ergebnisse für die Kombination mit Gemcitabin bei den FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen können Abbildung 39 im Anhang entnommen werden.

Die Abbildungen 17 und 39 zeigen exemplarisch, dass der simultane Behandlungsansatz (Palbociclib + Cisplatin bzw. Palbociclib + Gemcitabin) im Vergleich zum metronomischen (Palbociclib → Cisplatin bzw. Palbociclib → Gemcitabin) etwa die Hälfte bzw. ein Drittel der Biomasse ergab. Bei den Kombinationen mit Dinaciclib fiel der Unterschied zwischen simultaner und metronomischer Substanzgabe insgesamt geringer aus als bei den Kombinationen mit Palbociclib (Abb. 17 und Anhang Abb. 34-41).

Bei der Kombination von Palbociclib mit 5-FU (s. Anhang Abb. 35) wurde hingegen ein deutlich geringerer Unterschied zwischen der simultanen und metronomischen Behandlung festgestellt.



**Abbildung 17: Einfluss der Kombinationstherapie mit Cisplatin und CDKI auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen Cisplatin, Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung bei simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

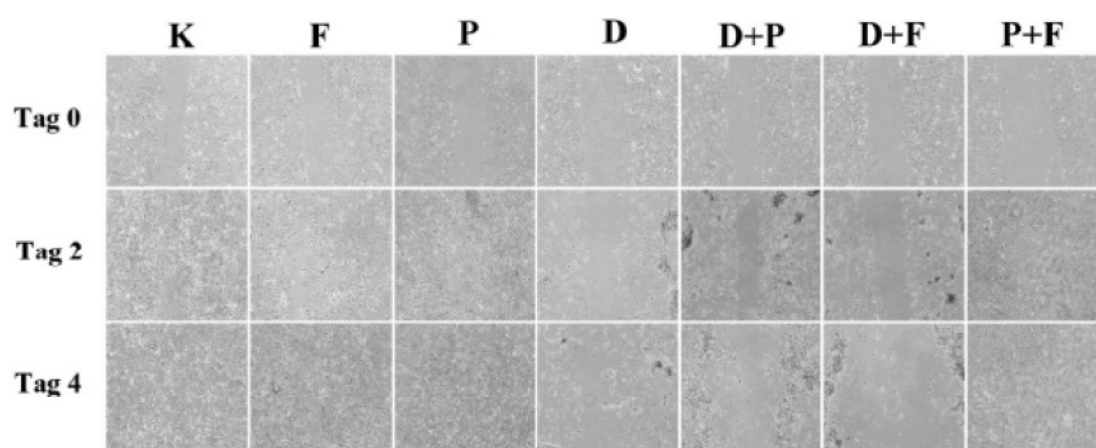
Weiterhin zeigte sich bei den Kombinationen mit Palbociclib die Tendenz, dass es beim metronomischen Behandlungsansatz zu einer stärkeren Biomassereduktion kam, wenn das Zytostatikum vor dem CDKI gegeben wurde als andersherum. Diese Tendenz trat bei den Kombinationen mit Dinaciclib nicht auf. Insgesamt ist die Überlegenheit der simultanen Substanzgabe im Vergleich zur metronomischen hervorzuheben.



#### 4.4 Scratch Assay

Bei dem *Scratch Assay* wurde in die Monolayerschicht der HNSCC-Zellen eine Wunde gesetzt und dessen Verschluss nach Behandlung mit 5-FU, Palbociclib und Dinaciclib einzeln sowie in simultaner Kombination dokumentiert. Die Auswertung erfolgte an Tag 0, 2 und 4. Die Abbildung 18 zeigt repräsentative Aufnahmen der CAL-33 Zellen. Am zweiten Tag war bei den unbehandelten Kontrollzellen keine glatte Begrenzung der Wunde mehr nachweisbar und es zeigte sich bereits ein teilweiser Verschluss der Wunde. Ähnliche Effekte wurden nach der Behandlung mit 5-FU, Palbociclib und deren Kombination beobachtet. Am Tag 4 war sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit 5-FU, Palbociclib und deren Kombination behandelten Zellen eine konfluierende Zellschicht zu sehen. Im direkten Vergleich der beiden Substanzen zeigte 5-FU eine geringfügig stärkere wachstumshemmende Wirkung. Bei der Behandlung mit Dinaciclib war am 4. Tag die Wunde weitestgehend erhalten bzw. wurde hauptsächlich Zelldebris detektiert, was in Analogie zu den Vorbefunden einen starken zytotoxischen Effekt aufgezeigt. Dies gilt in identischer Weise für die Kombinationsbehandlungen mit Dinaciclib, bei denen ebenfalls nahezu kein Verschluss der Wunde detektierbar war. Dies war unabhängig von der verwendeten Kombination (d.h. mit Palbociclib oder 5-FU).

Abbildung 18: *Scratch Assay* von CAL-33-Zellen bei Mono- bzw. simultaner Kombinationstherapie mit Zytostatika und CDKI.

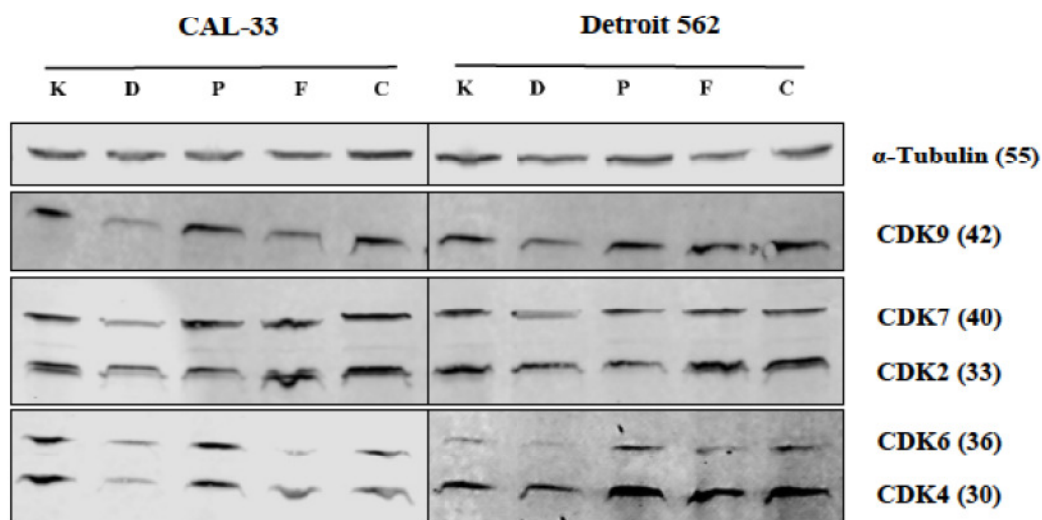


Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Wunde an Tag 0, 2 und 4 nach Monotherapie bzw. simultaner Kombinationstherapie der Zellen mit Zytostatika und CDKI. Die Zellen in der Kontrollgruppe wurden nicht behandelt. Originalvergrößerung 10-fach. K – Kontrolle, F – 5-FU: 2460 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.



#### 4.5 Proteinexpression

Es wurde der Einfluss der Zytostatika bzw. CDKI auf die Expression der Proteine CDK2/4/6/7/9 mittels Western Blot untersucht. Als Kontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin. Die Zellen wurden für 24 h mit 5-FU, Cisplatin, Palbociclib bzw. Dinaciclib behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelten Zellen mitgeführt. Die Abbildung 19 zeigt die Proteinbanden für die Zelllinien CAL-33 und Detroit 562. Bei beiden Zelllinien zeigte sich ein deutlicher Effekt nach Behandlung mit Dinaciclib. Durch diesen global wirkenden CDKI wurde die Expression der untersuchten CDK deutlich reduziert. Palbociclib bewirkte lediglich eine marginale Veränderung in der Proteinexpression von CDK2. Interessanterweise erzielte auch die Behandlung mit den beiden Zytostatika bei den CAL-33-Zellen Veränderungen in der Abundanz der untersuchten CDK. 5-FU reduzierte CDK4/6/9. Cisplatin hemmte CDK4 und CDK6.

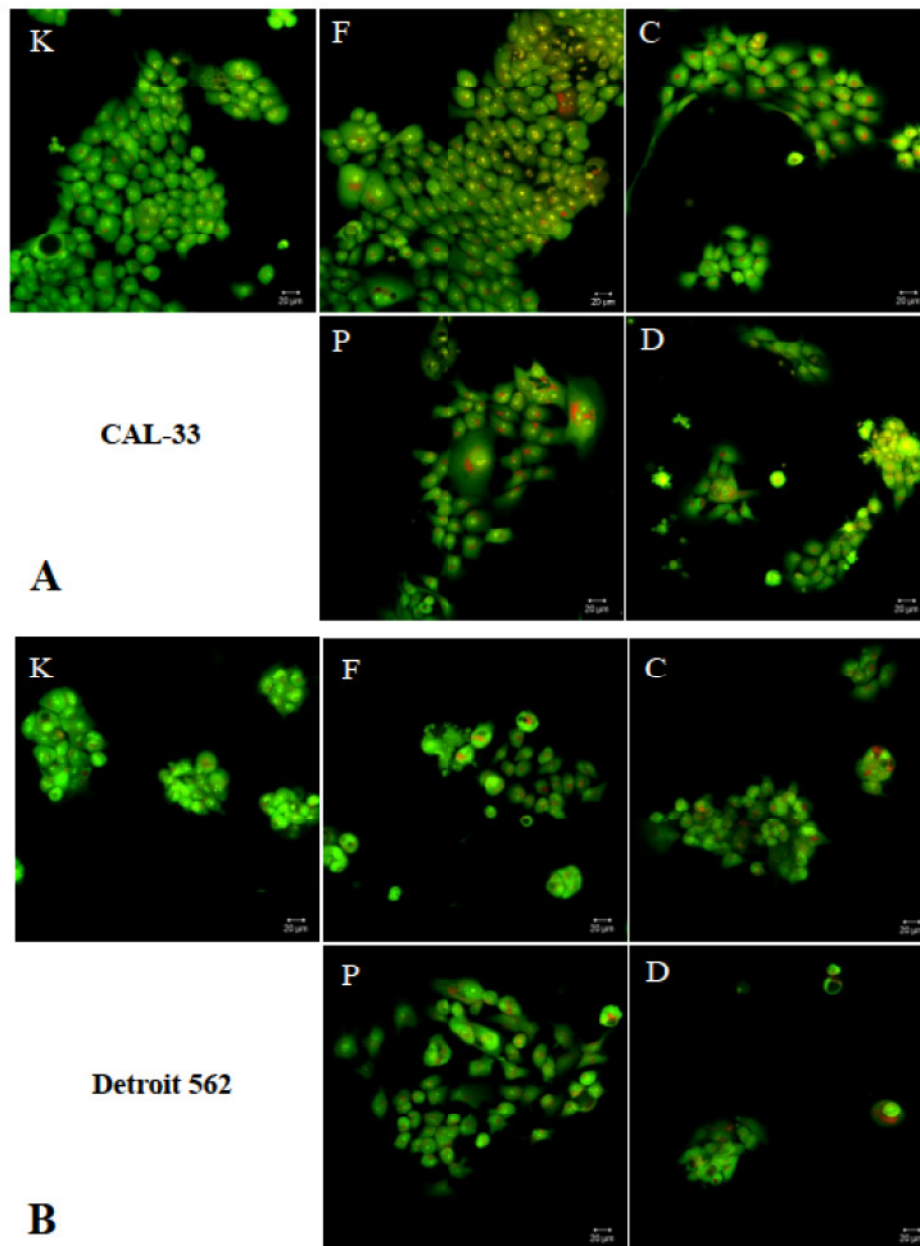


**Abbildung 19: Western Blot-Analyse der Proteinexpression von CDK2/4/6/7/9 an CAL-33- und Detroit 562-Zellen nach der Behandlung mit Zytostatika bzw. CDKI.**

Der Nachweis der Proteinexpression von CDK2/4/6/7/9 erfolgte nach Behandlung der Zellen mit Zytostatika bzw. mit CDKI in einem Zyklus (24 h). Die Zellen der Kontrollgruppe wurden nicht behandelt. Als Kontrolle diente der Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin. Die Proteingrößen in kDa sind in Klammern hinter der Proteinbezeichnung angegeben. K – Kontrolle, D – Dinaciclib: 25 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, F – 5-FU: 2460 nM, C – Cisplatin: 156 nM.

#### 4.6 Nachweis von Autophagie

In weiterführenden Untersuchungen wurde der Einfluss der Behandlung mit Zytostatika bzw. CDKI auf die Induktion von Autophagie erfasst. Die Zellen wurden dazu mit Acridinorange und Calcein AM angefärbt. Das in sauren Vesikeln akkumulierte Acridinorange luminesziert rot und zeigt autophagozytotische Aktivität an (84). Das durch intrazelluläre Esterasen umgewandelte Calcein ist grün fluoreszierend und zeigt bei Detektion vitale Zellen an (85). Da es Die Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 wurden für 24 h mit den Zytostatika 5-FU bzw. Cisplatin oder den CDKI Palbociclib bzw. Dinaciclib behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit einem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht und fotografisch dokumentiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Behandlung führte zelllinienspezifisch zu einem Anstieg rot-orange angefarbter Zellkompartimente. Insgesamt konnte durch alle vier Substanzen eine Zunahme der autophagozytotischen Aktivität festgestellt werden. Bei den CAL-33-Zellen (Abb. 20A) induzierten besonders 5-FU, Cisplatin und Palbociclib Autophagie. Bei den Detroit 562-Zellen (Abb. 20B) waren die Unterschiede zu den Zellen aus der Kontrolle weniger stark ausgeprägt. Des Weiteren wurden nach der Behandlung morphologische Veränderungen nachgewiesen. In Übereinstimmung mit den Vorbefunden führte Dinaciclib zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl. Residuale Zellen zeigten vermehrt eine Zytoplasmaschwellung, Vakuolen und veränderte Zellkerne. Teilweise waren die Zellen unregelmäßig begrenzt und bereits lysiert.



**Abbildung 20: Acridinorangefärbung zum Nachweis von Autophagie nach Monotherapie mit Zytostatika bzw. CDKI**

Laser-Scanning-Mikroskop-Aufnahmen der Zelllinien A) CAL-33 und B) Detroit 562. Die Behandlung der Zellen erfolgte in einem Zyklus (24 h) mit Zytostatika bzw. CDKI. Die Zellen wurden mit Acridinorange (orange-rot) und Calcein (grün) gefärbt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Skala: 20 µm; K – Kontrolle, F – 5-FU: 2460 nM, C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.



## 4.7 Durchflusszytometrie

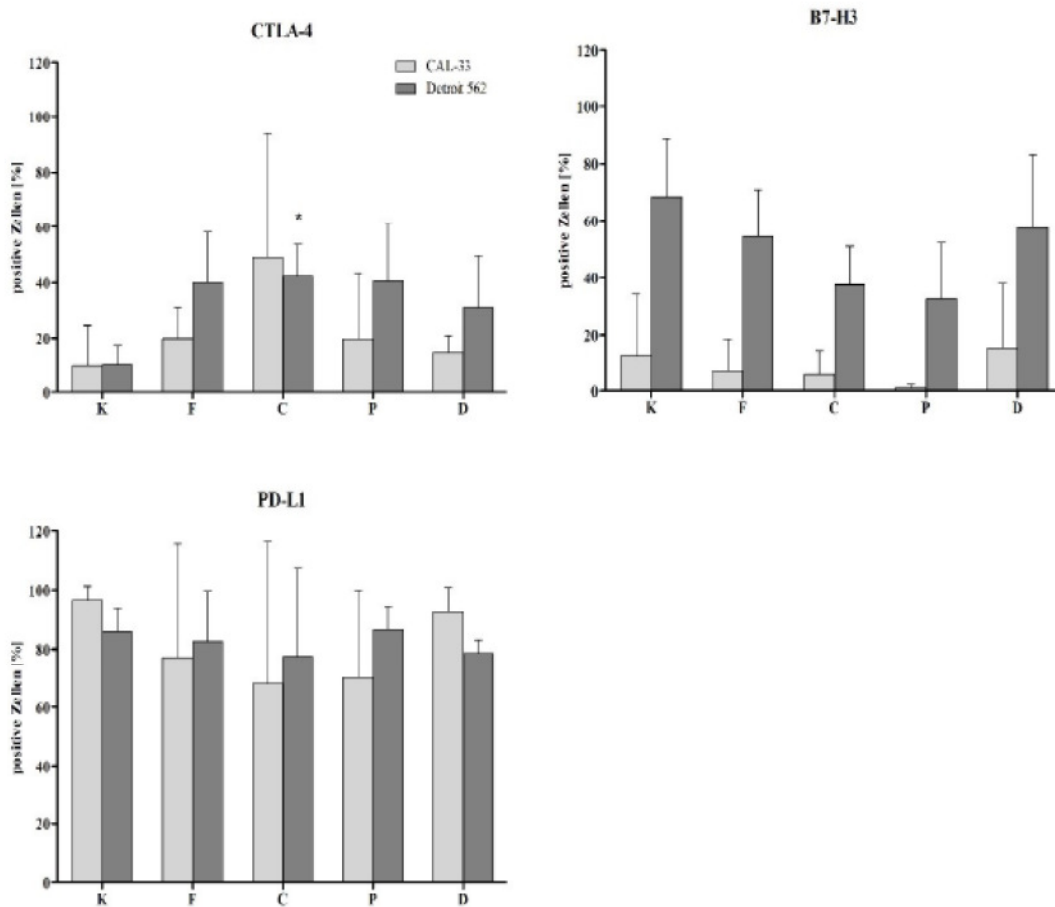
### 4.7.1 Phänotyp

Es wurde die Veränderung des Phänotyps von CAL-33- und Detroit 562-Zellen nach Behandlung mit Zytostatika bzw. CDKI untersucht. Dafür erfolgte die Bestimmung der Abundanz der Oberflächenproteine CTLA-4, B7-H3 und PD-L1 mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden die Zellen für 24 h mit 5-FU, Cisplatin, Palbociclib bzw. Dinaciclib behandelt. In Abbildung 21 ist die quantitative Auswertung dargestellt.

Die basale Expression von CTLA-4 ist mit 10 % bei beiden Zelllinien niedrig. Nach Behandlung mit Cisplatin wurde dieses Immuncheckpoint-Molekül auf den CAL-33-Zellen vermehrt nachgewiesen (49,9 %). Die anderen Substanzen bewirkten nur einen leichten Anstieg auf 19,9 % (5-FU und Palbociclib) und 14,9 % (Dinaciclib). Bei den Detroit 562-Zellen zeigte sich durch alle Substanzen eine ca. 4-fach höhere Abundanz von CTLA-4.

Das anti-inflammatorische Immuncheckpoint-Molekül B7-H3 wurde von den Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert und hatte eine höhere basale Abundanz auf den Detroit 562-Zellen (68,5 % vs. 12,8 % CAL-33). Die Behandlung mit Palbociclib und Dinaciclib hatten bei beiden Zelllinien keinen signifikanten Einfluss auf die Abundanz von B7-H3. Dies galt in ähnlicher Weise für die beiden Zytostatika, welche nur eine geringe Reduktion von B7-H3 bewirkten (Abb. 21).

PD-L1, welches ein Zielmolekül für AK-basierte Immuntherapien darstellt, wurde auf beiden Zelllinien in hoher Abundanz detektiert (CAL-33: 96,63 %, Detroit 562: 85,90 %). Die Substanzbehandlungen veränderten das Expressionsprofil nur marginal, ohne Vorteil der CDKI gegenüber den Zytostatika.



**Abbildung 21: Einfluss von Zytostatika und CDKI auf den Phänotyp von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Quantitative Darstellung der Abundanz von CTLA-4, B7-H3 und PD-L1 nach Behandlung von CAL-33-Zellen (hellgrau) und Detroit 562-Zellen (dunkelgrau). Die Behandlung mit den Zytostatika und CDKI erfolgte in einem Zyklus (24 h). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,05 = *$  gekennzeichnet. K – Kontrolle, F – 5-FU: 2460 nM, C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

Bei den Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 (s. Anhang Abb. 42) zeigte sich folgendes Bild: Das CTLA-4-Level wurde durch die Behandlung mit Zytostatika und CDKI erhöht. Beide Zelllinien zeigten wie Detroit 562 eine hohe basale Abundanz von B7-H3. Die beiden CDKI Dinaciclib und Palbociclib führten zu einer Herunterregulation bei den FaDu-Zellen. Die Zytostatika hingegen hatten kaum Einfluss auf die B7-H3-Expression. Bei den PE/CA-PJ15-Zellen wurden insbesondere nach den Zytostatikabehandlungen verringerte B7-H3-Expressionslevel detektiert (s. Anhang Abb. 42). PD-L1 wurde ebenfalls auf beiden Zelllinien in hohem Maß nachgewiesen und durch die eingesetzten Substanzen nur wenig beeinflusst.

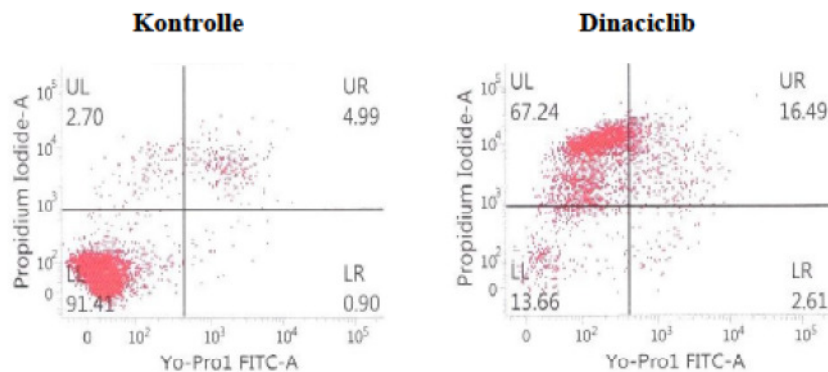
Veränderungen der PD-L1-Expression wurden primär bei den PE/CA-PJ15-Zellen beobachtet. Alle Testsubstanzen bewirkten dort eine moderate Abnahme des Anteils PD-L1-positiver Zellen (s. Anhang Abb. 42).

Zusammenfassend wurde bei allen vier HNSCC-Zelllinien eine hohe Abundanz von PD-L1 und ein individuelles Profil von B7-H3 identifiziert, welches durch Zytostatika und CDKI unterschiedlich moduliert wurde.

#### **4.7.2 Apoptose- / Nekrosebestimmung**

Im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen wurden die zytotoxischen Effekte der Zytostatika und der CDKI näher charakterisiert. Die Apoptose- / Nekrosebestimmung erfolgte exemplarisch an den Zelllinien CAL-33 und Detroit 562. Es wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie unter Verwendung der fluoreszierenden Farbstoffe Yo-Pro 1 und Propidiumjodid (PI) eingesetzt, um apoptotische von nekrotischen Zellen zu diskriminieren. Durch Auswertung der Fluoreszenzsignale konnten folgende Zellpopulationen unterschieden werden: vitale (Yo-Pro 1/PI: -/-), früh-apoptotische (Yo-Pro 1/PI: +/-), spät-apoptotische (Yo-Pro 1/PI: +/+) und nekrotische (Yo-Pro 1/PI: -/+) Zellen. Die Behandlung erfolgte einmalig für 24 h bzw. 72 h mit 5-FU, Cisplatin, Palbociclib bzw. Dinaciclib. Die Konzentrationen wurden auf Grundlage der IC<sub>30</sub>-Werte aus den vorangegangenen Versuchen gewählt und können der Tabelle 5 (Punkt 3.7.3) entnommen werden. In Abbildung 22 ist stellvertretend das Ergebnis der Durchflusszytometrie der Zelllinie Detroit 562 nach Behandlung mit Dinaciclib dargestellt. Bei der unbehandelten Kontrolle waren erwartungsgemäß > 90 % der Zellen vital (linker unterer Quadrant, LL). Ca. 5 % der Zellen waren spät-apoptotisch und rund 3 % nekrotisch (beide oberen Quadranten, UR und UL). Es wurden < 1 % früh-apoptotische Zellen (LR) detektiert. Durch die Behandlung mit Dinaciclib reduzierte sich der Anteil vitaler Zellen auf 13,7 % (LL). Rund zwei Drittel (67,2 %) der Zellen waren nekrotisch und 16,5 % apoptotisch. Früh-apoptotische Zellen wurden nur in geringem Anteil von 2,6 % detektiert.





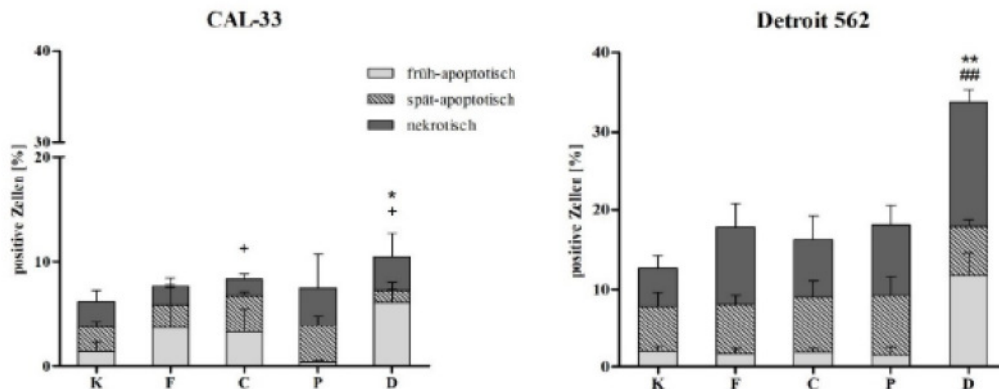
**Abbildung 22: Repräsentative DotPlots der durchflusszytometrischen Apoptose- / Nekrosebestimmung von Detroit 562-Zellen nach Behandlung mit Dinaciclib.**

Dargestellt ist der Einfluss von Dinaciclib auf den Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen bei Detroit 562-Zellen. Die Behandlung mit Dinaciclib (25 nM) erfolgte für 72 h. Die Zellen in der Kontrollgruppe wurden nicht behandelt. Es sind die Fluoreszenzsignale von Yo-Pro 1 und Propidiumjodid (PI) dargestellt. Die vier Quadranten zeigen die Population an vitalen (Yo-Pro 1/PI: -/-; LL), früh-apoptotischen (Yo-Pro 1/PI: +/-; LR), spät-apoptotischen (Yo-Pro 1/PI: +/+; UR) und nekrotischen (Yo-Pro 1/PI: -/+; UL) Zellen.

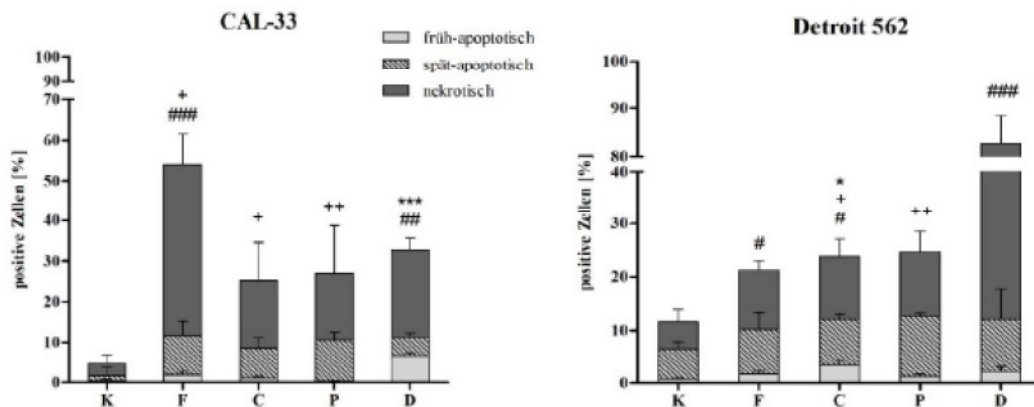
In der Abbildung 23 ist der prozentuale Anteil früh-apoptotischer, spät-apoptotischer und nekrotischer Zellen für die Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 dargestellt. Nach 24-stündiger Behandlung zeigte sich bei den CAL-33-Zellen insgesamt ein geringer Anstieg avitaler Zellen. Dinaciclib hatte dabei den größten zytotoxischen Effekt mit signifikanter Zunahme der früh-apoptotischen Zellen. Nach 72 h dominierte der nekrotische Zelltod. 5-FU zeigte nach 72 h den stärksten Effekt mit einem Anteil an nekrotischen Zellen von 42,4 % (vs. Kontrolle: 3,1 %). Nach Behandlung mit den Zytostatika bzw. CDKI wurden auch vermehrt spät-apoptotische Zellen erfasst.

Bei den Detroit 562-Zellen führte bereits die 24-stündige Behandlung mit Dinaciclib zu einem deutlichen Anstieg an avitalen Zellen. Hierbei wurden signifikant mehr früh-apoptotische (11,8 % vs. Kontrolle: 2,0 %) und nekrotische Zellen nachgewiesen (15,9 % vs. Kontrolle: 4,9 %). Dieser Effekt war nach 72 h noch deutlicher ausgeprägt und führte zu einer Verschiebung von der Apoptose zur Nekrose. Der Anteil nekrotischer Zellen stieg auf 70,7 % (vs. Kontrolle: 5,2 %). Die anderen drei Substanzen 5-FU, Cisplatin und Palbociclib führten nach 24-stündiger Behandlung zu einem mäßigen Anstieg an nekrotischen Zellen, wohingegen sich der Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle kaum veränderte. Nach 72 h zeigten sich ähnliche Ergebnisse mit moderater Zunahme des Anteils avitaler Zellen.

### Substanzbehandlung 24 h



### Substanzbehandlung 72 h



**Abbildung 23: Quantitative Apoptose- / Nekrosebestimmung von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Behandlung mit Zytostatika und CDKI erfolgte für 24 h bzw. 72 h. Dargestellt ist der prozentuale Anteil früh-apoptotischer (hellgrau, Signifikanzsymbol: \*), spät-apoptotischer (gestreift, Signifikanzsymbol: +) und nekrotischer (dunkelgrau, Signifikanzsymbol: #) Zellen bezogen auf die Gesamtzellpopulation. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). K – Kontrolle, F – 5-FU: 2460 nM, C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

Zusammenfassend wurde zunächst eine Apoptose nachgewiesen, welche bei längerer Behandlungszeit in eine Nekrose überging. In Übereinstimmung mit den zuvor erhobenen Befunden (Vgl. Punkt 4.2.) wirkte Dinaciclib insbesondere gegenüber den Detroit 562-Zellen zytotoxisch, wobei die Dauer der Behandlung mit der Anzahl avitaler Zellen korrelierte. Die CAL-33-Zellen reagierten weniger stark auf die Behandlung und ebenfalls erst nach 72 h, wobei vornehmlich nekrotische Zellen nachweisbar waren.



#### 4.7.3 Zellzyklusanalyse

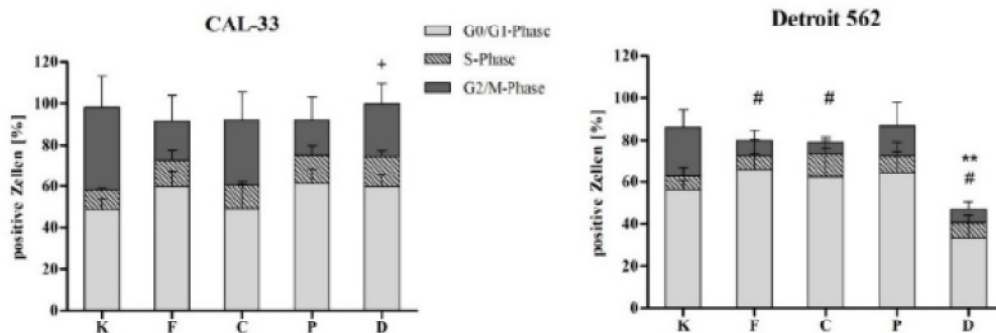
In Ergänzung zur Quantifizierung von Apoptose und Nekrose wurde der Einfluss der Behandlung auf die einzelnen Zellzyklusphasen der Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 untersucht. Die Zellen wurden mit 5-FU, Cisplatin, Palbociclib bzw. Dinaciclib einmalig für 24 h bzw. 72 h behandelt. Die Konzentrationen wurden auf Grundlage der IC<sub>30</sub>-Werte aus den vorangegangenen Versuchen gewählt und können Tabelle 5 (Punkt 3.7.3) entnommen werden. Nach dem Anfärben der DNA mit PI wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. In Abbildung 24 ist der prozentuale Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase (hellgrau; Signifikanzsymbol: \*), S-Phase (gestreift; Signifikanzsymbol: +) und G2/M-Phase (dunkelgrau; Signifikanzsymbol: #) bezogen auf die Gesamtzellpopulation gezeigt. Bei den unbehandelten Kontrollen der CAL-33-Zellen war die Verteilung der Zellzyklusphasen wie folgt: etwa die Hälfte in der G0/G1-Phase, ca. 10 % in der S-Phase und 40 % in der G2/M-Phase. Die 24-stündige Behandlung mit 5-FU, Palbociclib und Dinaciclib führte zur marginalen Verschiebung des Zellzyklus mit höherem Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase und Abnahme der Zellen in der G2/M-Phase (Abb. 24). Nach 72 h Behandlung mit 5-FU und Dinaciclib verstärkte sich dieser Effekt bei den CAL-33-Zellen. Insgesamt wurde im Vergleich zur Kontrolle nur noch ein Drittel an Zellen detektiert. In Analogie zu den Befunden der Apoptose- / Nekrosebestimmung wurden auch hier vermehrt Zellen mit Sub-G1-Peak-DNA-Gehalt erfasst (= avitale Zellen). Residuale Zellen waren primär in der G0/G1-Phase arretiert. Palbociclib hatte eine schwächere Wirkung als 5-FU und Dinaciclib. Cisplatin hatte weder nach 24 h, noch nach 72 h einen Einfluss auf den Zellzyklus.

Bei der Zelllinie Detroit 562 zeigte die 24-stündige Behandlung mit den beiden Zytostatika 5-FU und Cisplatin insgesamt eine geringe Wirkung. Es kam zur geringen Zunahme des Anteils der Zellen in der G0/G1-Phase und Abnahme des Anteils an Zellen in der G2/M-Phase. Nach der Behandlung mit Palbociclib zeigten sich nach 24 h kaum Veränderungen. Bei Dinaciclib hingegen wurde nach der Behandlung starke Effekte beobachtet: Schon bei einer Behandlungszeit von 24 h wurden insgesamt nur rund halb so viele Zellen detektiert (ca. 50 % = im Sub-G1 Peak, avital). 33,5 % der residualen Zellen waren in der G0/G1-Phase (vs. Kontrolle: 56,2 %). Dieser Effekt verstärkte sich nach 72 h. Insgesamt konnten nur noch 21,5 % Zellen für die Zellzyklusanalyse erfasst werden. Von diesen war die Mehrzahl in der G0/G1-Phase. Nach 72 h hatte Palbociclib eine ähnlich starke Wirkung wie Dinaciclib. Insgesamt konnten nur noch 25,5 % Zellen detektiert werden, die zum Hauptteil in der G0/G1-Phase arretiert waren.

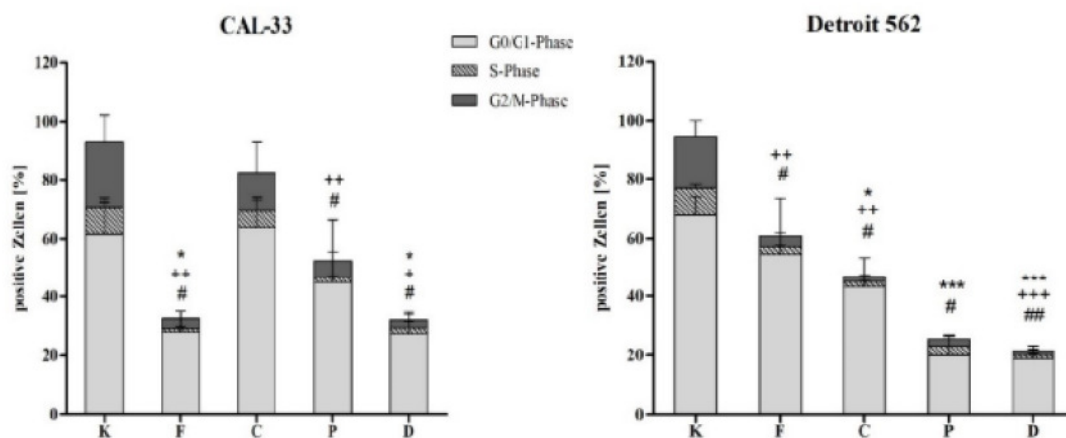


Interessanterweise hatte 5-FU nach 72 h bei den Detroit 562-Zellen im Gegensatz zu den CAL-33-Zellen keinen so starken Einfluss auf den Zellzyklus. Allerdings zeigte das zweite Zytostatikum Cisplatin bei den Detroit 562-Zellen einen signifikanten Effekt, anders als bei den CAL-33-Zellen.

#### Substanzbehandlung 24 h



#### Substanzbehandlung 72 h



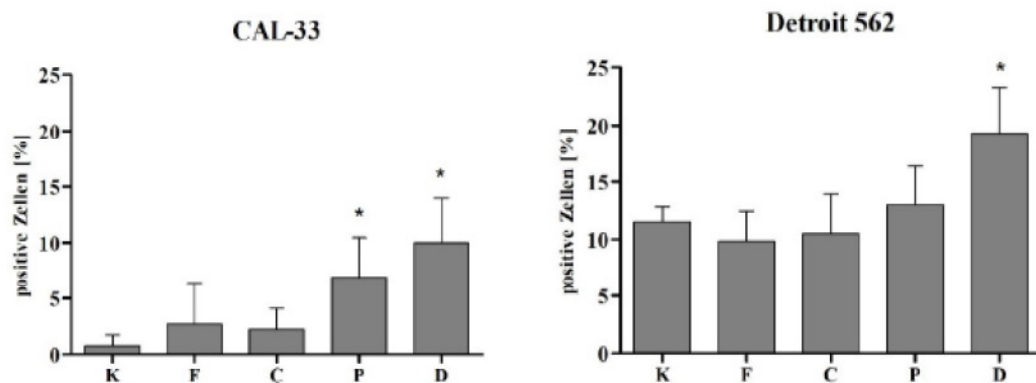
**Abbildung 24: Quantitative Zellzyklusanalyse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Behandlung mit Zytostatika und CDKI erfolgte in einem Zyklus für 24 h bzw. 72 h. Es wird der prozentuale Anteil an Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1-Phase (hellgrau, Signifikanzsymbol: \*) , S-Phase (gestreift, Signifikanzsymbol: +) und G2/M-Phase (dunkelgrau, Signifikanzsymbol: #) bezogen auf die Gesamtzellpopulation gezeigt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen).

K – Kontrolle, F – 5-FU: 2460 nM, C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

#### 4.7.4 Nachweis von Calreticulin

Ein weiterer Aspekt der Arbeit adressierte die Frage, ob infolge der Behandlung mit Zytostatika bzw. CDKI bei den HNSCC-Zellen ein immunogener Zelltod ausgelöst wird. Der Nachweis von transloziertem Calreticulin dient als spezifischer Marker und kann mittels Durchflusszytometrie erfasst werden. Hierfür wurden die Zellen der Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 mit einem anti-Calreticulin-Antikörper und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper angefärbt. Die Zellen wurden mit 5-FU, Cisplatin, Palbociclib bzw. Dinaciclib für 24 h behandelt. Die Konzentrationen wurden auf Grundlage der IC<sub>30</sub>-Werte aus den vorangegangenen Versuchen gewählt und können Tabelle 5 (Punkt 3.7.3) entnommen werden. Es ist der prozentuale Anteil Calreticulin-positiver Zellen nach der Behandlung für die Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 dargestellt (Abb. 25). Die basale Abundanz von transloziertem Calreticulin ist mit einem etwa 10-fach höherem Anteil an Calreticulin-positiven Detroit 562-Zellen zelllinienspezifisch (Detroit 562: 11,5 % vs. CAL-33: 0,8 %). Die Behandlung mit den CDKI induzierte bei beiden Zelllinien eine Calreticulin-Translokation, welche stärker ausgeprägt war als bei den beiden Zytostatika. Dinaciclib führte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu einem 12-fachen Anstieg an Calreticulin-positiven CAL-33 Zellen. Bei den Detroit 562-Zellen zeigte sich annähernd eine Verdopplung.

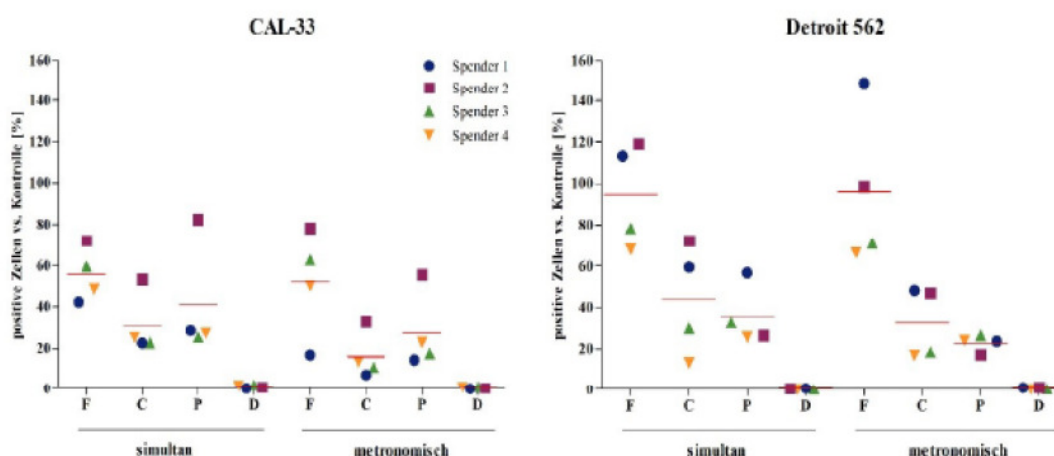


**Abbildung 25: Quantitativer Nachweis von Calreticulin bei CAL-33- und Detroit 562-Zellen nach Monotherapie mit Zytostatika bzw. CDKI.**

Die Behandlung mit Zytostatika bzw. CDKI erfolgte in einem Zyklus für 24 h. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle wurden durch  $p \leq 0,05 = *$  gekennzeichnet. K – Kontrolle, F – 5-FU: 2460 nM, C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

#### 4.7.5 *In vitro*-Ko-Kultur mit PBMC

In einem finalen Versuch erfolgte eine allogene Ko-Kultur von HNSCC-Zellen (CAL-33 und Detroit 562) mit PBMC von vier Spendern. Im simultanen und metronomischen Behandlungsansatz sollten potentielle Therapie-bedingte autoimmunologische Effekte erfasst werden. Bei dem simultanen Behandlungsansatz wurden die Substanzen zeitgleich mit den PBMC zu den Zellen gegeben und 72 h lang inkubiert. Beim metronomischen Behandlungsansatz wurden die Zellen einmalig für 24 h mit den Zytostatika und CDKI vorbehandelt und anschließend nach Substanzgabe für 72 h mit den PBMC inkubiert. Die Konzentrationen wurden auf Grundlage der IC<sub>30</sub>-Werte aus den vorangegangenen Versuchen gewählt und können Tabelle 5 (Punkt 3.7.3) entnommen werden. Nach Färbung der Zellen mit PI erfolgte die Auswertung mittels Durchflusszytometrie. In Abbildung 26 ist der prozentuale Anteil an positiven Zellen normalisiert zur Kontrolle dargestellt. Die Kontrollzellen wurden nicht behandelt, aber mit PBMC ko-kultiviert.



**Abbildung 26: Ko-Kultur von CAL-33- und Detroit 562-Zellen mit PBMC.**

Die HNSCC-Zellen wurden mit PBMC von vier Spendern im simultanen (keine Vorbehandlung) und im metronomischen (Vorbehandlung der HNSCC-Zellen, 24 h) Behandlungsansatz ko-kultiviert und mit Zytostatika bzw. CDKI in einem Zyklus (72 h) behandelt. K – Kontrolle, F – 5-FU: 2460 nM, C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

Die Behandlung mit Cisplatin bzw. Palbociclib erzielte vergleichbare Effekte, mit deutlicher Abnahme des Anteils an Tumorzellen auf 30-10 % bei drei von vier Spendern. Die Ko-Kultur mit 5-FU war insgesamt weniger wirksam. Die Behandlung der Zellen mit Dinaciclib führte



spendenunabhängig zur massiven Reduktion der Tumorzellzahl. Bei beiden Zelllinien lag der Anteil positiver Zellen bezogen auf die Kontrollgruppe unter 2 %.

In Analogie zu den Vorbefunden der Monotherapie (Punkt 4.1.1.) waren die Detroit 562-Zellen gegenüber 5-FU erneut weniger responsiv verglichen mit den CAL-33-Zellen. Obgleich bei drei von vier Spendern vergleichbare Befunde erhoben wurden, erzielte die Ko-Kultur mit Spender 2 weniger starke zytotoxische Effekte. Unabhängig vom verwendeten Therapeutikum wurde bei Spender 2 bei fast allen Ansätzen ein höherer Anteil positiver Zellen detektiert.

Der Vergleich der Daten von der simultanen und der metronomischen Substanzgabe zeigte bei beiden Zelllinien marginale Unterschiede. Die Vorbehandlung mit Cisplatin bzw. Palbociclib erhöhte jedoch die Sensitivität gegenüber einer Immunzell-vermittelten Lyse mit resultierender Reduktion des Anteils residualer Tumorzellen.

## 5 Diskussion

Um die multimodale und kombinierte Therapie von HNSCC-Patienten basierend auf chirurgischen Interventionen sowie Strahlen- und Chemotherapie möglichst effektiv, zielgerichtet und personalisiert zu gestalten, wird stetig an neuen Therapieansätzen geforscht. Die bereits identifizierten, in HNSCC häufig vorkommenden Genveränderungen und deren Einfluss auf bekannte Signalwege bieten Angriffspunkte für potentiell wirksame Substanzbehandlungen. Zu den Zielstrukturen gehören Elemente von Signalkaskaden, die unter anderem im Zusammenhang mit Prozessen der Proliferation, Invasion, Differenzierung und Zellzyklusregulation stehen (6). So stellen Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK) durch ihre zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus eine vielversprechende Zielstruktur dar. Die Wirksamkeit von Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren (CDKI), die selektiv für CDK4/6 sind, wurde für andere Tumorentitäten schon belegt, sodass bereits drei CDKI für die klinische Krebstherapie zugelassen sind (56, 58). Erste präklinische Daten bestätigten überdies deren Wirksamkeit bei HNSCC-Zellen (59). Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit der antitumoralen und immunmodulatorischen Wirkung von CDKI auf HNSCC-Zellen in Mono- und Kombinations-therapie *in vitro*. Das Ziel war es, potentiell synergistische Effekte und insbesondere eine verbesserte Sensitivität gegenüber CDKI durch die Kombination mit konventionellen Zytostatika sowie den Unterschied zwischen simultaner und metronomischer Behandlung zu untersuchen.

### 5.1 Einfluss von Zytostatika auf die Biomasse von HNSCC-Zellen

#### *in vitro*

Chemotherapeutika sind in der Behandlung von Krebspatienten kaum verzichtbar und auch in der HNSCC-Therapie werden Zytostatika in Abhängigkeit vom Tumorstadium neben der Chirurgie und Strahlentherapie standardmäßig eingesetzt (16). Die alleinige Chemotherapie vor allem als Einzelsubstanzgabe spielt dabei eher eine untergeordnete Rolle und kommt nur in der palliativen Therapie beim fortgeschrittenen Tumorstadium zum Tragen. Demgegenüber ist der Einsatz von Zytostatika als ergänzende bzw. kombinierte Therapie vorteilhaft (16, 38, 39). Metaanalysen bestätigten die positive Wirkung der ergänzend zur lokoregionalen Behandlung angewandten Chemotherapie für alle Tumorlokalisationen innerhalb der Gruppe der HNSCC (86, 87). So wird beispielsweise auch die zielgerichtete Therapie mit Cetuximab häufig mit einer Chemotherapie kombiniert (45, 88). Seitdem in mehreren Studien ein Vorteil in der Überlebenszeit bei kombinierter Behandlung mit Chemotherapie und Bestrahlung



nachgewiesen werden konnte, wurde die simultane Radiochemotherapie ein fester Bestandteil der Standardtherapie von HNSCC-Patienten (89).

Als Grundlage für die nachfolgenden Kombinationsversuche mit Zytostatika und CDKI wurde in dieser Arbeit die Chemoresponsivität von vier HNSCC-Zelllinien aus verschiedenen Ursprungsregionen gegenüber den Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin evaluiert. Es konnte mittels Auswertung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven eine zelllinienspezifische und dosisabhängige Wirksamkeit festgestellt werden. Diese individuellen Antworten auf die zytotoxische Behandlung spiegeln die Heterogenität der Gruppe der HNSCC wider. Neben der Behandlung in einem Zyklus für 72 h wurde die zweifache Behandlung (zwei Zyklen, 2 x 72 h) untersucht, da die Chemotherapie in klinischer Anwendung üblicherweise auch in mehreren Zyklen erfolgt. Wie zu erwarten, zeigte sich eine deutlich stärkere Wirkung durch die zweifache Behandlung im Vergleich zur einfachen. Die Behandlung mit 5-FU ergab in dem gewählten Konzentrationsbereich für alle Zelllinien eine konzentrationsabhängige Biomassereduktion. Allerdings konnte bei den Zelllinien CAL-33 und FaDu eine höhere Sensitivität gegenüber der 5-FU-Behandlung nachgewiesen werden als bei den Detroit 562- und PE/CA-PJ15-Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen Angaben in bereits veröffentlichter Literatur. So beschrieben auch Matijević et al. für die Zelllinien FaDu und Detroit 562 Unterschiede in der Sensitivität gegenüber 5-FU (90). Es wurden für die FaDu-Zellen mit unseren Ergebnissen vergleichbare  $IC_{50}$ -Werte in der Literatur angegeben und auch in Bezug auf die Behandlungskonzentrationen von 5-FU und Cisplatin sind für *in vitro*-Versuche mit FaDu-Zellen vergleichbare Konzentrationen zu finden (91, 92).

Pignon et al. berichteten in einer Metaanalyse zur Chemotherapie bei HNSCC, dass in der *in vivo*-Monotherapie Cisplatin im Vergleich zu anderen Zytostatika wie 5-FU signifikant stärkere Effekte erbringt und den anderen Substanzen vorgezogen werden sollte (93). Auch in unseren Ergebnissen zeigte sich bei der Behandlung mit Cisplatin ein Unterschied gegenüber den anderen beiden Zytostatika. Die zelllinienspezifische Sensitivität, die bei 5-FU und Gemcitabin nachgewiesen wurde, fand sich nicht bei der Behandlung mit Cisplatin. Es zeigte sich bei allen vier Zelllinien eine ähnlich starke und konzentrationsabhängige Wirkung auf die zelluläre Biomasse. Bei der einfachen Behandlung war die höchste getestete Konzentration nicht ausreichend, um eine Reduktion von 50 % zu erreichen, doch bei zweifacher Behandlung zeigten alle vier Zelllinien eine gute Chemoresponsivität. Es bestätigte sich damit eine generelle gute Wirksamkeit gegenüber HNSCC-Zellen unabhängig von deren Ursprungsregion und der Heterogenität dieser Tumorentität. Das Auftreten des zelllinienspezifischen Wirkmusters bei 5-FU und Gemcitabin im Gegensatz zu Cisplatin



könnte darin begründet sein, dass sie beide zur Gruppe der Antimetaboliten gehören und somit einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen (43, 44).

Die einfache Behandlung mit Gemcitabin zeigte ähnlich wie 5-FU eine stärkere Antwort bei den zwei Zelllinien CAL-33 und FaDu als bei Detroit 562 und PE/CA-PJ15. Bei der zweifachen Behandlung bewirkten schon die kleinsten Konzentrationen bei allen vier Zelllinien eine starke Reduktion der Biomasse auf unter 50 % (genormt auf die unbehandelte Kontrollgruppe) und es konnten innerhalb des gewählten Konzentrationsbereiches im Gegensatz zur einfachen Behandlung nur marginale Sensitivitätsunterschiede zwischen den Zelllinien festgestellt werden. Es ist fraglich ob das Verwenden von noch geringeren Konzentrationen auch bei der zweifachen Behandlung zu zelllinienspezifischen Unterschieden führen würde. In dem von uns gewählten Konzentrationsbereich konnte insgesamt keine konzentrationsabhängige Wirkung gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte in den Monotherapieversuchen bei allen drei Zytostatika eine gute Chemoresponsivität gezeigt und anhand der Konzentrations-Wirkungs-Kurven die Konzentrationen für die anschließenden Kombinationstherapieversuche ermittelt werden. Die, in den folgenden Versuchen verwendeten Konzentrationen lagen im Bereich der  $IC_{50}$ - bis  $IC_{30}$ -Werte.

## **5.2 Weitere basale Charakterisierung der HNSCC-Zellen**

### **5.2.1 Radiosensitivität**

Bei der Untersuchung der Radiosensitivität zeigte sich bei allen vier Zelllinien eine Abnahme der Biomasse der Zellen mit signifikanten Ergebnissen ab etwa 10 Gy. Bei weiterer Erhöhung der Strahlendosis bis zur höchsten Dosis von 100 Gy wurde nur noch eine geringe oder fehlende Zunahme des Effekts beobachtet und es kam zur Ausbildung eines Plateaus mit einer Biomasse von ca. 40-50 % bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Insgesamt konnte eine intrinsische Strahlenresistenz festgestellt werden, wobei sich die FaDu- und die PE/CA-PJ15-Zellen als etwas sensibler und die Detroit 562-Zellen sich als radioresistenter erwiesen. Eine mögliche Ursache hierfür ist die unterschiedliche Wachstumskinetik der einzelnen Zelllinien. Bei den Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 war diese deutlich geringer als bei den Detroit 562-Zellen. Die quantitative Biomassebestimmung erfolgte 72 h nach der Bestrahlung. Scherer et al. beschreiben, dass in proliferierenden Zellpopulationen die Mitoseraten bei Bestrahlung abnehmen, wobei die Teilung bereits in Mitose befindlicher Zellen noch erfolgt, aber keine neuen Prophasen stattfinden (94). Außerdem wird beschrieben, dass eine Verzögerung der Mitose durch Verlängerung des Generationszyklus erfolgt, die bis etwa

15 Gy linear mit der Dosis ansteigt und danach etwa eine Generationszeit beträgt. Daher besteht bei langsamerer Wachstumskinetik bei gleicher Strahlendosis eine größere absolute zeitliche Verzögerung der Proliferation (94, 95).

Gerade im fortgeschrittenem Stadium wird die Strahlentherapie oft in Form einer kombinierten Radiochemotherapie angewandt und auch die Kombination mit der Antikörpertherapie mit Cetuximab zeigte bereits ein verlängertes Überleben bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen HNSCC (16, 49). Bisherige Daten lassen vermuten, dass die Inhibition des Cyclin D1-CDK4/6-INK4-RB-Signalwegs die Sensitivität von Zelllinien gegenüber der Strahlentherapie erhöhen könnte (55). Hagen et al. vermuteten auf Grund ihrer Untersuchungen an Brustkrebszellen, dass durch eine Inhibition von CDK4/6 der strahlenbedingte Zelltod ansteigt, allerdings keine signifikante Veränderung der Progression des Zellzyklus erfolgt (96). Es wäre interessant auch bei HNSCC die Effekte der kombinierten Therapie in Hinblick auf eine möglicherweise erhöhte Radiosensitivität bei kombinierter CDKI-Behandlung *in vitro* zu evaluieren.

### 5.2.2 <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme behandelter HNSCC-Zellen

Um die exakte Lokalisation und Größe der Kopf-Hals-Tumoren im Rahmen des Staging zu ermitteln und anschließend einen Therapieplan zu erstellen, werden unter anderem die direkte Naso-Pharyngo-Laryngoskopie sowie bildgebende Verfahren in Form von der Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) verwendet (16). Schon vor einigen Jahren bestätigten Lauenbach et al. in ihrer Arbeit, dass sich in der <sup>18</sup>F-Fluor-desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (<sup>18</sup>F-FDG-PET) in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen, die in der klinischen Untersuchung nicht palpabel waren eine gesteigerte <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme zeigt und beschrieben die Möglichkeit das Staging von HNSCC mit Hilfe dieses Tracers zu verbessern und damit die Therapie besser planen zu können (72, 73). Dennoch besteht eine fortwährende Debatte über den Einsatz des <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT als Bestandteil der Routinediagnostik von lokal fortgeschrittenen HNSCC (97). Das Haupteinsatzgebiet des <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT liegt bei HNSCC an anderer Stelle des Therapiemanagements, nämlich in der Beurteilung des Verlaufs und des Therapieansprechens bei Radiochemotherapie (97). Grundlage dafür, die angestrebte Hemmung der Tumorphiliferation mit dem <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT zu überprüfen, ist die Assoziation einer reduzierten <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme des Tumors mit dem Ansprechen auf die Therapie. (98, 99). Damit eignet sich die <sup>18</sup>F-FDG-PET-Bildgebung auch zum Überwachen der Erkrankungsaktivität und Vorhersagen des Therapieansprechens bereits im frühen Verlauf der therapeutischen Interventionen (100).



In dieser Arbeit wurde die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme nach 72-stündiger Behandlung der HNSCC-Zellen mit 5-FU bzw. Palbociclib untersucht, um einen möglichen Einfluss der Substanzklassen als Grundlage für *in vivo*-Versuche zu evaluieren. Drei der Zelllinien zeigten eine Reduktion der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme durch die Behandlung mit 5-FU. Für diese drei Zelllinien CAL-33, Detroit 562 und PE/CA-PJ15 passten die Ergebnisse zu den Vorbefunden aus den Versuchen zur Chemoresponsivität. Dabei hatte CAL-33 im Vergleich zu den anderen Zelllinien nach der 5-FU-Behandlung in einem Zyklus die stärkste Abnahme der zellulären Biomasse gezeigt, was sich in der vergleichbar starken Abnahme der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme widerspiegelte. Die Zelllinien Detroit 562 und PE/CA-PJ15 wiesen in Bezug auf die Biomasse eine geringere Responsivität gegenüber 5-FU auf, passend zu der geringer ausgeprägten Veränderung in der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme nach 5-FU-Behandlung. Auch Dittmann et al. beschrieben in ihrer Arbeit zu OSC-1-Zellen (*oesophageal squamous cell carcinoma cells*) eine moderate Reduktion der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme nach Behandlung mit 5-FU (98). Für diesen Zusammenhang gibt es eine plausible Erklärung. Suttie et al. beschrieben in Bezug auf solide Tumoren, dass die Antwort auf die Chemotherapie, die im  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET durch die reduzierte Aufnahme gekennzeichnet ist, sowohl im Zusammenhang mit einem verringerten Zellgehalt des Tumors als auch einer verringerten  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme pro Zelle bzw. der Kombination aus beidem stehen könnte (99). Beide Mechanismen würden die Chemotherapie-induzierte Apoptose zum Ausdruck bringen. Zum einen kommt es zur Verringerung des Tumorumfanges, zum anderen besteht die Vermutung, dass die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme in apoptotische Zellen geringer ist als in vitale Zellen (99).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte die Evaluierung der Chemoresponsivität der HNSCC-Zellen zunächst mittels Kristallviolettassay. Diese Methode gibt zwar quantitative Ergebnisse in Bezug auf die Zellbiomasse, allerdings lassen sich damit keine Aussagen zur Vitalität der detektierten Zellen treffen. In der von uns durchgeführten Apoptose- / Nekrosebestimmung zeigte sich für die CAL-33-Zellen ein stärkerer Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen als bei den Detroit 562-Zellen nach der Behandlung mit 5-FU, was die Ergebnisse der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme untermauert.

Interessanterweise konnte bei den FaDu-Zellen eine moderate Zunahme der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme festgestellt werden. Für diese Zelllinie war der Effekt von 5-FU auf die Biomasse verhältnismäßig gering, jedoch nachweisbar und stellt folglich keine Erklärung für die detektierte Steigerung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme durch die Behandlung dar. Einige Studien berichten, dass die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme in manchen Tumoren, die auf die Chemotherapie ansprechen, ansteigt (100). Dieses sogenannten *metabolic flare*-Phänomen wurde bereits in



Tumoren in Verbindung mit der Radiotherapie, der hormonellen Therapie, Immuntherapie und etwas weniger stark bei der Chemotherapie beschrieben (100). Es wird angenommen, dass die Radio- und Chemotherapie *in vivo* einen Anstieg der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Akkumulation induzieren könnte, der durch inflammatorische Infiltrate bedingt ist. Weiterhin wurde bei *in vitro*-Versuchen ein Anstieg der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Akkumulation nach Radiotherapie beschrieben (101). Allerdings ergab diese Studie auch, dass Inhibitoren der mRNA und Proteinsynthese diesen Anstieg unterdrücken. Das deutet darauf hin, dass der Anstieg des Glukosemetabolismus über Prozesse der Genexpression laufen könnte (101).

Palbociclib bewirkte bei allen vier Zelllinien eine mäßige Reduktion der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme und auch bei den Versuchen der quantitativen Bestimmung der Biomassereduktion nach Behandlung mit Palbociclib zeigten alle Zelllinien ähnliches Verhalten. Der etwas stärkere Effekt bei den Detroit 562-Zellen im Vergleich zu den CAL-33-Zellen passt zu den Befunden der Apoptose- / Nekrosebestimmung. Die Detroit 562-Zellen wiesen einen höheren Anteil an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen sowohl unbehandelt als auch nach Behandlung mit Palbociclib auf. Bisher gibt es kaum Daten über den Nutzen eines  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET-CT für die Evaluierung des Therapieansprechens bei Palbociclib. Laut den Ergebnissen von Taralli et al. scheint es bei Brustkrebs nützlich zu sein, um im Hinblick auf eine personalisierte Therapie frühzeitig die Patienten herauszufiltern, bei denen die Palbociclibtherapie wegen eines Krankheitsprogresses unterbrochen werden muss (102).

Theoretisch müsste die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der unbehandelten Zellen bei beiden Therapie-schemata gleich sein. Allerdings zeigten unsere Ergebnisse eine höhere  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der unbehandelten Zellen in der Versuchsreihe mit 5-FU als bei der mit Palbociclib. Eine mögliche Fehlerquelle ist der verhältnismäßig lange Transport von dem Labor, in dem unsere Zellen kultiviert und therapiert wurden, zur Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Rostock, in der die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Zugabe und die Messung erfolgte. Ebenso könnten Temperaturschwankungen (Innen- vs. Außentemperatur) eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen. Eine Standardisierung der Versuchsbedingungen ist zukünftig wünschenswert.

Diese Untersuchung sollte einen Einblick geben, wie sich die HNSCC-Zellen in Bezug auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme nach Behandlung verhalten und eine Grundlage für weitere Versuche *in vivo* geben. Man könnte an den FaDu-Zellen weitere Substanzen testen, um zu evaluieren, ob es dabei ebenfalls zu einem Anstieg der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme kommt. Zusätzlich wäre es interessant auch für diese Zelllinie die Apoptose- / Nekrosebestimmung und eventuell eine Zellzyklusanalyse durchzuführen, um mögliche Ursachen für die gesteigerte Aufnahme zu

finden. Da es dazu noch kaum Daten gibt, könnte im Vergleich zu Palbociclib auch der pan-CDKI Dinaciclib getestet werden.

### 5.2.3 Basales Expressionslevel von pAKT und AKT

Ein für die Tumorgenese von HNSCC bedeutender Signalweg ist der EGFR-PI3K-AKT-Signalweg (103). In über 90 % der HNSCC ist dieser Signalweg, bedingt durch verschiedenen Genveränderung, aktiv (104). Bei allen der vier untersuchten Zelllinien liegt eine Genveränderung im *PIK3CA*-Gen in Form einer Mutation bzw. *CNV* (*copy number variation*) vor (s. Tabelle 1), die zur Hyperaktivität des Signalwegs und zur Proliferation des Tumors führen. Voraussetzung ist das Vorhandensein der Serin/Threoninkinase AKT. Mithilfe des Western Blots haben wir feststellen können, dass bei den vier HNSCC-Zelllinien eine basale Expression von AKT sowie der phosphorylierten und damit aktivierten Form pAKT besteht. Mit der Kenntnis der aktivierenden Genveränderungen und dem Ergebnis des Western Blots können wir davon ausgehen, dass der EGFR-PI3K-AKT-Signalweg bei den Zelllinien basal aktiv ist. Über den Signalweg wird unter anderem die Expression von Cyclin D1 im Zellkern reguliert (25). Damit gibt es eine Verbindung zu der Wirkung von CDKI, insbesondere den selektiven CDK4/6-Inhibitoren, da diese Cyclin-abhängigen-Kinasen im Komplex mit Cyclin D1 wirken und die Aktivität der CDK maßgeblich durch die Synthese bzw. Degradation ihrer zugehörigen Cycline bestimmt wird (52). Das bedeutet, dass die gesteigerte Expression von Cyclin D1 durch die Hyperaktivität des EGFR-PI3K-AKT-Signalwegs ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit den CDKI bedeuten könnte, weshalb wir diesen Western Blot als Vorversuch zur basalen Charakterisierung der Zelllinien durchgeführt haben. Überdies berichten Horn et al. in ihrer Arbeit, dass der EGFR-PI3K-AKT-mTOR-Signalweg eine Schlüsselrolle bei der Radioresistenz von HNSCC einnimmt und eine Inhibition von Komponenten des Signalwegs eine Radiosensitivität bewirkt (103). Es liegen bereits Daten für die Kombination von PI3K- und mTOR-Inhibitoren mit Chemotherapeutika *in vivo* vor (104). Zudem äußerten Ku et al., dass bei der Kombination von Abemaciclib und einem mTOR-Inhibitor synergistische Effekte festgestellt werden konnten (105). In einer laufenden Phase-I-Studie wird der reversible PI3K/mTOR-Inhibitor Gedatolisib kombiniert mit Palbociclib an fortgeschrittenen soliden Tumoren, auch HNSCC, getestet (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03065062) (26). Für unsere Versuche wäre es interessant die CDKI Palbociclib, Abemaciclib und Dinaciclib in Kombination mit einer Inhibition des EGFR-PI3K-AKT-mTOR-Weges zu testen.



### 5.3 Einfluss der zielgerichteten Therapie mit CDKI auf die Biomasse und Proteinexpression von HNSCC-Zellen *in vitro*

Als Grundlage für die nachfolgenden Kombinationsversuche mit den Zytostatika und CDKI wurde in dieser Arbeit die Wirkung von CDKI auf die Biomasse von vier HNSCC-Zelllinien evaluiert. Zwei von unseren verwendeten CDKI, Palbociclib und Abemaciclib sind selektiv für CDK4 und CDK6 und bereits für die Therapie von Brustkrebs zugelassen (56, 58). Im Vergleich dazu haben wir den CDK1/2/5/9-Inhibitor Dinaciclib getestet. Die Versuche zur Wirksamkeit der CDKI *in vitro* wurden analog zu der Bestimmung der Chemoresponsivität durchgeführt und ausgewertet. Die Behandlung der Zellen mit den selektiven CDKI Palbociclib und Abemaciclib zeigte im einfachen Therapieansatz (1 Zyklus, 72 h) kaum Wirkung auf die zelluläre Biomasse. Bei zweifacher Behandlung mit Palbociclib ergaben sich signifikante Ergebnisse im höheren Konzentrationsbereich. Die Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 erwiesen sich als etwas sensibler als die zwei anderen Zelllinien. Die FaDu-Zellen reagierten erst bei hohen Konzentrationen mit einer Biomassereaktion und die PE/CA-PJ15-Zellen zeigten eine intrinsische Resistenz gegenüber Palbociclib bis zur höchsten Konzentration von 5  $\mu$ M.

Für Abemaciclib ergaben sich bei zweifacher Behandlung ähnliche Ergebnisse wie für Palbociclib. Es waren hierbei ebenfalls die Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 etwas sensibler und es zeigte sich im höheren Konzentrationsbereich eine signifikante Biomassereduktion. Die Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 sprachen auch im hohen Konzentrationsbereich nicht auf die Behandlung mit Abemaciclib an. Insgesamt wurde bei allen vier Zelllinien eine noch geringere Biomassereduktion festgestellt als für Palbociclib.

Die Ursache für unterschiedliches Ansprechen auf die Behandlung mit CDK4/6-Inhibitoren könnte in den verschiedenen molekularen Mechanismen in den HNSCC-Zellen liegen. Während laut Gong et al. Zellen mit einer Mutation im *CDKN2A*-Gen (kodiert für p16<sup>INKA4</sup>) eine partielle Sensitivität aufzeigen, führt das Vorhandensein von Aberrationen des *CCND1*-Gens (kodiert für Cyclin D) zu einer hohen Sensitivität gegenüber den CDKI (106).

Für die Behandlung mit Dinaciclib ergaben sich dosisabhängige Biomassereduktionen. Im höheren Konzentrationsbereich war die Zweifachbehandlung der einfachen deutlich überlegen. Im Gegensatz zu den selektiven CDKI zeigte hier die Zelllinie CAL-33 die geringste Sensitivität. Am sensiblen waren die Detroit 562-Zellen mit signifikanter Reduktion bereits ab der niedrigsten Konzentration von 1,6 nM. Insgesamt war die Behandlung mit Dinaciclib der Behandlung mit den CDK4/6-Inhibitoren deutlich überlegen, was

vermutlich auf die globalere Wirksamkeit dieses CDKI zurückzuführen ist. Dinaciclib ist selektiv für CDK1/2/5/9 (61). Damit hemmt es nicht wie Palbociclib nur CDK, die direkt auf die Zellzyklusregulation wirken (CDK1/2/4/6), sondern zusätzlich CDK, die an anderen Prozessen der Zellproliferation beteiligt sind. So spielt beispielsweise CDK9 eine wichtige Rolle in der Transkriptionsregulierung mit Einfluss auf die RNA-Polymerase II (107).

Des Weiteren wurde die Proteinexpression von CDK2/4/6/7/9 mittels Western Blot untersucht. Nach der Behandlung mit Palbociclib konnte im Vergleich zu Dinaciclib nur eine geringe Veränderung in der CDK-Expression festgestellt werden. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Western Blot-Analyse nach einfacher Substanzbehandlung (ein Behandlungszyklus, 24 h) erfolgte und Palbociclib in den Untersuchungen zur Biomassereduktion nach einem Behandlungszyklus ebenfalls wenig effektiv war. Ein deutlicher Effekt zeigte sich erst nach zwei Behandlungszyklen. Dies lässt vermuten, dass bei der Western Blot-Analyse analog zu den Untersuchungen der Biomassereduktion erst nach zweifacher Behandlung eine deutliche Herunterregulation der Zielproteine nachweisbar ist bzw. hemmende Effekte transient und somit nur direkt nach der Behandlung (ca. 4-6 h) nachweisbar sind. Daher könnte es sinnvoll sein, die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot auch nach zwei Behandlungszyklen durchzuführen.

Es ist zwar bekannt, dass Dinaciclib im Vergleich zu Palbociclib mehr CDK (CDK1/2/5/9) inhibiert, allerdings erklärt sich daraus nicht die globale Wirkung auf die Expression von CDK, die wir im Western Blot feststellen konnten.

#### **5.4 Effekte der Kombinationstherapie mit Zytostatika und CDKI auf die Biomasse von HNSCC-Zellen *in vitro***

Im Anschluss an die Therapie mit den Einzelsubstanzen wurden Kombinationstherapien getestet. Dazu wurden die Zytostatika 5-FU, Cisplatin bzw. Gemcitabin mit den CDKI Palbociclib bzw. Dinaciclib im simultanen und metronomischen Therapieschema zu den HNSCC-Zellen gegeben und untersucht, ob synergistische Effekte nachweisbar sind. Die Konzentrationen für die Kombinationsbehandlungen wurden anhand der Ergebnisse der Monotherapieversuche festgelegt. Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die der IC<sub>50</sub> bzw. IC<sub>30</sub> entsprachen. Mit der Berechnung des Kombinationsindex für die einzelnen Kombinationen, wurde die Wirkung der Kombinationstherapien quantitativ erfasst. Es konnten bei zwei von vier HNSCC-Zelllinien synergistische Effekte ermittelt werden. Bei den Detroit 562- und FaDu-Zellen kam es zur Verstärkung der Einzelwirkungen bei der simultanen Kombination von Palbociclib mit 5-FU bzw. Cisplatin. Bei beiden Zelllinien hatte



auch jeweils eine Kombination mit Dinaciclib einen verstärkten Effekt. Diese war bei den Detroit 562-Zellen Dinaciclib kombiniert mit 5-FU und bei den FaDu-Zellen mit Cisplatin. Außerdem stellte sich eine synergistische Wirkung der kombinierten Gabe von Palbociclib und Dinaciclib bei der Zelllinie Detroit 562 heraus. Bei den CAL-33 und PE/CA-PJ15-Zellen wurden bei keiner der getesteten Kombinationsansätze synergistische Effekte nachgewiesen. Die Kombinationen mit Gemcitabin zeigten bei allen vier Zelllinien ausschließlich antagonistische Wirkungen und sollten daher nicht für zukünftige *in vivo*-Anwendungen empfohlen werden.

Auffällig war, dass bei den Zelllinien, die sich als resistenter gegenüber der CDKI-Monotherapie gezeigt hatten, auch keine Verstärkung durch Kombination mit den Zytostatika erzielt wurde. So ergaben sich beispielsweise bei der gegenüber Palbociclib resistenten Zelllinie PE/CA-PJ15 in Kombination mit den verschiedenen Zytostatika nur antagonistische Effekte. Ähnliches konnte bei der CAL-33-Zelllinie in Bezug auf Dinaciclib detektiert werden. Das lässt darauf schließen, dass die Kombinationstherapie mit CDKI und Zytostatika vielversprechend bei Zelllinien ist, die sensitiv gegenüber dem CDKI in der Monotherapie sind, jedoch eine intrinsische CDKI-Resistenz nicht durch Zytostatika reversibel ist.

Hinsichtlich der Biomassereduktion konnte bei der Kombinationstherapie ein Vorteil in der simultanen Substanzgabe gegenüber der metronomischen nachgewiesen werden. Besonders bei den Kombinationen der Zytostatika mit Palbociclib ergab sich eine bessere Wirksamkeit, wenn die beiden Substanzen simultan zu den Zellen gegeben wurden. Obwohl die Ergebnisse zelllinienspezifische Unterschiede aufwiesen, ließ sich dieser Trend bei allen vier Zelllinien erkennen. Die FaDu-Zellen reagierten im Vergleich zu den anderen Zelllinien mit einem besonders starken Unterschied in der Reaktion auf die simultane und metronomische Substanzgabe. Bei den PE/CA-PJ15-Zellen ergaben sich dagegen nur geringe Unterschiede. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Monotherapie mit Palbociclib lässt sich der Schluss ziehen, dass bei kombinierter Therapie die Unterschiede zwischen der simultanen und metronomischen Gabe weniger stark ausgeprägt sind, wenn bereits eine intrinsische Resistenz gegenüber der Einzeltherapie mit Palbociclib besteht. Insgesamt zeigte sich bei den metronomischen Therapieansätzen mit Palbociclib eine tendenziell stärkere Biomassereduktion, wenn das Zytostatikum vor dem CDKI gegeben wurde als andersherum, was auch für mögliche folgende *in vivo*-Versuche von Bedeutung sein könnte. In dem Artikel von Malumbres et al. wurde die Vermutung geäußert, dass CDKI einen besseren therapeutischen Effekt aufweisen, wenn die Zellen synchronisiert sind bzw. ein bestimmter Zellzyklusphasenarrest vorliegt (62). Dies könnte im Zusammenhang damit stehen, dass unsere

Ergebnisse beim metronomischen Behandlungsansatz mit Palbociclib einen besseren Effekt gezeigt haben, wenn die Zytostatika vor dem CDKI gegeben wurden.

Dennoch ist die grundsätzlich aufgezeigte Überlegenheit der simultanen Gabe hervorzuheben. Bei den Kombinationen mit Dinaciclib fiel der Unterschied zwischen simultaner und metronomischer Gabe bei allen Zelllinien geringer aus als bei den Kombinationen mit Palbociclib und es ließen sich auch keine zelllinienspezifischen Unterschiede erkennen.

Zusammenfassend wurden bei zwei Zelllinien synergistische Effekte in der Kombinationstherapie nachgewiesen und die Frage nach einer erhöhten Sensitivität gegenüber einer CDKI-Behandlung durch Kombination mit einer Chemotherapie bei HNSCC-Zellen *in vitro* bestätigt. Auch wenn Palbociclib in der Monotherapie Dinaciclib deutlich unterlegen war, zeigte es in der Kombinationstherapie gute Wirkung. Besonders geeignet scheinen die CDKI in Kombination mit 5-FU bzw. Cisplatin zu sein. Für folgende Versuche im *in vivo* Xenograft-Modell sind diese Kombinationen besonders vielversprechend. Demgegenüber kann anhand der gewonnenen Daten keine Empfehlung zur Kombination von Gemcitabin mit CDKI gegeben werden. Die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sollte Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein.

## 5.5 Scratch Assay

Im *Scratch Assay* konnten exemplarisch an den CAL-33-Zellen die Ergebnisse der Versuche zur Monotherapie mit den Zytostatika und den CDKI sowie der Kombinationstherapie visuell bestätigt werden. Es zeigte sich erneut eine deutlich stärkere Wirksamkeit von Dinaciclib im Vergleich zu Palbociclib. Die starke antitumorale Wirkung von Dinaciclib führte sowohl in Mono- als auch Kombinationstherapie zu einem zeitlich verzögerten und auch unvollständigen Schluss der Wunde. Interessant wäre es diesen Versuch mit Detroit 562 und FaDu durchzuführen, da bei diesen zwei Zelllinien synergistische Effekte in der Kombinationstherapie nachgewiesen wurden. Dabei sollten auch Cisplatin und dessen Kombination mit Palbociclib sowie Dinaciclib als Therapieansatz in den Versuch aufgenommen werden.

## 5.6 Funktionelle Analysen Therapie-vermittelter zytotoxischer Effekte

In den vorangegangenen Versuchen wurden die Effekte der Mono- und Kombinationstherapie durch quantitative Biomassereduktion der Zellen evaluiert. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es die Effekte der Therapieschemata differenziert zu untersuchen, um mittels funktioneller Analysen die zugrunde liegenden Mechanismen besser verstehen zu können.



Bei der Bestimmung des Phänotyps der vier HNSCC-Zelllinien konnte insgesamt eine hohe Abundanz des immunmodulierenden Oberflächenmoleküls PD-L1 festgestellt werden. Das Immuncheckpoint-Molekül CTLA-4 zeigte bei allen Zelllinien ein niedriges basales Expressionslevel und es konnte eine individuelle Expression des anti-inflammatorischen Immuncheckpoint-Moleküls B7-H3 gezeigt werden.

Die Ergebnisse der Doktorarbeit bezüglich der Abundanz von PD-L1 stehen im Einklang mit Ergebnissen von Müller et al. (108). Diese beschreiben, dass ein hohes PDL-1-Expressionslevel auch bei HNSCC üblich ist und eine Assoziation mit einem schlechten *Outcome* unabhängig von der Ursprungsregion besteht. Vielmehr konnte die Bedeutung einer hohen PD-L1-Expression als prognostischer Biomarker belegt werden. So scheinen HNSCC mit hohem PD-L1-Level und aktiviertem PD-1/PD-L1-Signaleweg einen aggressiven Krebsphänotyp darzustellen (108). Das hohe PD-L1-Level kann therapeutisch als Target für monoklonale Antikörper genutzt werden, um die Immunantwort auf den Tumor zu steigern (109). Die Antikörper unterbinden die PD-L1/PD-1-Interaktion und verhindern das Unterdrücken der Antitumor-Immunität (48, 110). In der Arbeit von Ferris et al. wurde bereits ein Vorteil in der Therapie von HNSCC mit dem monoklonalen anti-PD-1-Antikörper Nivolumab beschrieben (111). Unsere Ergebnisse bestätigen aufgrund der hohen basalen PD-L1-Expression, dass auch bei den getesteten HNSCC-Zellen solche PD-1-Antikörper für die Therapie von Nutzen sein könnten. Allerdings berichteten Moskovitz et al., dass die Mehrheit an Patienten nicht von der anti-PD-1-Therapie profitiert, weshalb Interesse an der Evaluierung von kombinierten Immuntherapien besteht (112). Neben der Kombination einer anti-PD-1-Therapie, beispielsweise mit einem anti-CTLA-4-Antikörper, gilt es die Kombination mit Strahlentherapie, Chemotherapie und weiteren Substanzen zu untersuchen, zu denen auch bereits klinische Studien laufen (112). Mit der Untersuchung der vier HNSCC-Zelllinien nach Behandlung mit den Testsubstanzen sollte die Frage nach einer möglicherweise veränderten Expression dieser Oberflächenproteine beantwortet werden. Es zeigte sich bei allen getesteten Substanzen eine leichte, nicht signifikante Abnahme des PD-L1-Levels und ein Anstieg des CTLA-4-Expressionslevels. Da die Ergebnisse allerdings hohe Standardabweichungen aufweisen, wäre die Durchführung weiterer Versuche sinnvoll, um die sich abzeichnende Tendenz nach Behandlung der Zellen mit den Zytostatika bzw. CDKI zu verifizieren.

Um die zytotoxischen Effekte der Substanzen genauer zu beurteilen, haben wir mittels Durchflusszytometrie den Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen sowie eine Zellzyklusanalyse an den Zelllinien CAL-33 und Detroit 562 durchgeführt. Zunächst wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der quantitativen Biomassebestimmung nach Mono-



therapie eine Zunahme des Anteils an avitalen Zellen über die Zeit nachgewiesen (24 h vs. 72 h). Während die Zellen initial apoptotisch waren, dominierte bei längerer Behandlungszeit die Nekrose, wobei insgesamt die Zahl avitaler Zellen mit der Behandlungsdauer korrelierte. Auch die Wirkmuster der einzelnen Substanzen aus den Monotherapieversuchen wurden bestätigt. Bei den CAL-33-Zellen, die im Vergleich zu den anderen Zelllinien sehr sensitiv gegenüber 5-FU waren, konnte nach 72 h ein sehr hoher Anteil nekrotischer Zellen festgestellt werden. Dinaciclib zeigte insbesondere bei den Detroit 562-Zellen starke zytotoxische Effekte und war gegenüber Palbociclib überlegen. Auch Parry et al. gaben an, dass Dinaciclib nach einfacher Gabe in einer Vielzahl humaner Tumorzelllinien den Zelltod induziert (113). Dafür sind nicht nur die Inhibition von zellzyklusregulierenden CDK wie CDK1 und CDK2, sondern auch die Inhibition von nicht unmittelbar auf die Zellzyklusregulation wirkenden CDK wie beispielsweise CDK9 verantwortlich. Dadurch wird unter anderem die transkriptionelle Regulation von antiapoptotischen Proteinen unterdrückt (114). Das würde erklären, dass Dinaciclib eine deutlich stärkere apoptotische Wirkung aufweist als der selektive CDK4/6-Inhibitor Palbociclib.

Mittels Laser-Scanning-Mikroskopie wurde schließlich die autophagozytische Aktivität nach der Substanzgabe untersucht. Autophagie ist ein zellulärer Prozess, in dem Zellorganellen und Zytoplasmabestandteile im Zuge des Zellstoffwechsels verdaut und recycelt werden (115). Zusätzlich zu der Aufrechterhaltung grundlegender katabolischer Prozesse nutzen Zellen die Autophagie, um in Stresssituationen länger zu überleben. Dies steht in Verbindung mit einer geförderten Tumorgenese und einer Resistenz gegenüber einer Krebstherapie (116). Im Widerspruch dazu gibt es Hinweise darauf, dass dem biologischen Prozess der Autophagie eine Tumorsuppressorfunktion zugeschrieben werden kann und darin ein potentieller Angriffspunkt für die Krebstherapie besteht (117). Jiang et al. vermuten, dass Autophagie ein Teil des Mechanismus darstellt, mit dem das RB-Protein seine Wirkung als Tumorsuppressor ausübt (118). In diesem Zusammenhang zeigten vorangegangene Studien, dass CDKI Autophagie induzieren. Dabei kommt deren Aktivierung des Tumorsuppressorproteins RB und dessen Herunterregulation des Transkriptionsfaktors E2F als möglicher Mechanismus für die Induktion von Autophagie in Frage (118). Unsere Ergebnisse zeigten, dass sowohl die beiden Zytostatika 5-FU und Cisplatin als auch die CDKI Palbociclib und Dinaciclib Autophagie im moderaten Maß induzieren. Es wurde kein wesentlich stärkerer Effekt durch die CDKI-Behandlung im Vergleich zu den Zytostatika beobachtet. Bei der Behandlung mit Dinaciclib wurde in Korrelation zu unseren Ergebnissen der quantitativen Biomassebestimmung nach der Monotherapie eine deutliche Abnahme der Zellzahl



festgestellt. Einhergehend mit dem hohen Anteil an nekrotischen Zellen wurden morphologische Veränderungen der Zellen wie beispielsweise eine Zytoplasmaschwellung detektiert. Die Induktion von Autophagie scheint für die starke antitumorale Wirkung von Dinaciclib eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Wir konnten die Autophagie-induzierende Wirkung von Palbociclib, die bereits für andere Tumorentitäten beschrieben wurde, an den HNSCC-Zelllinien bestätigen. Allerdings zeigte sich keine deutliche Überlegenheit von Palbociclib im Vergleich zu den anderen Substanzen. Derzeit ist noch unklar, welche Bedeutung für das Therapieansprechen oder eine mögliche Therapieresistenz resultiert und über welche Mechanismen der Zusammenhang zu der Aktivität von Tumorsuppressoren wie dem RB-Protein sowie p53 besteht.

Als weiteren Aspekt im Zusammenhang mit den zytotoxischen Effekten der Zytostatika und CDKI auf die HNSCC-Zellen haben wir das Auslösen eines immunogenen Zelltodes infolge der Substanzbehandlung untersucht. Abhängig von den verschiedenen Arten des Zelltodes kann durch die Behandlung mit zytotoxischen Substanzen eine Aktivierung des Immunsystems erfolgen (119). Ziel ist es, durch das Induzieren eines immunogenen Zelltodes die Anti-Tumor-Antwort des Körpers zu verstärken. Interessanterweise induzierten die CDKI im Vergleich zu den Zytostatika einen immunogenen Zelltod effektiver. Im direkten Vergleich der beiden CDKI waren bei Dinaciclib stärkere Effekte nachweisbar, einhergehend mit Befunden aus der Literatur, in denen Dinaciclib als *bona fide* immunogener Zelltod-Induktor beschrieben wurde (120, 121). Darüber hinaus untermauern diese Befunde unsere eigenen Vorergebnisse mit Induktion von Apo-Nekrose insbesondere nach der Behandlung mit Dinaciclib.

Die Effekte der Zytostatika und CDKI wurden weiterführend anhand von Zellzyklusanalysen verifiziert und erzielten analog zur Apoptose- / Nekrosebestimmung zelllinienspezifische Resultate. Nach 24-stündiger Behandlung zeigte sich eine Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase und Abnahme in der G2/M-Phase. Somit wurde ein G1-Phasenarrest induziert. Nach längerer Behandlungszeit wurden nur noch wenige vitale Zellen erfasst. Ein Großteil der Zellen befand sich bereits im Sub-G1-Peak. Bei den CAL-33-Zellen war dies vor allem bei der Behandlung mit 5-FU und Dinaciclib zu beobachten, was die Ergebnisse der quantitativen Biomassebestimmung nach Monotherapie widerspiegelt. Bei den Detroit-562-Zellen ist dieser Effekt vor allem bei Dinaciclib und Palbociclib aufgetreten, wohingegen 5-FU kaum Einfluss hatte. Bei den verbliebenen residualen Zellen wurde primär ein G0/G1-Arrest detektiert und damit indirekt die Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen bestätigt.

Zusammenfassend ließ sich nach der Behandlung mit den Zytostatika und CDKI zunächst eine Zellzyklusverschiebung sowie bei längerer Behandlung ein Arrest in der G0/G1-Phase nachweisen. Zudem korrelierte die Sensitivität mit der Anzahl an avitalen Zellen mit Sub-G1-DNA-Gehalt.

Bei der Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot zeigte sich durch die Behandlung mit Dinaciclib bei beiden Zelllinien eine deutliche Reduktion in der Expression der untersuchten CDK. Bisher gibt es auch in der Literatur noch keine Erklärung dafür. Es ist zwar bekannt, dass Dinaciclib vor allem CDK1/2/5/9 hemmt, allerdings bietet das keine eindeutige Erklärung dafür, dass die Expression der CDK erniedrigt ist. Eine besondere Rolle in der Gruppe der CDK übernimmt CDK7, da es andere CDK aktiviert (62). Das würde bedeuten, dass bei Inhibition von CDK7 eine verminderte Aktivität andere CDK zu erwarten wäre, was allerdings nicht unbedingt mit einem verminderten Expressionslevel der CDK im Western Blot einhergehen müsste. Für diese Überlegung wäre weiterhin zu klären, inwiefern Dinaciclib CDK7 hemmt, für das es laut der Literatur nicht selektiv ist. Es könnte die Vermutung angestellt werden, dass Dinaciclib über einen noch nicht geklärten Mechanismus hemmend auf die Expression mehrerer CDK wirkt. Auch die Unterschiede zu Palbociclib können zum derzeitigen Stand nicht erklärt werden. Der im Vergleich zu Dinaciclib fehlende Effekt auf die Expression der CDK könnte darin liegen, dass Palbociclib nur transient wirkt. Ebenfalls die einzelnen abgeschwächten Banden durch die Zytostatikabehandlung lassen sich nicht eindeutig interpretieren. Sie könnten zunächst als unspezifischer Effekt als Folge der globalen DNA-Schädigung / -Synthesehemmung gedeutet werden. Es müssen weitere Versuche dazu erfolgen. Eventuell könnten auch andere Konzentrationen und die Kombinationstherapien getestet werden.

Mit dem Ko-Kultur-Versuch von HNSCC-Zellen und peripheren mononukleären Zellen des Blutes sollte ein inflammatorisches Mikromilieu imitiert werden, um mögliche Therapie-assoziierte immunologische Effekte aufzuzeigen. Auch hier ergaben sich zelllinienspezifische Ergebnisse. Dabei waren die Detroit 562-Zellen insgesamt weniger responsiv, als die CAL-33-Zellen. Diese Daten bestätigen die Befunde der Monotherapien. Die starke Zytotoxizität von Dinaciclib blieb in der Ko-Kultur aufrechterhalten. Der Vergleich von dem simultanen und metronomischen Ansatz ergab marginale Unterschiede mit der Tendenz, dass die metronomische Vorbehandlung eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Immun-vermittelten Lyse mit resultierender Reduktion des Anteils residualer Tumorzellen bewirkte. In der Gesamtschau lassen sowohl die Befunde zum immunogenen Zelltod als auch die Daten der Tumor-Immunzell-Ko-Kultur den Schluss zu, dass eine Vorbehandlung mit CDKI die



Immunogenität von Tumorzellen erhöhen kann. Dies stellt eine solide Basis für weiterführende Untersuchungen dar, um CDKI in immuntherapeutische Konzepte zu integrieren. Darüber hinaus sollten zukünftige Arbeiten auch die vielversprechenden Kombinationen von CDKI und Zytostatika noch differenzierter untersuchen, beispielsweise durch funktionelle sowie molekulare Analysen. Für folgende Versuche im Xenograft-Modell sollten ausschließlich die Kombinationen eingesetzt werden, die im Rahmen dieser Arbeit synergistische Effekte erzielt haben, um die Wirksamkeit *in vivo* zu veri- oder falsifizieren. Schließlich wäre im Hinblick auf die klinisch relevanten multimodalen Therapiekonzepte ebenfalls interessant, das Potential der Kombinationstherapie auf die Radiosensitivität zu evaluieren und die CDKI Palbociclib, Abemaciclib und Dinaciclib in Kombination mit einem EGFR-PI3K-AKT-mTOR-Inhibitor zu testen.

## 6 Zusammenfassung

Die Kopf-Hals-Tumoren (*head and neck squamous cell carcinomas, HNSCC*) bilden eine heterogene Gruppe an Malignomen. Sie stellen die weltweit siebthäufigste Krebserkrankung dar und weisen eine hohe Mortalitätsrate von bis zu 50 % auf (1). Die multimodale Standardtherapie basiert auf chirurgischer Intervention sowie Strahlen- und Chemotherapie, welche teilweise auch in Kombination eingesetzt werden (16). Zudem gibt es zunehmend Bestrebungen, die Therapie möglichst zielgerichtet zu gestalten, um die Patienten effektiv und nebenwirkungsarm zu behandeln. Aufgrund der molekularen Veränderungen in HNSCC stellt die Inhibition von Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK) einen potentiellen Angriffspunkt für die zielgerichtete Therapie dar.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, das antitumorale und immunmodulatorische Potential von CDKI in Mono- und Kombinationstherapie mit konventionellen Zytostatika gegenüber HNSCC-Zellen *in vitro* zu evaluieren. Dabei sollten eine verbesserte Sensitivität gegenüber CDKI durch die Kombination mit zytostatischen Substanzen sowie Unterschiede zwischen simultaner und metronomischer Substanzgabe im Mittelpunkt der Untersuchung stehen. Neben den klinisch etablierten Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin wurden die selektiven CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Abemaciclib sowie der global wirkende CDKI Dinaciclib in die Untersuchungen eingeschlossen. Dafür wurden Zellkulturversuche an vier HNSCC-Zelllinien aus verschiedenen Ursprungsregionen durchgeführt und der Einfluss einzelner Therapien sowohl auf Biomasse, Phänotyp und Zytotoxizität evaluiert.

Die erhobenen Befunde spiegeln die Heterogenität dieser Tumorentität wider. Im Rahmen der initialen Responsivitätsanalyse wurde zunächst ein zelllinienspezifisches Therapieansprechen sowohl auf Zytostatika als auch auf die CDKI und die Bestrahlung nachgewiesen. Alle Zelllinien waren jedoch grundsätzlich sensitiv gegenüber den Zytostatika. Demgegenüber konnte bei keiner der Zelllinien eine Strahlensensitivität detektiert werden. Bei den CDKI zeigten sich ebenfalls Unterschiede mit deutlich besserem Wirkverhalten des pan-CDKI Dinaciclib im Vergleich zu den beiden selektiven CDK4/6-Inhibitoren. In den weiterführenden Kombinationsversuchen mit Zytostatika und CDKI konnten bei zwei von vier Zelllinien synergistische Effekte und eine erhöhte Sensitivität gegenüber CDKI nachgewiesen werden. Hierbei stellten sich die Kombinationen von Palbociclib mit 5-FU bzw. Cisplatin als besonders effektiv heraus. Insgesamt war die simultane Substanzgabe der metronomischen überlegen.



Neben den grundlegenden zellbiologischen Methoden erfolgten zusätzlich funktionelle Analysen mittels Durchflusszytometrie, um die zugrunde liegenden Mechanismen näher zu untersuchen. Nach der CDKI-Behandlung wurde zunächst primär Apoptose nachgewiesen, die bei längerer Behandlung in eine Nekrose überging, einhergehend mit einer zunehmenden Anzahl an Zellen mit Sub-G1-Peak-DNA-Gehalt. Zusätzlich wurde in residualen Zellen ein G0/G1-Arrest detektiert sowie vermehrt Autophagie. Im Vergleich zu den Zytostatika induzierten die CDKI deutlich ausgeprägter einen immunogenen Zelltod, ersichtlich durch erhöhte Translokation von Calreticulin an die Zelloberfläche und verstärkte zytotoxische Aktivität nach allogener Zellkultur mit peripheren mononukleären Zellen des Blutes.

Zusammenfassend lassen unsere Ergebnisse den Schluss zu, dass CDKI vielversprechende Therapeutika für die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren darstellen, welche gut mit einer Chemotherapie kombiniert werden könnten, um ein verbessertes Therapieansprechen zu erzielen. Auf Grundlage unserer *in vitro*-Ergebnisse sollten im nächsten Schritt die Kombinationstherapien, die synergistische Effekte zeigten, im *in vivo*-Xenograft-Modell untersucht werden.

## 7 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 1: Kennzeichen der Tumorgenese von HNSCC.....                                                                                                           | 4   |
| Abbildung 2: Zellzyklusregulation in HNSCC.....                                                                                                                   | 6   |
| Abbildung 3: PI3K-AKT-Signalweg.....                                                                                                                              | 7   |
| Abbildung 4: Wirkmechanismus selektiver CDK4/6-Inhibitoren.....                                                                                                   | 11  |
| Abbildung 5: Wirkmechanismus des CDKI Dinaciclib.....                                                                                                             | 12  |
| Abbildung 6: Einfluss von 5-FU auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                                           | 39  |
| Abbildung 7: Einfluss von Cisplatin auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                                      | 40  |
| Abbildung 8: Einfluss von Gemcitabin auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                                     | 41  |
| Abbildung 9: Einfluss von $\gamma$ -Strahlung auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                            | 42  |
| Abbildung 10: Einfluss von 5-FU auf die $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme von HNSCC-Zellen.....                                                                       | 44  |
| Abbildung 11: Einfluss von Palbociclib auf die $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme von HNSCC-Zellen.....                                                                | 44  |
| Abbildung 12: Western Blot-Analyse der Proteinexpression von pAKT und AKT.....                                                                                    | 45  |
| Abbildung 13: Mikroskopische Darstellung von Detroit 562-Zellen nach Behandlung mit CDKI<br>und Kristallviolett-färbung.....                                      | 45  |
| Abbildung 14: Einfluss von Palbociclib auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                                   | 46  |
| Abbildung 15: Einfluss von Abemaciclib auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                                   | 47  |
| Abbildung 16: Einfluss von Dinaciclib auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                                    | 48  |
| Abbildung 17: Einfluss der Kombinationstherapie mit Cisplatin und CDKI auf die Biomasse von<br>FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.....                                   | 51  |
| Abbildung 18: <i>Scratch Assay</i> von CAL-33-Zellen bei Mono- bzw. simultaner Kombinations-<br>therapie mit Zytostatika und CDKI.....                            | 52  |
| Abbildung 19: Western Blot-Analyse der Proteinexpression von CDK2/4/6/7/9 an CAL-33- und<br>Detroit 562-Zellen nach der Behandlung mit Zytostatika bzw. CDKI..... | 53  |
| Abbildung 20: Acridinorangefärbung zum Nachweis von Autophagie nach Monotherapie mit<br>Zytostatika bzw. CDKI.....                                                | 55  |
| Abbildung 21: Einfluss von Zytostatika und CDKI auf den Phänotyp von CAL-33- und<br>Detroit 562-Zellen.....                                                       | 57  |
| Abbildung 22: Repräsentative DotPlots der durchflusszytometrischen Apoptose- / .....                                                                              | 59  |
| Abbildung 23: Quantitative Apoptose- / Nekrosebestimmung von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                                  | 60  |
| Abbildung 24: Quantitative Zellzyklusanalyse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.....                                                                              | 62  |
| Abbildung 25: Quantitativer Nachweis von Calreticulin bei CAL-33- und Detroit 562-.....                                                                           | 63  |
| Abbildung 26: Ko-Kultur von CAL-33- und Detroit 562-Zellen mit PBMC.....                                                                                          | 64  |
| Abbildung 27: Einfluss von 5-FU auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.....                                                                             | VI  |
| Abbildung 28: Einfluss von Cisplatin auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.....                                                                        | VI  |
| Abbildung 29: Einfluss von Gemcitabin auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.....                                                                       | VII |



|                                                                                                                                             |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Abbildung 30: Einfluss von $\gamma$ -Strahlung auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen. ....                                       | VII  |
| Abbildung 31: Einfluss von Palbociclib auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen. ....                                               | VIII |
| Abbildung 32: Einfluss von Abemaciclib auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen. ....                                               | VIII |
| Abbildung 33: Einfluss von Dinaciclib auf die Biomasse FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen. ....                                                    | IX   |
| Abbildung 34: Einfluss der Kombinationstherapie mit 5-FU und CDKI auf die Biomasse von<br>CAL-33- und Detroit 562-Zellen. ....              | IX   |
| Abbildung 35: Einfluss der Kombinationstherapie mit 5-FU und CDKI auf die Biomasse von<br>FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen. ....                 | X    |
| Abbildung 36: Einfluss der Kombinationstherapie mit Cisplatin und CDKI auf die Biomasse von<br>CAL-33- und Detroit 562-Zellen. ....         | X    |
| Abbildung 37: Einfluss der Kombinationstherapie mit Cisplatin und CDKI auf die Biomasse von<br>FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen. ....            | XI   |
| Abbildung 38: Einfluss der Kombinationstherapie mit Gemcitabin und CDKI auf die Biomasse<br>von CAL-33- und Detroit 562-Zellen. ....        | XI   |
| Abbildung 39: Einfluss der Kombinationstherapie mit Gemcitabin und CDKI auf die Biomasse<br>von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen. ....           | XII  |
| Abbildung 40: Einfluss der Kombinationstherapie mit Dinaciclib und Palbociclib auf die<br>Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen. .... | XII  |
| Abbildung 41: Einfluss der Kombinationstherapie mit Dinaciclib und Palbociclib auf die<br>Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen. ....    | XIII |
| Abbildung 42: Einfluss von Zytostatika und CDKI auf den Phänotyp von FaDu- und<br>PE/CA-PJ15-Zellen. ....                                   | XIII |

## 8 Tabellenverzeichnis

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Charakteristika der untersuchten HNSCC-Zelllinien. ....                  | 22 |
| Tabelle 2: Konzentrationen der CDKI zur Behandlung der HNSCC-Zellen. ....           | 26 |
| Tabelle 3: Konzentrationen für die Kombinationsbehandlung mit zwei Substanzen. .... | 26 |
| Tabelle 4: Konzentrationen für die Untersuchung des Phänotyps. ....                 | 29 |
| Tabelle 5: Konzentrationen für die funktionellen Analysen. ....                     | 30 |
| Tabelle 6: Antikörper für Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot. ....  | 36 |
| Tabelle 7: IC <sub>50</sub> -Werte der Behandlung mit Zytostatika. ....             | 42 |
| Tabelle 8: LD <sub>50</sub> -Werte der Behandlung mit $\gamma$ -Strahlung. ....     | 43 |
| Tabelle 9: IC <sub>50</sub> -Werte der Behandlung mit CDKI. ....                    | 49 |
| Tabelle 10: CI der Kombinationsbehandlungen mit Zytostatika und CDKI. ....          | 50 |

## 9 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; 144(8):1941–53. doi: 10.1002/ijc.31937.
2. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) Im Robert Koch-Institut (2019). Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten, verfügbare Diagnosejahre bis 2016. Version: Epi2018\_1. doi: 10.18444/5.03.01.0005.0014.0001.
3. Wienecke A, Kraywinkel K. Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Onkologie* 25:190–200 (2019). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00761-019-0534-0> [Stand 05.07.2020].
4. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. doi: 10.17886/rkipubl-2016-014.
5. European Union (2020) ECIS - European Cancer Information System. Verfügbar unter: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/> [Stand: 30.03.2020].
6. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem* 2016; 117(12):2682–92. doi: 10.1002/jcb.25592.
7. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(1):9–22. doi: 10.1038/nrc2982.
8. Shah AA, Jeffus SK, Stelow EB. Squamous cell carcinoma variants of the upper aerodigestive tract: a comprehensive review with a focus on genetic alterations. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(6):731–44. doi: 10.5858/arpa.2013-0070-RA.
9. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2018; 18(5):269–82. doi: 10.1038/nrc.2018.11.
10. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5:F34–54. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.070.
11. Chaturvedi AK. Epidemiology and Clinical Aspects of HPV in Head and Neck Cancers. *Head Neck Pathol* 2012; 6(Suppl 1):16–24. doi: 10.1007/s12105-012-0377-0.
12. El-Mofty SK. HPV-Related Squamous Cell Carcinoma Variants in the Head and Neck. *Head Neck Pathol* 2012; 6(Suppl 1):55–62. doi: 10.1007/s12105-012-0363-6.



13. Denaro N, Russi EG, Merlano MC. Pros and Cons of the New Edition of TNM Classification of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* 2018; 95(4):202–10. doi: 10.1159/000490415.
14. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(4):261–9. doi: 10.1093/jnci/djn011.
15. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated Head and Neck Cancer: A Virus-related Cancer Epidemic – A Review of Epidemiology, Biology, Virus Detection and Issues in Management. *Lancet Oncol* 2010; 11(8):781–9. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6.
16. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2016; 91(3):386–96. doi: 10.1016/j.mayocp.2015.12.017.
17. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 2011; 333(6046):1154–7. doi: 10.1126/science.1206923.
18. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015; 517(7536):576–82. doi: 10.1038/nature14129.
19. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011; 333(6046):1157–60. doi: 10.1126/science.1208130.
20. Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM et al. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov* 2013; 3(7):770–81. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0537.
21. Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(6):1951–7. doi: 10.1172/JCI59889.
22. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56(11):2488–92. PMID: 8653682.
23. Toledo L, Neelsen KJ, Lukas J. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Mol Cell* 2017; 66(6):735–49. PMID: 28622519. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.001.

24. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(10):749–58. doi: 10.1038/nrc2723.
25. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer; 2014, S. 650.
26. Jung K, Kang H, Mehra R. Targeting phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Cancers Head Neck* 2018; 3. doi: 10.1186/s41199-018-0030-z.
27. Lee JY, Engelman JA, Cantley LC. Biochemistry. PI3K charges ahead. *Science* 2007; 317(5835):206–7. doi: 10.1126/science.1146073.
28. Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(10):760–8. doi: 10.1038/35096067.
29. Goerner M, Seiwert TY, Sudhoff H. Molecular targeted therapies in head and neck cancer - An update of recent developments -. *Head Neck Oncol* 2010; 2:8. doi: 10.1186/1758-3284-2-8.
30. Szabó B, Nelhubel GA, Kárpáti A, Kenessey I, Jóri B, Székely C et al. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2011; 47(6):487–96. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.03.020.
31. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(17):2666–72. doi: 10.1200/JCO.2005.04.8306.
32. Bossi P, Resteghini C, Paielli N, Licitra L, Pilotti S, Perrone F. Prognostic and predictive value of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(45):74362–79. doi: 10.18632/oncotarget.11413.
33. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3(9):802–8. doi: 10.1038/ncb0901-802.
34. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013; 502(7471):333–9. doi: 10.1038/nature12634.
35. Pérez Sayáns M, Chamorro Petronacci CM, Lorenzo Pouso AI, Padín Iruegas E, Blanco Carrión A, Suárez Peñaranda JM et al. Comprehensive Genomic Review of TCGA Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC). *J Clin Med* 2019; 8(11). doi: 10.3390/jcm8111896.



36. Lee MJ, Jin N, Grandis JR, Johnson DE. Alterations and molecular targeting of the GSK-3 regulator, PI3K, in head and neck cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2020; 1867(6):118679. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118679.
37. Lui VWY, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov* 2013; 3(7):761–9. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0103.
38. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(4):489–501. doi: 10.4065/83.4.489.
39. Pfister DG, Ang K-K, Brizel DM, Burtneess BA, Busse PM, Caudell JJ et al. Head and neck cancers, version 2.2013. Featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11(8):917–23. doi: 10.6004/jnccn.2013.0113.
40. Stafford M, Kaczmar J. The neoadjuvant paradigm reinvigorated: a review of pre-surgical immunotherapy in HNSCC. *Cancers Head Neck* 2020; 5:4. doi: 10.1186/s41199-020-00052-8.
41. Gan SJ, Dahlstrom KR, Peck BW, Caywood W, Li G, Wei Q et al. Incidence and Pattern of Second Primary Malignancies in Patients with Index Oropharyngeal Cancers versus Index Non-oropharyngeal Head and Neck Cancers. *Cancer* 2013; 119(14):2593–601. doi: 10.1002/cncr.28107.
42. Therapie von Kopf-Hals-Tumoren - Deutsche Krebsgesellschaft. Verfügbar unter: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/kopf-hals-tumoren/therapie.html> [Stand: 23.04.2020].
43. Dr. Isabelle Viktoria Maucher. Gemcitabin. Medizinische Medien Informations GmbH 09.09.2019. Verfügbar unter: [https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Gemcitabin\\_26090](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Gemcitabin_26090) [Stand: 28.01.21].
44. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5):330–8. doi: 10.1038/nrc1074.
45. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(11):1116–27. doi: 10.1056/NEJMoa0802656.
46. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(8-9):1229–35. doi: 10.1007/pl00000762.
47. Stamatiadis-Smidt H, zur Hausen H. Taxane. In: Stamatiadis-Smidt H, zur Hausen H, Hrsg. *Thema Krebs*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998. S. 297–9.

48. Lee YS, Johnson DE, Grandis JR. An update: emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. *Expert Opin Emerg Drugs* 2018; 23(4):283–99. doi: 10.1080/14728214.2018.1543400.
49. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354(6):567–78. doi: 10.1056/NEJMoa053422.
50. Leblanc O, Vacher S, Lecerf C, Jeannot E, Klijanienko J, Berger F et al. Biomarkers of cetuximab resistance in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Med* 2020; 17(1):208–17. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0153.
51. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* 2014; 15(6):122. doi: 10.1186/gb4184.
52. Roskoski R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacol Res* 2016; 107:249–75. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.012.
53. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298(5600):1912–34. doi: 10.1126/science.1075762.
54. Peyressatre M, Prével C, Pellerano M, Morris MC. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers (Basel)* 2015; 7(1):179–237. doi: 10.3390/cancers7010179.
55. Camelia Billard-Sandu, Yun-Gan Tao, Marie-Paule Sablin, Gabriela Dumitrescu, David Billard, Eric Deutsch. CDK4/6 inhibitors in P16/HPV16-negative squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020; 277(5):1273–80. doi: 10.1007/s00405-020-05891-2.
56. Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst, Deutsches. Erster Cdk4/6-Hemmer in Europa zugelassen. Krebsinformationsdienst 18.11.2016. Verfügbar unter: <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2016/fk33-zulassung-palbociclib.php> [Stand: 26.04.2020].
57. ClinicalTrials.gov; 2020.000Z. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/> [Stand: 30.04.2020].
58. Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst, Deutsches. Abemaciclib: Dritter Cdk4/6-Hemmer in Europa zugelassen. Krebsinformationsdienst 08.10.2018. Verfügbar unter: <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2018/fk23-abemaciclib-brustkrebs-zulassung-europa.php> [Stand: 26.04.2020].



59. Ku BM, Yi SY, Koh J, Bae Y-H, Sun J-M, Lee S-h et al. The CDK4/6 inhibitor LY2835219 has potent activity in combination with mTOR inhibitor in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(12):14803–13. doi: 10.18632/oncotarget.7543.
60. bioRENDER; 2020.000Z. Verfügbar unter: <https://biorender.com> [Stand: 01.05.2020].
61. Dinaciclib (SCH727965) | ≥99%(HPLC) | Selleck | CDK inhibitor. Verfügbar unter: <https://www.selleckchem.com/products/dinaciclib-sch727965.html> [Stand: 26.04.2020].
62. Malumbres M, Pevarello P, Barbacid M, Bischoff JR. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29(1):16–21. doi: 10.1016/j.tips.2007.10.012.
63. Schulte A, Czudnochowski N, Schönichen A, Geyer M. Die Regulation der Transkription: Forschungsbericht (importiert) 2008 - Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie. Verfügbar unter: [https://www.mpi-dortmund.mpg.de/5449/research\\_report\\_364497?c=3559281](https://www.mpi-dortmund.mpg.de/5449/research_report_364497?c=3559281) [Stand: 08.06.2020].
64. Leibniz Institute DSMZ. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details; 2019. Verfügbar unter: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-447> [Stand: 09.09.2019].
65. CLS Cell Lines Service GmbH. Detroit-562 - CLS Online Shop; 2019. Verfügbar unter: <https://clsgmbh.de/artikeldet.php?proid=754&sid=8623d536e1106cf5a47461b5d8fa2a3e> [Stand: 09.09.2019].
66. Leibniz Institute DSMZ. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details; 2019. Verfügbar unter: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-784> [Stand: 09.09.2019].
67. Sigma-Aldrich. PE/CA-PJ15 CB\_96121230; 2019. Verfügbar unter: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_96121230?lang=de&region=DE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_96121230?lang=de&region=DE) [Stand: 09.09.2019].
68. Schmitz S. Der Experimentator: Zellkultur. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011, S. 206. (Experimentator).
69. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016(4):pdb.prot087379. doi: 10.1101/pdb.prot087379.
70. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 1986; 159(1):109–13. doi: 10.1016/0003-2697(86)90314-3.
71. Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 1989; 182(1):16–9. doi: 10.1016/0003-2697(89)90710-0.

72. Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol* 1979; 6(5):371–88. doi: 10.1002/ana.410060502.
73. Laubenbacher C, Saumweber D, Wagner-Manslau C, Kau RJ, Herz M, Avril N et al. Comparison of fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET, MRI and endoscopy for staging head and neck squamous-cell carcinomas. *J Nucl Med* 1995; 36(10):1747–57. PMID: 7562038.
74. Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect* 2015; 3(3):e00149. doi: 10.1002/prp2.149.
75. Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Prinzip der Durchflußzytometrie- facs. Verfügbar unter: <https://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflussszytometrie/prinzip-der-durchflussszytometrie.html> [Stand: 26.11.2029].
76. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum; 2014, S. 74-77. (Experimentator).
77. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4):495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.
78. Bustin M. At the crossroads of necrosis and apoptosis: signaling to multiple cellular targets by HMGB1. *Sci STKE* 2002; 2002(151):pe39. doi: 10.1126/stke.2002.151.pe39.
79. Thermo Fisher Scientific. eBioscience™ Propidium Iodide. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/BMS500PI> [Stand: 30.11.2019].
80. Thermo Fisher Scientific. YO-PRO™-1 Iodide (491/509). Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Y3603> [Stand: 30.11.2019].
81. Horn F, Armbruster M, Dospil A. Zellzyklus und Apoptose. In: *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 4., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009, S. 252-258.
82. Thermo Fisher Scientific. Calreticulin Antibody (PA3-900). Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Calreticulin-Antibody-Polyclonal/PA3-900> [Stand: 02.12.2019].
83. Paquet M-E, Leach MR, Williams DB. In vitro and in vivo assays to assess the functions of calnexin and calreticulin in ER protein folding and quality control. *Methods* 2005; 35(4):338–47. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.10.005.



84. Traganos F, Darzynkiewicz Z. Lysosomal Proton Pump Activity: Supravital Cell Staining with Acridine Orange Differentiates Leukocyte Subpopulations; 41:185–94. doi: 10.1016/S0091-679X(08)61717-3.
85. Thermo Fisher Scientific. Calcein, AM, cell-permeant dye. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C1430?SID=srch-srp-C1430#/C1430?SID=srch-srp-C1430> [Stand: 30.11.2019].
86. Blanchard P, Baujat B, Holostenco V, Bourredjem A, Baey C, Bourhis J et al. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiother Oncol* 2011; 100(1):33–40. doi: 10.1016/j.radonc.2011.05.036.
87. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000; 355(9208):949–55. PMID: 10768432.
88. Friesland S, Tsakonas G, Kristensen C, Herlestam Calero Moren M, Haugen H, Soderstrom K et al. Randomised phase II study with cetuximab in combination with 5-FU and cisplatin or carboplatin versus cetuximab in combination with paclitaxel and carboplatin for treatment of patients with relapsed or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CETMET trial). *JCO* 2018; 36(15\_suppl):6032. doi: 10.1200/JCO.2018.36.15\_suppl.6032.
89. Schüttrumpf L, Marschner S, Scheu K, Hess J, Rietzler S, Walch A et al. Definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell cancers of the head and neck - results from an unselected cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiat Oncol* 2020; 15(1):7. doi: 10.1186/s13014-019-1452-4.
90. Matijević T, Kirinec G, Pavelić J. Antitumor activity from the combined application of poly(I:C) and chemotherapeutics in human metastatic pharyngeal cell lines. *Chemotherapy* 2011; 57(6):460–7. doi: 10.1159/000334122.
91. Ma J, Lu S, Yu L, Tian J, Li J, Wang H et al. FaDu cell characteristics induced by multidrug resistance. *Oncol Rep* 2011; 26(5):1189–95. doi: 10.3892/or.2011.1418.
92. Wustrow TP, Raffael A, Valet G. Multiparametric flow cytometry of human squamous cell carcinoma lines from the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 98(6):552–7. doi: 10.1177/019459988809800603.

93. Pignon J-P, Le Maître A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009; 92(1):4–14. doi: 10.1016/j.radonc.2009.04.014.
94. Scherer E, Sack H, Hrsg. *Strahlentherapie: Radiologische Onkologie*. Vierte, völlig neu bearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996, S. 124.
95. Denekamp J. Cell kinetics and radiation biology. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986; 49(2):357–80. doi: 10.1080/09553008514552591.
96. Hagen KR, Zeng X, Lee M-Y, Tucker Kahn S, Harrison Pitner MK, Zaky SS et al. Silencing CDK4 radiosensitizes breast cancer cells by promoting apoptosis. *Cell Div* 2013; 8(1):10. doi: 10.1186/1747-1028-8-10.
97. Becker J, Schwarzenböck SM, Krause BJ. FDG PET Hybrid Imaging. *Recent Results Cancer Res* 2020; 216:625–67. doi: 10.1007/978-3-030-42618-7\_19.
98. Dittmann H, Dohmen BM, Kehlbach R, Bartusek G, Pritzkow M, Sarbia M et al. Early changes in 18FFLT uptake after chemotherapy: an experimental study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29(11):1462–9. doi: 10.1007/s00259-002-0925-z.
99. Suttie SA, Park KGM, Smith TAD. 18F2-fluoro-2-deoxy-D-glucose incorporation by AGS gastric adenocarcinoma cells in vitro during response to epirubicin, cisplatin and 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 2007; 97(7):902–9. doi: 10.1038/sj.bjc.6603971.
100. Basu S, Alavi A. Defining co-related parameters between 'metabolic' flare and 'clinical', 'biochemical', and 'osteoblastic' flare and establishing guidelines for assessing response to treatment in cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34(4):441–3. doi: 10.1007/s00259-006-0264-6.
101. Fujibayashi Y, Waki A, Sakahara H, Konishi J, Yonekura Y, Ishii Y et al. Transient increase in glycolytic metabolism in cultured tumor cells immediately after exposure to ionizing radiation: from gene expression to deoxyglucose uptake. *Radiat Res* 1997; 147(6):729–74. PMID: 9189172.
102. Taralli S, Lorusso M, Scolozzi V, Masiello V, Marazzi F, Calcagni ML. Response evaluation with 18F-FDG PET/CT in metastatic breast cancer patients treated with Palbociclib: first experience in clinical practice. *Ann Nucl Med* 2019; 33(3):193–200. doi: 10.1007/s12149-018-01323-8.
103. Horn D, Hess J, Freier K, Hoffmann J, Freudlsperger C. Targeting EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 2015; 19(6):795–805. doi: 10.1517/14728222.2015.1012157.



104. Marquard FE, Jücker M. PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer. *Biochem Pharmacol* 2020; 172:113729. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113729.
105. Ku BM, Yi SY, Koh J, Bae Y-H, Sun J-M, Lee S-h et al. The CDK4/6 inhibitor LY2835219 has potent activity in combination with mTOR inhibitor in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(12):14803–13. doi: 10.18632/oncotarget.7543.
106. Gong X, Litchfield LM, Webster Y, Chio L-C, Wong SS, Stewart TR et al. Genomic Aberrations that Activate D-type Cyclins Are Associated with Enhanced Sensitivity to the CDK4 and CDK6 Inhibitor Abemaciclib. *Cancer Cell* 2017; 32(6):761-776.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2017.11.006.
107. Wright P, Kelsall J, Healing G, Sanderson J. Differential expression of cyclin-dependent kinases in the adult human retina in relation to CDK inhibitor retinotoxicity. *Arch Toxicol* 2019; 93(3):659–71. doi: 10.1007/s00204-018-2376-8.
108. Müller T, Braun M, Dietrich D, Aktekin S, Höft S, Kristiansen G et al. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(32):52889–900. doi: 10.18632/oncotarget.17547.
109. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 2015; 33(17):1974–82. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4358.
110. Lowe NM, Kershaw LE, Bernstein JM, Withey SB, Mais K, Homer JJ et al. Pre-treatment tumour perfusion parameters and initial RECIST response do not predict long-term survival outcomes for patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with induction chemotherapy. *PLoS ONE* 2018; 13(3):e0194841. doi: 10.1371/journal.pone.0194841.
111. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016; 375(19):1856–67. doi: 10.1056/NEJMoa1602252.
112. Moskovitz J, Moy J, Ferris RL. Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2018; 20(2):22. doi: 10.1007/s11912-018-0654-5.
113. Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D et al. Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(8):2344–53. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0324.
114. Paruch K, Dwyer MP, Alvarez C, Brown C, Chan T-Y, Doll RJ et al. Discovery of Dinaciclib (SCH 727965): A Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases. *ACS Med Chem Lett* 2010; 1(5):204–8. doi: 10.1021/ml100051d.

115. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6(4):463–77. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00099-1.
116. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1):27–42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
117. Wagener C, Müller O. Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen. 3., komplett aktualisierte und erweiterte Auflage. s.l.: Thieme; 2010, S. 190-191.
118. Jiang H, Martin V, Gomez-Manzano C, Johnson DG, Alonso M, White E et al. The RB-E2F1 pathway regulates autophagy. *Cancer Res* 2010; 70(20):7882–93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1604.
119. Oehler R. Die Immunogenität des Zelltodes. *Spectrum Onkologie* 2018; (8/2018). Verfügbar unter: <https://www.medmedia.at/spectrum-onkologie/die-immunogenitaet-des-zelltodes/> [Stand: 14.05.2020].
120. Hossain DMS, Javaid S, Cai M, Zhang C, Sawant A, Hinton M et al. Dinaciclib induces immunogenic cell death and enhances anti-PD1-mediated tumor suppression. *J. Clin. Invest.*; 128(2):644–54. doi: 10.1172/JCI94586.
121. Ke C, Hou H, Li J, Su K, Huang C, Lin Y et al. Extracellular Vesicle Delivery of TRAIL Eradicates Resistant Tumor Growth in Combination With CDK Inhibition by Dinaciclib. *Cancers (Basel)* 2020; 12(5). doi: 10.3390/cancers12051157.



## 10 Anhang

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung           | Bedeutung                                                                      |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <sup>18</sup> F-FDG | <sup>18</sup> F-Fluordesoxyglukose                                             |
| 5-FU                | 5-Fluoruracil                                                                  |
| APC                 | Allophycocyanin                                                                |
| CDK                 | Cyclin-abhängige-Kinase ( <i>Cyclin-dependent kinase</i> )                     |
| CDKI                | Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor ( <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i> ) |
| CDKN2A              | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>                                    |
| CFDA                | 5-(and-6-)-Carboxyfluorescein diacetatesuccinimidyl ester                      |
| CI                  | Kombinationsindex ( <i>combination index</i> )                                 |
| CNV                 | Kopienzahlvariation ( <i>copy number variation</i> )                           |
| CT                  | Computertomographie                                                            |
| CTLA-4              | <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>                             |
| DMSO                | Dimethylsulfoxid                                                               |
| ECOG                | <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>                                      |
| EDTA                | Ethylendiamintetraacetat                                                       |
| EGFR                | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>                                        |
| FACS                | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>                                     |
| FBS                 | Fetales Kälberserum ( <i>Fetal bovine serum</i> )                              |
| FITC                | Fluoresceinisothiocyanat                                                       |
| GAPDH               | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                                       |
| GSK3β               | Glykogensynthasekinase 3β                                                      |

|                        |                                                                                           |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Gy</b>              | Gray                                                                                      |
| <b>HNSCC</b>           | <i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>                                              |
| <b>HPV</b>             | Humanes Papillomvirus                                                                     |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | Mittlere inhibitorische Konzentration<br>( <i>half-maximal inhibitory concentration</i> ) |
| <b>LD<sub>50</sub></b> | Mittlere letale Dosis                                                                     |
| <b>MRT</b>             | Magnetresonanztomographie                                                                 |
| <b>NaOH</b>            | Natriumhydroxid                                                                           |
| <b>NOTCH1</b>          | Notch-Homolog 1                                                                           |
| <b>PBMC</b>            | Periphere mononukleäre Zellen des Blutes<br>( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ) |
| <b>PBS</b>             | <i>phosphate buffered saline</i>                                                          |
| <b>PBST</b>            | <i>phosphate buffered saline with Tween<sup>®</sup> 20</i>                                |
| <b>PDK1</b>            | Phospholipid-abhängige Kinase ( <i>Phospholipid-dependent kinase</i> )                    |
| <b>PD-L1</b>           | <i>Programmed cell death ligand 1</i>                                                     |
| <b>PE</b>              | Phycoerythrin                                                                             |
| <b>PET</b>             | Positronen-Emissions-Tomographie                                                          |
| <b>PI</b>              | Propidiumjodid                                                                            |
| <b>PI3K</b>            | Phosphatidylinositid-3-Kinase                                                             |
| <b>PIK3CA</b>          | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha                    |
| <b>PIP<sub>2</sub></b> | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat                                                      |
| <b>PIP<sub>3</sub></b> | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat                                                    |
| <b>PP-Röhrchen</b>     | Polypropylen-Röhrchen                                                                     |
| <b>PTEN</b>            | <i>Phosphatase and tensin homolog</i>                                                     |
| <b>PVDF</b>            | Polyvinylidenfluorid                                                                      |
| <b>RB</b>              | Retinoblastom-Protein                                                                     |



|                           |                                                                   |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>RIPA</b>               | <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>                      |
| <b>RT</b>                 | Raumtemperatur                                                    |
| <b>SD</b>                 | Standardabweichung                                                |
| <b>SDS</b>                | Natriumlaurylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )             |
| <b>STAT</b>               | <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>         |
| <b>TNM-Klassifikation</b> | <i>Tumour-node-metastasis classification of malignant tumours</i> |
| <b>TP53</b>               | Tumorsuppressorprotein p53                                        |
| <b>TRIS</b>               | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                                    |

## 10.2 Ergänzende Abbildungen und Materialien

### Untersuchung der Wachstumskinetik

Die ermittelte Verdopplungszeit (s. Tabelle 1) gehört zur basalen Charakterisierung einer Zelllinie und ist grundlegend für die Planung und Vorbereitung weiterer Experimente. Während die Zelllinien FaDu und PE/CA-PJ15 mit ca. 25 h eine ähnliche Verdopplungszeit aufweisen, ist die Verdopplungszeit der Zelllinie Detroit 562 *in vitro* mit etwa 59 h etwa doppelt so hoch. Bei der Zelllinie CAL-33 ergab sich eine Verdopplungszeit von 33 h.

### Herstellung von $^{18}\text{F}$ -FDG

$^{18}\text{F}$ -2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) wurde unter GMP-Bedingungen (*good manufacturing practice*) im Reinraum der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Rostock hergestellt. FDG ist der aktive Inhaltsstoff einer Citratgepufferten physiologischen Kochsalz-Injektionslösung.

Bei der Herstellung des FDG wird der Precursor, Mannosetriflat, mit  $^{18}\text{F}$ -Fluor zur Reaktion gebracht. Anschließend werden alle zunächst acetylgeschützten Hydroxidgruppen über eine alkalische Hydrolyse regeneriert.

Das, bei der Reaktion eingesetzte  $^{18}\text{F}$ -Fluor wird an dem hausinternen Zyklotron (PETrace, 9,6 MeV, GE Healthcare) durch Bestrahlung von  $^{18}\text{O}$ -Wasser mit Protonen erzeugt. In einer regulären Herstellung kommen 2,5 mL einer  $^{18}\text{F}$ -Fluorid-Lösung mit einer Gesamtaktivität von 30 GBq zum Einsatz. Der Herstellungsprozess unterliegt einer Ausbeute von etwa 66%, so dass das Endprodukt zum Herstellungsende durch eine minimale spezifische Aktivität von 400 GBq/mmol charakterisiert ist.

Die Synthese erfolgt PC-gesteuert mit Hilfe eines Synthesemoduls (FASTlab 2, GE Healthcare). Zu Beginn der Synthese wird das  $^{18}\text{F}$ -fluorhaltige  $^{18}\text{O}$ -Wasser in das Synthesemodul über eine Anionenaustauscherkartusche transferiert, so dass  $^{18}\text{F}$ -Fluor auf dieser zurückgehalten (getrappt) wird. Ein Gemisch aus Kryptofix und Kaliumcarbonat gelöst in einer Acetonitril-Wasser-Lösung dient zur Elution des  $^{18}\text{F}$ -Fluors in das Reaktionsgefäß. Dort wird dieses unter Unterdruck und einem schwachen Stickstoffstrom bei 125 °C für 9 min azeotrop getrocknet. Nach dem Trocknungsprozess wird in Acetonitril gelöstes Mannosetriflat in das Reaktionsgefäß zugeführt. Die nukleophile Substitution der Triflatgruppe durch  $^{18}\text{F}$ -Fluor erfolgt während weiterer 2,5 min unter 125 °C. Auf diese Weise bildet sich als Zwischenprodukt  $^{18}\text{F}$ -Fluorotetraacetylglucose (FTAG), welches mit Wasser versetzt über eine tC18-Kartusche geleitet wird. FTAG wird dabei auf der Kartusche

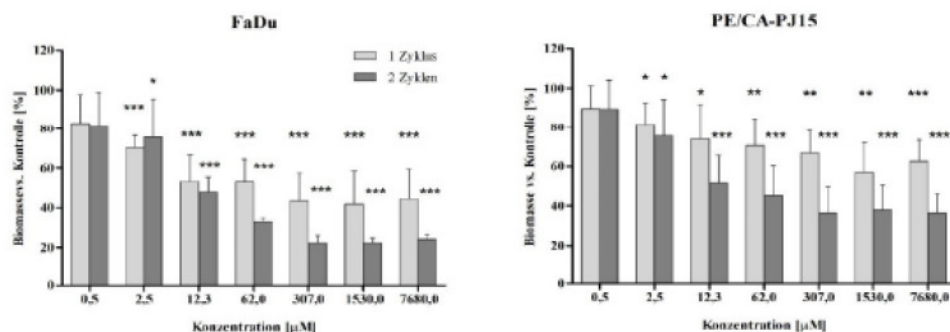


getrappt, während Verunreinigungen sowie Hilfsstoffe wie Kryptofix entfernt werden. Durch Spülen mit Wasser erfolgt eine Reinigung bevor anschließend während einer zweiminütigen Inkubation mit 2 M Natronlauge bei Raumtemperatur die Abspaltung der Acetylgruppen auf der Kartusche erfolgt. Dabei entsteht das Endprodukt  $^{18}\text{F}$ -FDG, welches mit der Natronlauge von der Kartusche eluiert wird. Durch Zugabe von Wasser und einem Citratpuffer wird die Natronlauge neutralisiert und ein leicht saurer pH eingestellt. Diese Lösung wird zur weiteren Reinigung zunächst über eine zweite tC18-Kartusche, auf der nur teilhydrolysiertes FTAG zurückgehalten wird, und anschließend zur Beseitigung von Spuren an verbliebenem  $^{18}\text{F}$ -Fluor über eine Aluminiumoxidkartusche geleitet.

*Übernommen von Dr. rer. nat. C. Bergner, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Rostock.*

## ***In vitro*-Chemoresponsivität**

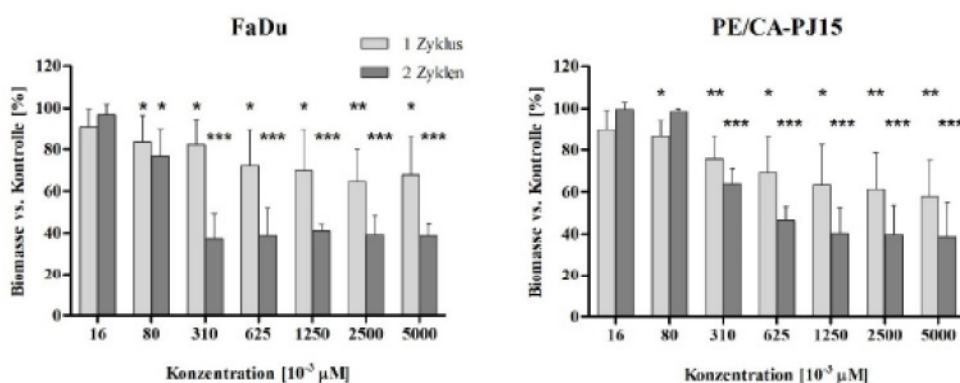
### **Behandlung der Zellen mit 5-FU**



**Abbildung 27: Einfluss von 5-FU auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung mit 5-FU erfolgte sowohl in einem Zyklus (72 h, hellgrau) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h, dunkelgrau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

### **Behandlung der Zellen mit Cisplatin**

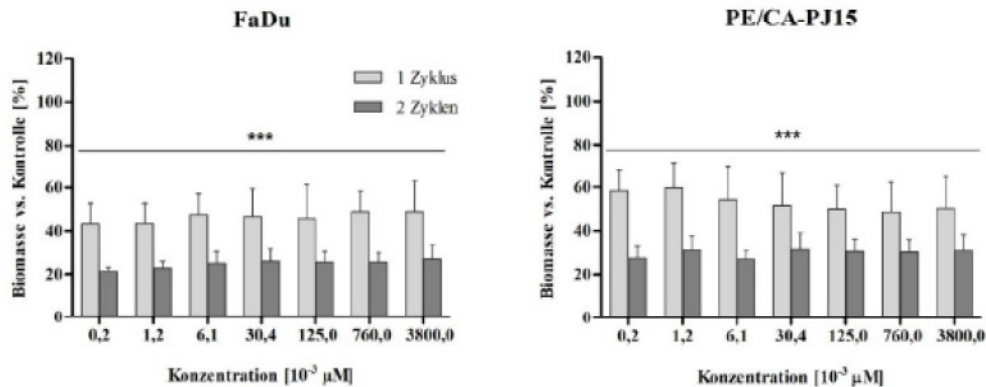


**Abbildung 28: Einfluss von Cisplatin auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung mit Cisplatin erfolgte sowohl in einem Zyklus (72 h, hellgrau) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h, dunkelgrau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.



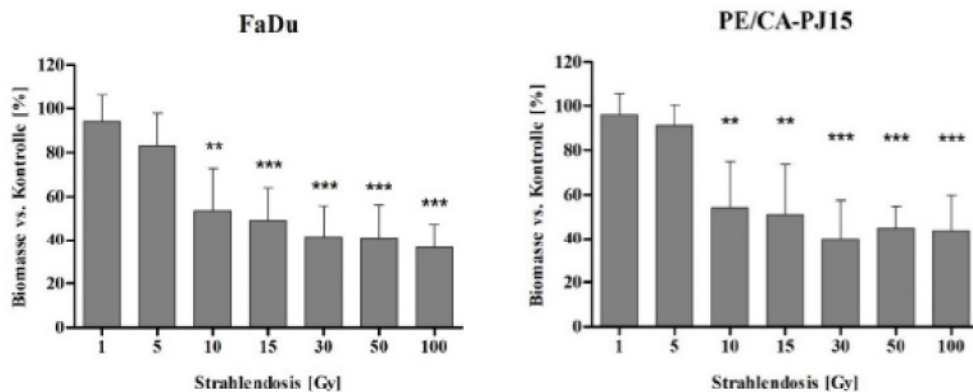
### Behandlung der Zellen mit Gemcitabin



**Abbildung 29: Einfluss von Gemcitabin auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung mit Gemcitabin erfolgte sowohl in einem Zyklus (72 h, hellgrau) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h, dunkelgrau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle wurden durch  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

### **Radiosensitivität**

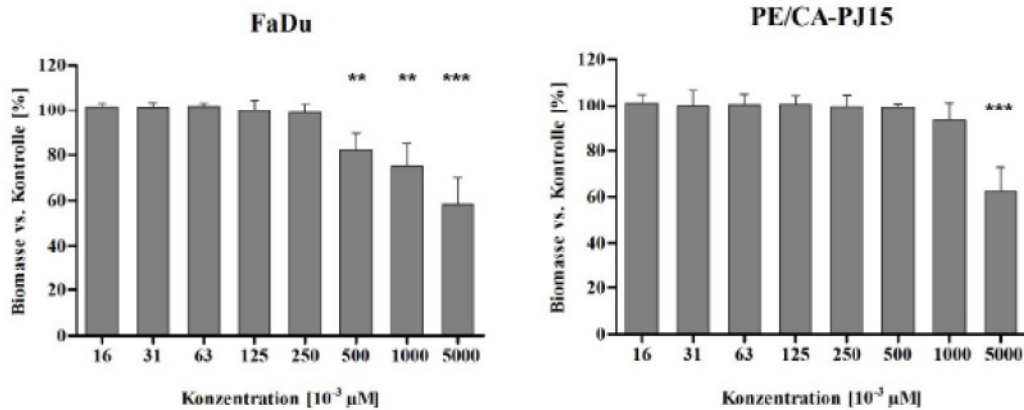


**Abbildung 30: Einfluss von  $\gamma$ -Strahlung auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Bestrahlung wurde mit  $\gamma$ -Strahlung in sieben Dosen durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 4$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbestrahlte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

## Zielgerichtete Therapie mit CDKI

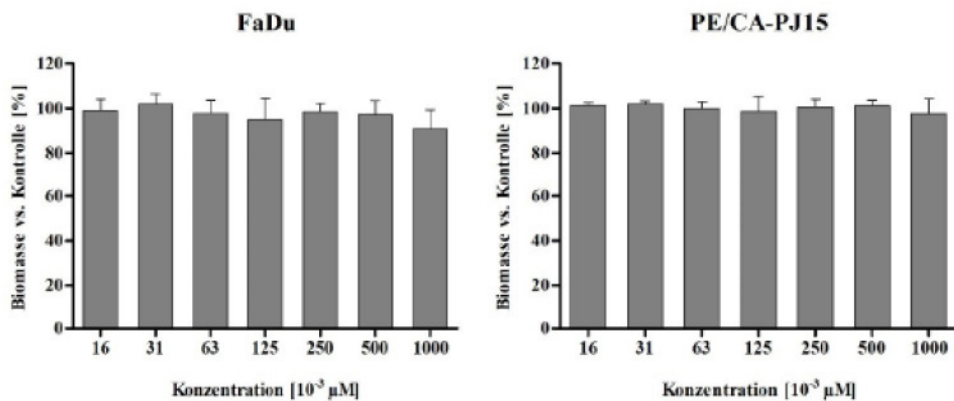
### Behandlung mit Palbociclib



**Abbildung 31: Einfluss von Palbociclib auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung mit Palbociclib erfolgte in zwei Zyklen (2 x 72 h). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sind durch  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

### Behandlung mit Abemaciclib

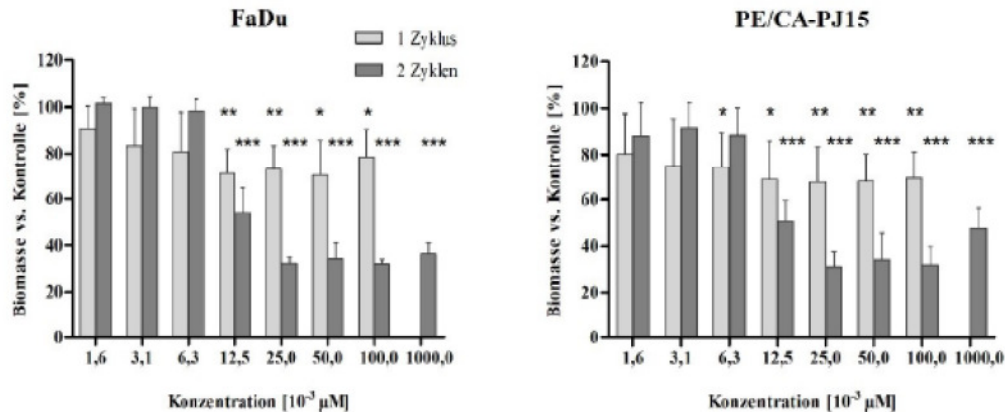


**Abbildung 32: Einfluss von Abemaciclib auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung mit Abemaciclib erfolgte in zwei Zyklen (2 x 72 h). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen).



### Behandlung mit Dinaciclib

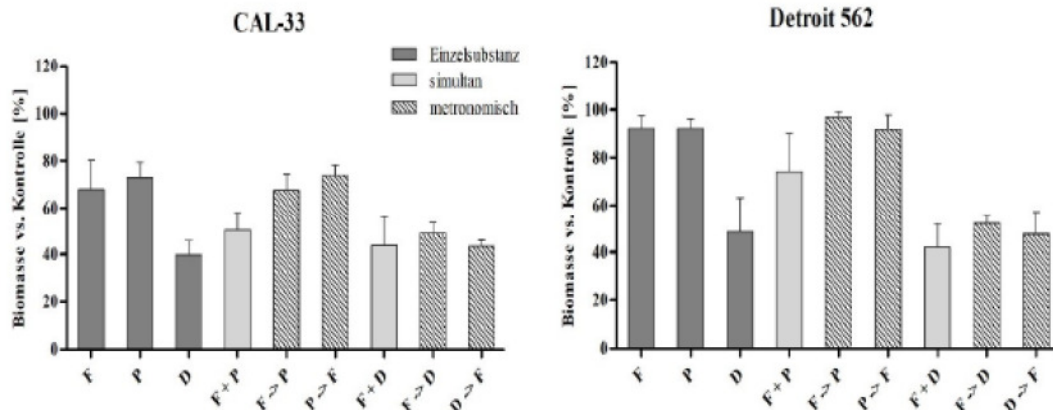


**Abbildung 33: Einfluss von Dinaciclib auf die Biomasse FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung mit Dinaciclib erfolgte sowohl in einem Zyklus (72 h, hellgrau) als auch in zwei Zyklen (2 x 72 h, dunkelgrau). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Die Signifikanzen gegenüber der Kontrolle wurden durch  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  und  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet.

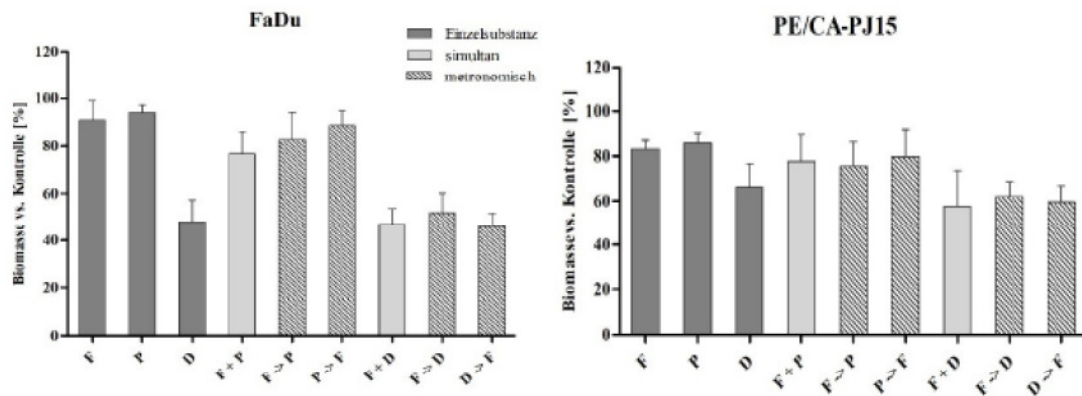
### Kombinationstherapie mit Zytostatika und CDKI – simultan vs. metronomisch

#### Kombination 5-FU und CDKI



**Abbildung 34: Einfluss der Kombinationstherapie mit 5-FU und CDKI auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

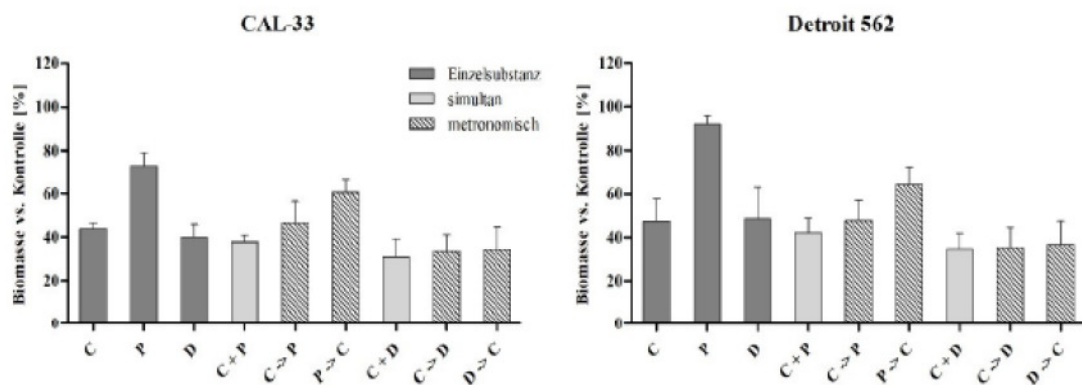
Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen 5-FU, Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung mit simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. F – 5-FU: 2460 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.



**Abbildung 35: Einfluss der Kombinationstherapie mit 5-FU und CDKI auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen 5-FU, Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung mit simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. F – 5-FU: 2460 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

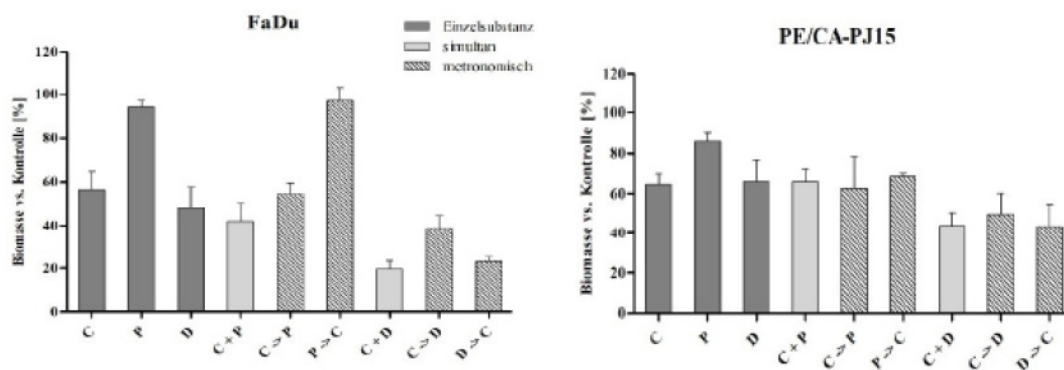
#### Kombination Cisplatin und CDKI



**Abbildung 36: Einfluss der Kombinationstherapie mit Cisplatin und CDKI auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen Cisplatin, Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung mit simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

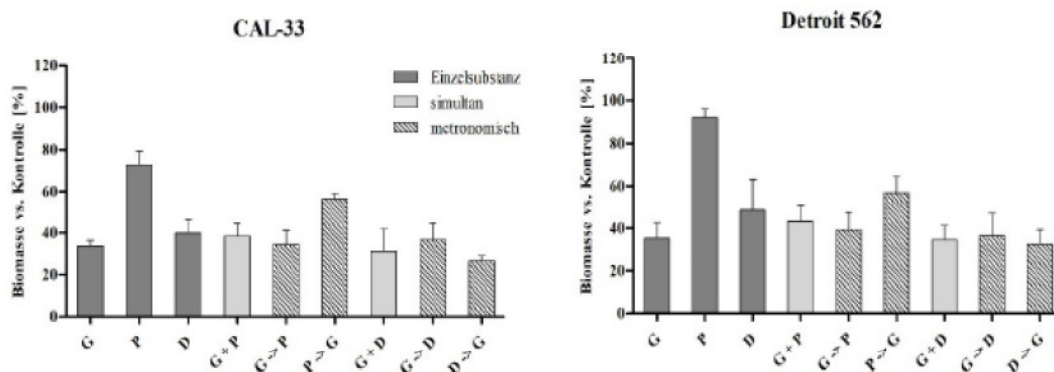




**Abbildung 37: Einfluss der Kombinationstherapie mit Cisplatin und CDKI auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

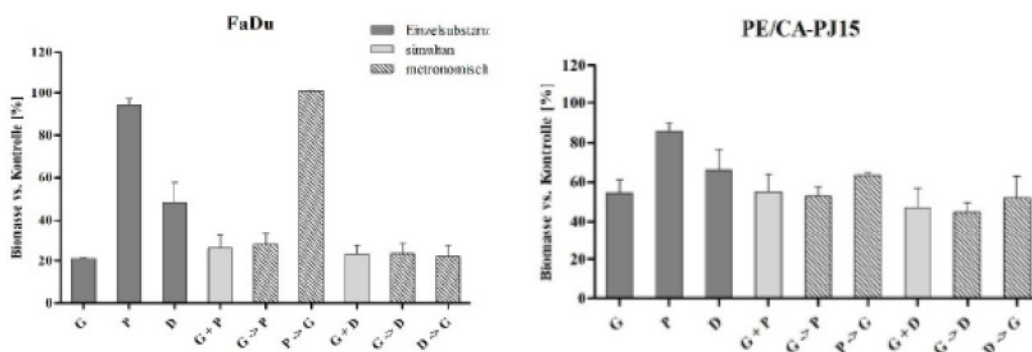
Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen Cisplatin, Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung mit simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

#### Kombination Gemcitabin und CDKI



**Abbildung 38: Einfluss der Kombinationstherapie mit Gemcitabin und CDKI auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

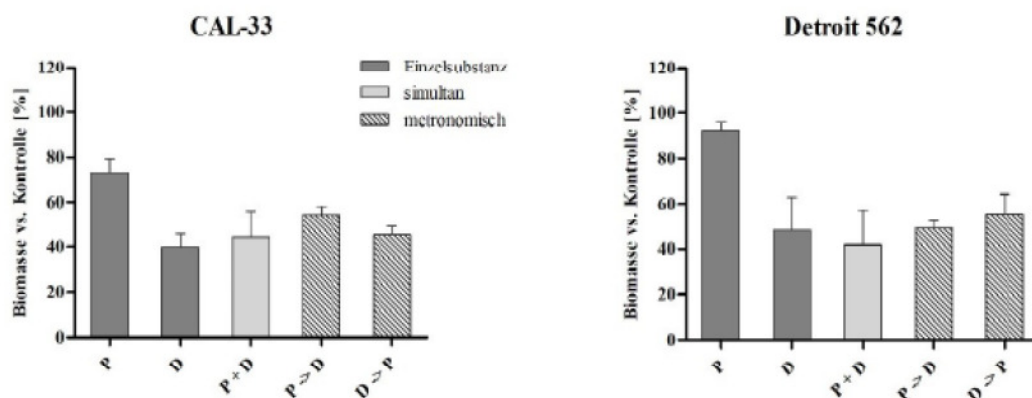
Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen Cisplatin, Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung mit simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. G – Gemcitabin: 0,12 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.



**Abbildung 39: Einfluss der Kombinationstherapie mit Gemcitabin und CDKI auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.**

Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen Cisplatin, Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung mit simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. G – Gemcitabin: 0,12 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

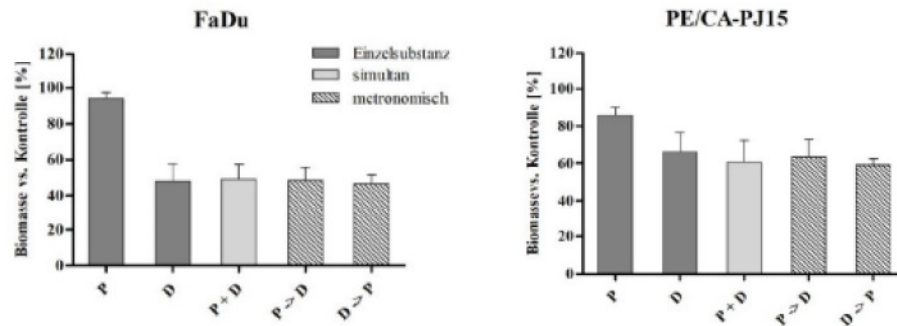
#### Kombination von CDKI



**Abbildung 40: Einfluss der Kombinationstherapie mit Dinaciclib und Palbociclib auf die Biomasse von CAL-33- und Detroit 562-Zellen.**

Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung mit simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

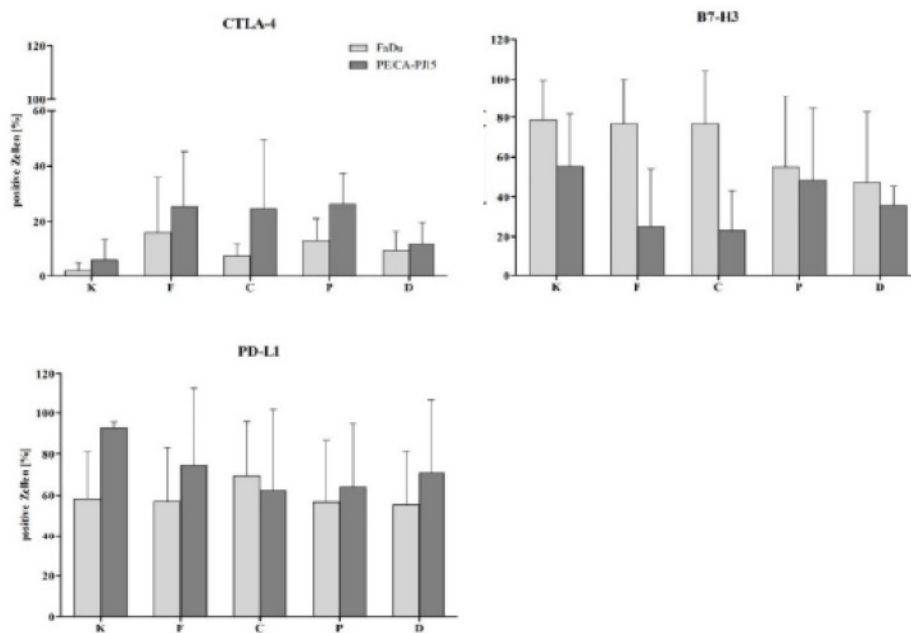




**Abbildung 41:** Einfluss der Kombinationstherapie mit Dinaciclib und Palbociclib auf die Biomasse von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.

Die Behandlung erfolgte jeweils in zwei Zyklen (2 x 72 h) mit den Einzelsubstanzen Dinaciclib und Palbociclib (dunkelgrau) und als Kombinationsbehandlung mit simultaner (hellgrau) sowie metronomischer (gestreift) Substanzgabe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

## Phänotyp



**Abbildung 42:** Einfluss von Zytostatika und CDKI auf den Phänotyp von FaDu- und PE/CA-PJ15-Zellen.

Quantitative Darstellung der CTLA-4, B7-H3 und PD-L1 Abundanz vor und nach Behandlung von FaDu-Zellen (hellgrau) und PE/CA-PJ15-Zellen (dunkelgrau). Die Behandlung mit Zytostatika und CDKI erfolgte in einem Zyklus (24 h). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD aus n = 3 unabhängigen Versuchen. Statistisch ausgewertet wurde mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed) bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). K – Kontrolle, F – 5-FU: 2460 nM, C – Cisplatin: 156 nM, P – Palbociclib: 1000 nM, D – Dinaciclib: 25 nM.

### 10.3 Thesen

1. Kopf-Hals-Tumoren sind eine heterogene Gruppe bösartiger Veränderungen. Über 90 % der Tumoren sind Plattenepithelkarzinome und werden als *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC) zusammengefasst.
2. Die Standardtherapie von HNSCC-Patienten erfolgt unter Anwendung der drei klassischen Säulen Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie. Darüber hinaus gewinnen zielgerichtete und immunologisch-basierte Therapien zunehmend an Bedeutung.
3. Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren (CDKI) sind eine neue Klasse zielgerichteter Substanzen, die in den Zellzyklus eingreifen und die Proliferation von Tumorzellen hemmen. Verschiedene selektive und pan-CDKI werden aktuell präklinisch und klinisch evaluiert.
4. Die Kombinationstherapie mit CDKI und zytostatischen Substanzen verstärkt in Abhängigkeit der Konzentration und zeitlichen Frequenz deren Wirksamkeit durch erhöhte Zytotoxizität.
5. HNSCC-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind intrinsisch strahlenresistent und unterschiedlich sensitiv gegenüber den klassischen Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Gemcitabin.
6. Unsere Daten zeigen, dass der global wirkende pan-CDKI Dinaciclib den selektiven CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Abemaciclib in der antitumoralen Wirkung überlegen ist.
7. Der pan-CDKI Dinaciclib sowie Palbociclib induzieren bei den HNSCC-Zellen zunächst Apoptose. Bei längerer Behandlungszeit geht diese bei gleichzeitiger Induktion von einem G0/G1-Arrest der residualen Zellen in eine Nekrose über. Autophagie spielt eine untergeordnete Rolle.
8. Die Behandlung mit CDKI führt zur Induktion von immunogenem Zelltod (Dinaciclib > Palbociclib). Dieser ist stärker ausgeprägt als bei den Zytostatika.
9. Die Kombinationstherapie der Zytostatika 5-FU bzw. Cisplatin und den CDKI Palbociclib bzw. Dinaciclib wirkt synergistisch, die simultane ist der metronomischen Substanzgabe überlegen.
10. Die metronomische Kombinationstherapie mit Zytostatika und Palbociclib ist effektiver, wenn zuerst die Behandlung mit dem Zytostatikum und danach mit dem CDKI erfolgt.



## 10.4 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. C. Junghanß, Direktor der Medizinischen Klinik III – Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin, dass ich im Rahmen dieser Dissertation in sein Forschungsteam aufgenommen wurde. Weiterhin danke ich für die konstruktive Kritik und die nützlichen Denkanstöße bei den Vorträgen im Labmeeting.

Ein riesiger Dank geht an Frau PD Dr. rer. nat. habil. Claudia Maletzki für die wirklich herausragende Betreuung. Besonders bedanken möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit, die von offener Kommunikation und gegenseitigem Vertrauen geprägt war. Sie hat mir eine Vielzahl an praktischen Fähigkeiten und Fertigkeiten vermittelt und mir von Anfang an das Gefühl gegeben, dass ich mit ihrer Unterstützung eine schöne Dissertation auf die Beine stellen werde. Lief mal etwas nicht wie geplant, hat sie sich immer Zeit genommen und wir konnten schnell eine Lösung finden. Ihre fachliche Kompetenz und der Umgang mit ihren Studenten und Kollegen fand ich sehr beeindruckend und ich hoffe ich werde einiges davon für mein späteres Arbeitsleben mitnehmen.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. B. J. Krause für die gute Zusammenarbeit und die Einarbeitung und Betreuung durch Frau Dr. rer. nat. Carina Bergner bedanken.

Ingy Nassar und Leonie Wiegele danke ich für die gegenseitige Unterstützung und die gemeinsamen Momente während der Monate der Laborarbeit. Zusammen haben wir so manche Höhen und Tiefen der experimentellen Forschungsarbeit gemeistert.

Ich danke besonders meinen Eltern und Großeltern, die mich während meines gesamten Studiums und während der Dissertation unterstützt haben und an die ich mich immer wenden kann.

Zuletzt möchte ich Anni, Lui, Marie und Markus dafür danken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und wir gemeinsam durch die aufregende Zeit des Studiums gegangen sind.

Genderthematische Anmerkung: In dieser Arbeit wird zur leichteren Verständlichkeit das generische Maskulinum verwendet. Hiermit weise ich darauf hin, dass dabei auch feminine sowie nicht binäre Personen gemeint sind.

### 10.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

---

(Abgabedatum)

---

(Vollständige Unterschrift)