

AUS DER KLINIK FÜR HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND PALLIATIVMEDIZIN;
MEDIZINISCHE KLINIK III, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK
DIREKTOR: PROF. DR. MED. C. JUNGHANS

CHARAKTERISIERUNG PATIENTEN-ABGELEITETER ZELLINIEN VON KOPF-HALS-TUMOREN UND PRÄKLINISCHE MEDIKAMENTENTESTUNG

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON
MAREIKE KRAUSE
AUS KIEL
GEB. AM 09.01.1998 IN DEMMIN

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004929

ROSTOCK, 2022

ERSTGUTACHTER: PD DR. CLAUDIA MALETZKI

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK, ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN,
MEDIZINISCHE KLINIK III

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. ROBERT MLYNSKI

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK, KLINIK UND POLIKLINIK FÜR HALS-NASEN-OHREN-
HEILKUNDE, KOPF- UND HALSCHIRURGIE

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. AGMAL SCHERZAD

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSKLINIKUM WÜRZBURG, KLINIK UND POLIKLINIK FÜR HALS-,
NASEN- UND OHRENKRANKHEITEN, PLASTISCHE UND ÄSTHETISCHE OPERATIONEN

JAHR DER EINREICHUNG: 2022

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2024

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches	1
1.1.1	Inzidenz und Epidemiologie	1
1.1.2	Therapie	2
1.1.2.1	Systemische Therapien: Cisplatin, 5-Fluoruracil, Cetuximab, Pembrolizumab.....	2
1.1.3	Prognose.....	5
1.2	Der Zellzyklus.....	6
1.3	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren	8
1.3.1	Palbociclib.....	9
1.3.2	Abemaciclib.....	9
1.3.3	Dinaciclib.....	10
1.3.4	THZ1	11
1.4	Präklinische Modelle	12
II.	ZIELSETZUNG	14
III.	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	Material	15
3.1.1	Laborgeräte.....	15
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3	Chemikalien	17
3.1.4	Antikörper.....	19
3.1.5	Farbstoffe.....	20
3.1.6	Färbekits	20
3.1.7	Medien, Puffer, Lösungen	21
3.1.8	Software	21
3.1.9	Versuchstiere	21
3.2	Methoden.....	22
3.2.1	Prozessierung von Tumorgewebe und Blut	22
3.2.1.1	Aufbereitung von Tumorgewebe	22
3.2.1.2	Dichtegradient zur Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)	23
3.2.2	Tierexperimentelle Methoden.....	23
3.2.2.1	Xenotransplantation und Tumormonitoring von NSG Mäusen	23
3.2.2.2	Xenotransplantation und <i>in vivo</i> Therapie Zelllinien-abgeleiteter Xenografts	24
3.2.2.3	Versuchsende und Gewebeentnahme	24
3.2.3	Zellbiologische Arbeiten	25

3.2.3.1	Kollagenaseverdau für <i>ex vivo</i> Primärkulturen	25
3.2.3.2	Zellkultivierung	26
3.2.3.3	Zellernte	26
3.2.3.4	Zellzählung mittels Neubauerzählkammer.....	26
3.2.3.5	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	26
3.2.3.6	Proliferationsindex.....	27
3.2.3.7	<i>Wound Healing</i> Assay	27
3.2.3.8	Invasions-Assay	27
3.2.3.9	Dosisreihentestung.....	28
3.2.3.10	Kristallviolett-färbung (KV).....	28
3.2.3.11	Kombinationstestungen	29
3.2.3.12	Nachweis von Autophagie.....	29
3.2.3.13	Seneszenz.....	30
3.2.4	Durchflusszytometrische Messungen.....	30
3.2.4.1	Immunphänotypisierung von humanem Tumorgewebe und Blut.....	31
3.2.4.2	Phänotypisierung.....	32
3.2.4.3	Apoptose-Nekrose-Assay.....	33
3.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.5.1	Fingerprint PCR.....	33
3.2.5.2	Cyto-Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (Cyto-FISH)	35
IV.	ERGEBNISSE	36
4.1	Basale Charakterisierung PDX-abgeleiteter Zelllinien.....	36
4.1.1	Klinische Daten	36
4.1.2	Histopathologie und Tumormikromilieu des primären Tumorgewebes.....	37
4.1.3	Qualitätskontrolle und vergleichende Analyse des molekularen Profils sowie Nachweis genspezifischer Veränderungen von <i>CDK4</i> und <i>CDKN2A</i>	38
4.1.4	Verdopplungszeit der Zellpopulationen	41
4.1.5	<i>Wound Healing</i> Assay und Invasions-Assay.....	41
4.1.6	Phänotypisierung primärer Zelllinien	43
4.2	<i>In vitro</i> Wirkung ausgewählter Testsubstanzen.....	45
4.2.1	Bestimmung von Dosisreihen	45
4.2.2	Kombinationsbehandlungen.....	48
4.2.3	Therapiebedingte Veränderungen im Phänotyp.....	50
4.2.4	Detektion von Apoptose und Nekrose unter Therapie.....	51
4.2.5	Semi-quantitative Analyse des Autophagieverhaltens	52
4.2.6	Semi-quantitativer Nachweis von Seneszenz	53
4.3	Übertragung gewonnener <i>in vitro</i> Daten auf ein Xenograftmodell	55
4.3.1	Wachstumsverhalten der Zelllinien <i>in vivo</i>	55
4.3.2	Ansprechen auf Therapie <i>in vivo</i>	56
4.3.3	Überleben	57

V.	DISKUSSION	58
5.1	Etablierung PDX-abgeleiteter HNSCC-Zelllinien	58
5.2	Basale Zellliniencharakterisierung	61
5.3	Arzneimittelwirkungen auf HNSCC-Zellen <i>in vitro</i>	62
5.3.1	Einfluss der Monotherapien auf die Biomasse <i>in vitro</i>	62
5.3.2	Einfluss der Kombinationstherapien auf die Biomasse <i>in vitro</i>	63
5.3.3	Analyse Therapie-bedingter zytotoxischer Effekte	65
5.4	Etablierung eines Zelllinien-abgeleiteten Xenograftmodells	69
5.4.1	Vor- und Nachteile des verwendeten Mausmodells	70
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	72
VII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS	76
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	76
X.	ANHANG	87
10.1	Abkürzungen	87
10.2	Thesen	91
10.3	Lebenslauf	92
10.4	Danksagung	93
XI.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	95

I. EINLEITUNG

1.1 PLATTENEPITHELKRZINOME DES KOPF- UND HALSBEREICHES

1.1.1 INZIDENZ UND EPIDEMIOLOGIE

Karzinome des Kopf- und Halsbereiches können in Tumoren der Nase, Nasennebenhöhlen, der Speicheldrüsen sowie Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC*) der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx eingeteilt werden¹. Mit etwa 90% aller Kopf- und Halstumoren bilden letztere dabei den weit überwiegenden Anteil¹.

Auf Platz 15 der weltweiten Tumorinzidenzen liegen maligne Neoplasien der Lippe und Mundhöhle, auf Platz 20 Larynx- und auf Platz 24 Pharynxkarzinome². In Deutschland kommen Tumoren der Mundhöhle und des Pharynx auf Platz 15 (Frauen) bzw. 7 (Männer) und Larynxkarzinome auf Platz 26 (Frauen) bzw. 17 (Männer)³. Anhand dieser Daten ist bereits erkennbar, dass Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. Je nach Entität und Lokalisation liegt das Geschlechterverhältnis dabei zwischen 2:1 und 15:1 (m:w)¹. Im Jahr 2016 erkrankten etwa 4.690 Frauen und 12.850 Männer in Deutschland an einem HNSCC³.

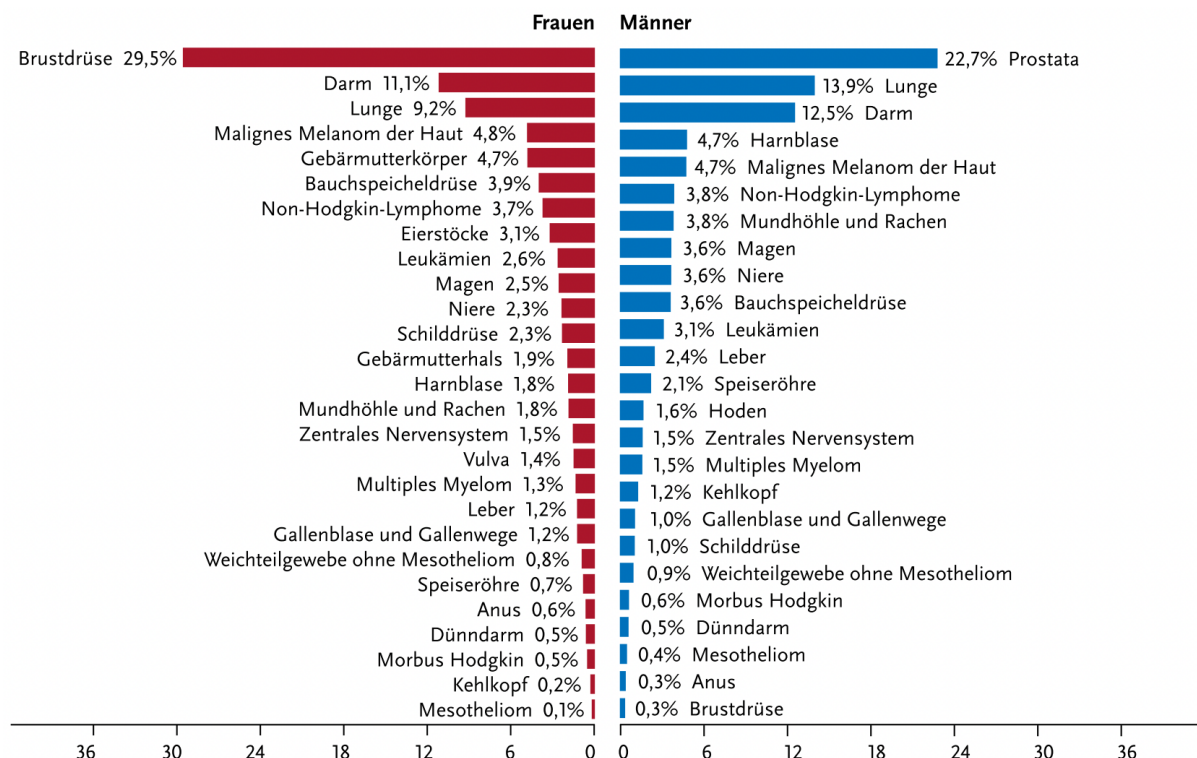


ABBILDUNG 1: PROZENTUALER ANTEIL DER HÄUFIGSTEN TUMORLOKALISATIONEN AN ALLEN KREBSNEUERKRANKUNGEN IN DEUTSCHLAND 2016 (OHNE NICHT-MELANOTISCHEN HAUTKREBS)³.

Risikofaktoren für die Entstehung eines HNSCC sind in erster Linie das Tabakrauchen und der Alkoholkonsum (70-80%), insbesondere verstärkt in der Kombination^{1,3}. Seit 2007 wird

zudem von der WHO das humane Papillomavirus (HPV), insbesondere der *high-risk* Typ 16, als ursächlich für die Entstehung von Pharynxkarzinomen anerkannt⁴. Deutlich seltener kann eine HPV-Assoziation auch im Bereich der Mundhöhle und des Larynx auftreten³. Zusätzlich ist bekannt, dass eine berufliche Exposition gegenüber Noxen wie Asbest oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen das Risiko für Larynxkarzinome erhöht. Eine genetische Prädisposition wird als wahrscheinlich diskutiert^{1,3}.

1.1.2 THERAPIE

Entsprechend der aktuellen S3-Leitlinien besteht die Behandlung eines HNSCCs in erster Linie in der chirurgischen Behandlung des Primärtumors (und ggf. der Ausräumung der Halslymphknoten). Darüber hinaus stellen die (neo-)adjuvante Radio- und/oder systemische Therapie Handlungsoptionen dar. Insbesondere Cisplatin oder Cisplatin-haltige Kombinationen finden dabei Anwendung. Alternativ kann in Kombination mit einer Radiotherapie auch eine zielgerichtete Therapie mit dem Antikörper Cetuximab, der gegen den epithelialen Wachstumsfaktor (EGFR) gerichtet ist, angewandt werden. Im palliativmedizinischen Ansatz ist die Gabe des anti-PD-1 Antikörpers Pembrolizumab bei PD-L1-exprimierenden Tumor- und Immunzellen (CPS ≥ 1) als *first-line* Monotherapie oder in Kombination mit Platin und 5-Fluoruracil (5-FU) indiziert. Bei PD-L1-negativen Tumoren werden je nach Allgemeinzustand der Erkrankten Cetuximab, Cisplatin und 5-FU (= EXTREME-Schema) empfohlen⁵. Die Wirkmechanismen der hier erwähnten Substanzen werden im nachfolgenden Kapitel 1.1.2.1 näher beschrieben.

1.1.2.1 SYSTEMISCHE THERAPIEN: CISPLATIN, 5-FLUORURACIL, CETUXIMAB, PEMBROLIZUMAB

Cisplatin findet eine breite Anwendung in der Behandlung verschiedenster Tumorentitäten, wie bspw. dem Bronchial- und Ovarialkarzinom oder auch bei HNSCC. Molekular besteht es aus einem komplexgebundenem zweiwertigen Platinatom mit je zwei cis-ständigen Chlorid- und zwei Ammin-Liganden. Letztere bilden stärkere Wechselwirkungen mit dem Platinatom, während die Chlorid-Liganden Restgruppen bilden, die eine Bindung des Cisplatin-Komplexes mit DNA-Basen ermöglichen⁶.

Cisplatin wird intravenös appliziert⁷. Im Blut findet sich eine relativ hohe Chloridkonzentration, weshalb es unverändert transportiert wird. Allerdings haben die Plasmaproteine (u.a. Albumin, Transferrin und Cystein) eine hohe Affinität für die Bindung mit Cisplatin, weshalb ein Großteil deaktiviert im Körper vorliegt. Die verbliebene Substanz gelangt durch passive Diffusion über die Zellmembran zu Tumorzellen⁸. Da in der Zelle die Chloridkonzentration relativ gering ist, kommt es zur Aktivierung des Cisplatin durch den Austausch von einem oder beiden Chlorid- mit Wasser-Liganden. Das entstandene mono- oder dihydrierte Platin gelangt in den Zellkern, wo es mit den DNA-Basen reagiert. Insbesondere die N7-Atome an den Imidazolringen von

Adenin und Guanin zeigen eine hohe Reagibilität gegenüber Cisplatin. Es kommt zur Ausbildung von Querverbindungen innerhalb eines (Intrastrang-) oder beider (Interstrang-Quervernetzung) DNA-Stränge, wodurch die Apoptose sich schnellteilender Zellen induziert wird⁸.

Ein bedeutender Nachteil von Cisplatin ist die hohe mit dieser Therapie verbundene Rezidivrate⁹, sowie bestehende Resistenzen¹⁰ und auftretende Nebenwirkungen. Um dies zu umgehen, gibt es verschiedene Ansätze für Kombinationstherapien, welche sich oftmals als effektiver erwiesen haben⁸.

Auch 5-FU wird an einer Breite verschiedener Tumorentitäten angewandt, darunter v.a. das kolorektale Karzinom, aber auch Mammakarzinome und HNSCC¹¹. Es stellt ein fluoriertes Uracil-Analogon dar, mit dem Fluoratom an C-5-Position, und wirkt so als Antimetabolit. Nach der Applikation kommt es zu einer raschen Aufnahme in die Zellen, wo es zu mehreren aktiven zytotoxischen Metaboliten umgewandelt wird¹¹. Die aktivste Form ist dabei das Fluordesoxyuridinmonophosphat (FdUMP). FdUMP bildet einen kovalent gebundenen Komplex mit dem Enzym Thymidylatsynthase¹², welches eine reduktive Methylierung des Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) katalysiert. Diese Reaktion ist essenziell, da es die einzige *de novo*-Thymidylat-Quelle für Zellen darstellt, was für die DNA-Replikation und -Reparatur benötigt wird¹¹. Für die Wechselwirkungen zwischen FdUMP und der Thymidylatsynthase werden Folatmetabolite benötigt, welche durch eine Substitution von Folsäure verabreicht werden können.

Durch die Blockade der Thymidylatsynthase kommt es zur intrazellulären Akkumulation von dUMP. Durch die Metabolisierung des FdUMP entstehen Verbindungen, die an die DNA binden und zusammen mit dem Einbau von dUMP in die neu synthetisierte DNA zur Ausbildung von DNA-Strangbrüchen führt¹². Zudem kann ein weiterer Metabolit des 5-FU, das Fluoruridintriphosphat, in die RNA eingebaut werden, wodurch die physiologische RNA-Prozessierung und -Funktion zerstört wird¹².

5-FU wird überwiegend in der Leber durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DYPD) abgebaut. Die Aktivität der DYPD wird u.a. durch den zirkadianen Rhythmus, Geschlecht und Arzneimittelinteraktionen beeinflusst. Die größte Rolle spielen hierbei jedoch genetische Polymorphismen¹³. Bei einem vorliegenden DYPD-Mangel kann es daher unter 5-FU-Gabe zu akuten toxischen Reaktionen kommen¹².

Ebenfalls für den Einsatz gegen Kopf-Hals-Tumoren zugelassen ist Cetuximab, ein rekombinater chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper und EGFR-Inhibitor, der seine Anwendung ansonsten insbesondere in der Therapie kolorektaler Karzinome findet¹⁴.

EGFR ist ein transmembranes Glykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität¹⁵ und gehört zur Gruppe der humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren. Zusammen mit seinen Liganden

spielt EGFR eine entscheidende Rolle für die Regulation des Zellzyklus, des Zellüberlebens und der Differenzierung. Aufgrund dieser Eigenschaften ist der EGFR in einer Vielzahl verschiedener Tumoren (z.B. Mamma-, Bronchial-, Plattenepithelkarzinome, Glioblastome¹⁵) überexprimiert, um die Zellproliferation des Gewebes zu fördern und den Zelltod zu blockieren. Cetuximab ist ein kompetitiver Inhibitor an der extrazellulären Domäne des EGFR^{14,15}, mit einer fünf- bis zehnfach höheren Affinität im Vergleich zu endogenen Liganden¹⁵. Durch die Bindung kommt es zu einer Blockade der Phosphorylierung und Aktivierung der rezeptorassoziierten MAP-Kinase und PI3-Kinase/Akt. Dies führt zu einer Hemmung des Zellwachstums, sowie zur Induktion der Apoptose. Zudem verringert Cetuximab die Angiogenese durch die verminderte Bildung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors¹⁴.

Das Produkt des Protoonkogens *RAS* vermittelt die EGFR-Signalkaskade. Mutationen spezifischer *RAS*-Gene können somit zu einer EGFR-unabhängigen *RAS*-Proteinaktivierung führen, was zu einer Resistenz gegen Cetuximab führt.

Im Bereich der HNSCCs kann Cetuximab sowohl in Kombination mit einer Radiotherapie bei lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen angewandt werden, wie auch in Kombination mit einer Platin-basierten Chemotherapie bei Rezidiven oder metastasierten Karzinomen¹⁴.

Die Elimination von Cetuximab erfolgt über das endoplasmatische Retikulum. Die *Clearance* ist unabhängig von Leber- und Nierenfunktion, weshalb es keine Kontraindikation für Patient:innen mit eingeschränkter Leber- und/oder Nierenfunktion darstellt. Im Vergleich zu anderen systemischen Therapien wird die Cetuximab-Gabe gut toleriert und vertragen¹⁵.

Weiterhin ist der humanisierte monoklonale IgG4 kappa PD1-Antikörper Pembrolizumab als Therapie gegen HNSCC von der FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassen. Dabei zeigt Pembrolizumab eine halbmaximale Inhibitionskonzentration bei 0,1 nM bis 0,3 nM und wird intravenös verabreicht¹⁶.

PD1 ist ein Transmembranrezeptor, der PD-L1 und PD-L2 bindet. PD1 findet sich nur in aktivierten CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und dendritischen Zellen. PD-L1 hingegen wird regelhaft auf T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen sowie auf neoplastischen Zellen exprimiert¹⁶.

Indem PD-L1 an PD1 bindet, werden T-Zellen inhibiert. Auf diese Weise entziehen sich Tumorzellen der Immunabwehr. Es werden zwei Mechanismen der PD-L1-Expression unterschieden: die intrinsische und die adaptive Expression. Insbesondere Tumorzellen mit zellulären oder genetischen Aberrationen exprimieren PD-L1 intrinsisch. Der adaptive Mechanismus beschreibt dagegen die PD-L1-Induktion durch das Tumormikromilieu, insbesondere als Reaktion auf Interferon γ ¹⁶.

Durch die Pembrolizumab-vermittelte PD1-Blockade wird die Interaktion zwischen einer PD1⁺ T-Zelle und PD-L1⁺ Tumorzelle verhindert. Dies führt zur Wiederherstellung der T-Zell-vermittelten antitumoralen Immunität¹⁶.

In der HNSCC-Therapie PD-L1-positiver Tumoren zeigte sich eine Ansprechrates von ca. 20 %, unabhängig vom HPV-Status. Bei höhergradiger PD-L1-Expression konnten Ansprechrates von etwa 50 % erreicht werden. Zudem kam es bei 56 % der Patient:innen zu einer Minderung der tumorbedingten Belastungen¹⁶.

Die Pembrolizumab-*Clearance* ist unabhängig von einer renalen oder leichten hepatischen Insuffizienz, jedoch abhängig vom Körpergewicht der Patient:innen, weshalb eine individuell angepasste Dosierung erfolgen muss. Das Nebenwirkungsspektrum umfasst insbesondere immunologische Komplikationen, unter anderem Anämien, Kopfschmerz, aseptische Meningitiden, Fieber, Pneumonitiden und diabetische Ketoazidosen¹⁶. Diese können zum Teil auch erst nach Abschluss der Behandlung eintreten. Im Allgemeinen wird Pembrolizumab gut vertragen, die genannten Komplikationen können jedoch in seltenen Fällen auch lebensbedrohliche bis tödliche Verläufe nehmen¹⁶.

1.1.3 PROGNOSE

Die Letalität der Erkrankungen ist abhängig von der Lokalisation und vom UICC-Stadium des Tumors bei der Diagnosestellung³. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt bei 54 % bzw. 63 % (m bzw. w) für Karzinome der Mundhöhle, 48 % bzw. 58 % im Bereich des Oropharynx, 30 % bzw. 38 % für Tumoren des Hypopharynx und 62 % bzw. 65 % bei Larynxkarzinomen¹⁷.

HPV-assoziierte Tumoren zeigen für gewöhnlich ein besseres Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie und sind daher mit einer besseren Prognose verbunden. Dieser therapeutische Vorteil geht jedoch verloren, wenn Noxen an der Ätiologie beteiligt sind¹⁷.

Die dargelegten Daten verdeutlichen einen Bedarf an verbesserten Behandlungsoptionen. Ein möglicher Ansatz hierfür ist die Blockade des Zellzyklus, welcher im folgenden Kapitel erklärt werden soll.

1.2 DER ZELLYKLUS

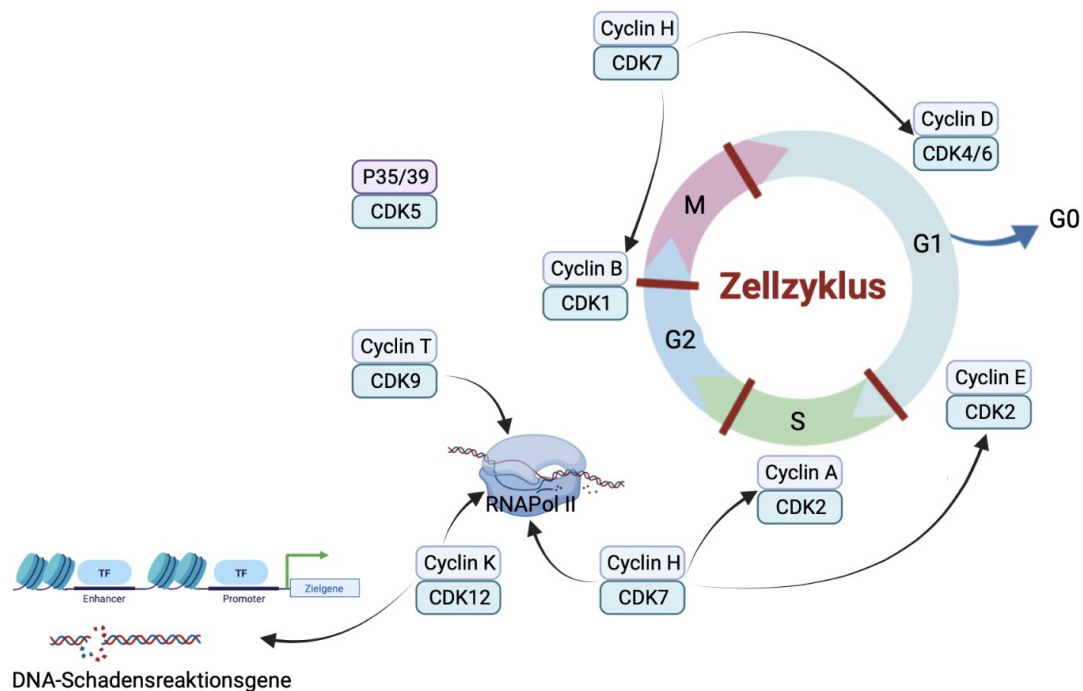


ABBILDUNG 2: ÜBERSICHT ZELLYKLUS UND CDKS. ERSTELLT MIT BIORENDER.COM

Der Zellzyklus umfasst die Prozesse, die der DNA-Replikation, dem Zellwachstum und der Zellteilung dienen¹⁸. Für den Erhalt einer Gewebshomöostase ist ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Proliferation und Zelltod von Bedeutung¹⁹. Während es bei übermäßiger Apoptose zu einem Untergang des Gewebes kommt, kann eine vermehrte Proliferation unter anderem zu einer Karzinogenese beitragen.

Der Zellzyklus ist unterteilt in die Interphase, bestehend aus G1-, S- und G2-Phase und die Mitose (M-Phase). Die G1-Phase schließt sich an eine Mitose an und dient dem Wachstum der entstandenen Tochterzellen. Es kommt zur Synthese verschiedener zellulärer Elemente und Strukturen, wie Membranbestandteile oder RNA. In der sich anschließenden S-Phase findet die DNA-Replikation statt. Anschließend kommt es zum Übertritt in die G2-Phase, einer erneuten Wachstumsphase, in welcher die folgende Mitose vorbereitet wird^{18,20}.

Zusätzlich können Zellen ausgehend von der G1-Phase in einen inaktiven Ruhezustand übergehen, die sogenannte G0-Phase¹⁸.

Die Mitose dient der identischen DNA-Verteilung auf zwei neue Tochterzellen, gefolgt von deren Teilung im Rahmen der Zytokinese¹⁸.

Für den geregelten Ablauf und den Übertritt von einer Phase in eine andere werden spezifische intrazelluläre Signale benötigt. Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) bedingen das Fortschreiten des Zellzyklus. Für ihre Aktivität ist das Binden regulatorischer Untereinheiten, den

sogenannten Cyclinen, obligat²¹. Diese werden im Rahmen des Zellzyklus synthetisiert und abgebaut, sodass die CDKs ihre spezifische Wirkung zu exakt programmierten Zeitpunkten ausüben können. CDKs spielen entweder eine Rolle im Ablauf des Zellzyklus (CDK1, CDK2, CDK4), in der Gentranskription (CDK7, CDK8, CDK9, CDK11) oder im Falle von CDK6 bei beidem²².

In den direkten Ablauf des Zellzyklus sind die folgenden CDKs involviert: CDK2, CDK4 und CDK6 in der Interphase sowie CDK1 während der Mitose. Die zehn zugehörigen Cycline werden in die Klassen Typ A, B, D und E eingeteilt²¹.

Durch die Expression von D-Typ Cyclinen werden mitogene Signale erkannt. Diese Cycline binden bevorzugt an CDK4 und CDK6 während der G1-Phase und aktivieren diese. Hierdurch kommt es zu einer Teilinaktivierung der Pocket-Proteine (Rb, RbL1, RbL2), welche zu einer Expression von E-Typ Cyclinen führt. Diese binden an CDK2. CDK2-Cyclin E-Komplexe sind in der Lage Pocket-Proteine weiter zu phosphorylieren, was zu ihrer vollständigen Inaktivierung führt. In der Folge ist der Transkriptionsfaktor E2F nicht länger inaktiv und es kommt zur Expression E2F-kontrollierter Gene und zum Übergang in die S-Phase²¹.

Zu einem späteren Zeitpunkt, gegen Ende der DNA-Replikation, nimmt der Cyclin E-Spiegel in der Zelle ab, wodurch CDK2 von Cyclin A2 gebunden und aktiviert wird. Der hier gebildete CDK-Cyclin-Komplex ist relevant für die G2-Phase und mit ihr der Übergang von der S-Phase zur Mitose²¹.

CDK1 wird am Ende der Interphase ebenfalls von A-Typ Cyclinen aktiviert, um die Zelle in die Mitose zu überführen. In der Prometaphase dieser kommt es zur Auflösung der Kernmembran. Im Anschluss werden A-Typ Cycline abgebaut, was zu einer erleichterten Bildung von CDK1-Cyclin B-Komplexen führt. Diese Komplexe sind verantwortlich für die Induktion und das Durchlaufen der Mitose²¹.

Neben den genannten, direkt auf den Zellzyklus wirkenden CDKs, gibt es weitere Cyclin-abhängige Kinasen, die indirekte Effekte vermitteln²¹. So besteht die CDK-aktivierende Kinase (CAK) aus den drei Untereinheiten CDK7, Cyclin H und MAT1 (*ménage à trois*) und wirkt über eine Phosphorylierung aktivierend auf CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6. Sie ist obligat für den Ablauf des Zellzyklus²³. Weiterhin ist die CAK Teil des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIIF. Sie phosphoryliert die C-terminale Domäne der großen RNA-Polymerase II-Untereinheit, wodurch sie an der Promotorfreigabe und Transkriptionsprogression der Präinitiationsphase beteiligt ist.

Ebenso wie CDK7 wirken auch die CDK8 und CDK9 als TFIIF-Bestandteile phosphorylierend auf spezifische Reste der C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II²⁴. CDK7 und CDK8 regulieren die Initiierung der Transkription, während CDK9 die anschließende Freisetzung des Promotors bewirkt.

CDK12 und CDK13 binden an Cyclin K und sind an der Synthese der entstehenden RNA beteiligt. Hier wirken sie ebenfalls durch eine Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II modulierend auf die Elongation des Transkripts²⁴. Auf diese Weise wird die selektive Expression, an der DNA-Schadensreaktion und mRNA-Prozessierung beteiligte Gene beeinflusst²⁵. Der CDK12-Cyclin K-Komplex reguliert auch das alternative Spleißen des letzten Exons²⁴.

CDK5 gilt als atypische CDK, da sie nicht von Cyclinen, sondern von den Proteinen P35 und P39 reguliert wird. Hohe Konzentrationen dieser Proteine sind in neuronalem Gewebe zu finden, was impliziert, dass die Regulation der Hirnentwicklung und des neuronalen Zellüberlebens Hauptfunktionen der CDK5 darstellen. Nichtsdestotrotz scheint CDK5 eine Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung verschiedener Entitäten zu spielen. So konnten erhöhte CDK5-Aktivitäten unter anderem bei Mamma-, Bronchial-, Leber- oder Pankreaskarzinomen festgestellt werden²⁶.

1.3 CYCLIN-ABHÄNGIGE KINASE-INHIBITOREN

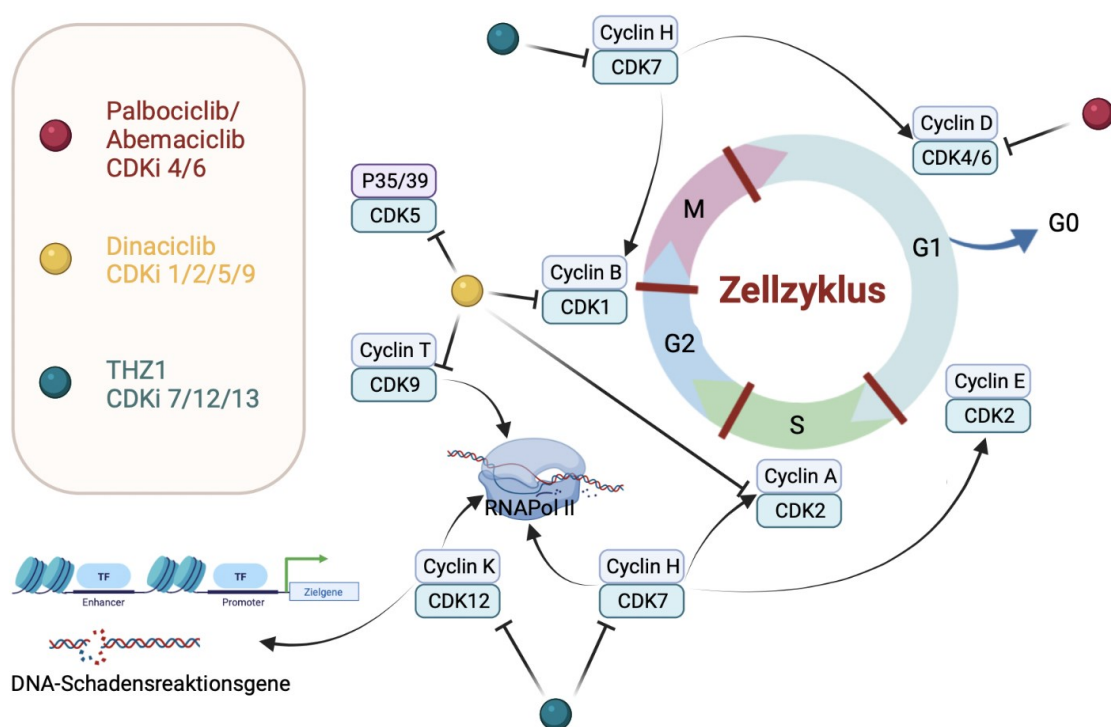


ABBILDUNG 3: DER ZELLZYKLUS MIT CDKS UND IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN CDKIS SOWIE DEREN MOLEKULARE ANGRIFFPUNKTE. ERSTELLT MIT BIORENDER.COM

Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CDKi) sind Substanzen, die die CDKs in ihrer Wirkung hemmen. Dabei wird zwischen hochselektiven CDKis, beispielsweise gegen CDK4/6, und global wirksamen CDKis unterschieden²⁷. In vielen Tumoren sind die CDKs übermäßig aktiv, was

zu einem vermehrten Durchlauf des Zellzyklus führt. Durch die Inhibition der CDKs kommt es zu einem Zellzyklusarrest, weshalb CDKis für die Therapie onkologischer Erkrankungen interessant sind. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl selektiver und globalwirksamer CDKis entwickelt, wovon einige bereits zugelassen sind und in der Therapie eingesetzt werden. Der erste zugelassene CDK-Inhibitor war Palbociclib (2015) gegen hormonrezeptorpositive und HER2-negative Mammakarzinome²⁸.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von Palbociclib, Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 auf HNSCC untersucht. In den folgenden Kapiteln werden daher diese vier CDKis genauer betrachtet.

1.3.1 PALBOCICLIB

Der CDK4/6 Inhibitor Palbociclib war der erste zugelassene oral applizierte CDKi. Über eine Hemmung der Komplexe CDK4/Cyclin D1, CDK4/Cyclin D3 und CDK6/Cyclin D6 kommt es zu einem G1-Arrest, zur Hemmung der DNA-Synthese und zur Phosphorylierung des Rb-Proteins²². Palbociclib hat eine absolute Bioverfügbarkeit von etwa 46 % und scheint stark in peripheres Gewebe vorzudringen²². Die Plasmabindung liegt bei etwa 85 %²².

Palbociclib ist ein CYP3A4-Substrat, wovon es zugleich ein moderater Inhibitor ist. Insgesamt gibt es eine Reihe klinischer Studien für den Einsatz des Wirkstoffes²². Im Bereich der HNSCC gibt es aktuell aktive klinische Studien der Phasen 1 bis 3 (*clinicaltrials.gov*, Stand: 03. August 2022; z.B. Phase 1: NCT03498378, Phase 2: NCT03088059, Phase 3: NCT04966481).

Palbociclib induziert Seneszenz und Apoptose in Tumorzellen, allerdings zeigen sich häufiger Neutropenien²⁹ als bei anderen selektiven CDK4/6 Inhibitoren.

Insbesondere für hämatologische Malignome konnten unter Palbociclib gute Therapieergebnisse erzielt werden, sowohl in Mono- wie auch in Kombinationstherapie²². Der CDK6/Cyclin D3-Komplex ist besonders relevant für die Reifung hämatopoetischer Stammzellen. Da Palbociclib hier spezifischer wirkt als Abemaciclib, kann dies eine Erklärung für die vermehrt auftretenden Neutropenien sein²⁹.

1.3.2 ABEMACICLIB

Abemaciclib ist ein oral appliziertes CDKi der dritten Generation und als solches ein selektiver Inhibitor der CDK4/6, wobei es eine höhere Affinität für CDK4/Cyclin D1-Komplexe hat²⁹. Es unterdrückt die Rb-Phosphorylierung und verursacht damit einen G1-Arrest²². Unter den bekannten und FDA-zugelassenen CDK4/6-Inhibitoren (Abemaciclib, Ribociclib, Palbociclib) ist Abemaciclib der am wenigsten selektive Wirkstoff, da es zusätzlich verschiedene Kinasen (z. B. *Homeodomain-interacting Protein Kinase*) hemmen kann²². Im direkten Vergleich zeigen jedoch alle CDK4/6-Inhibitoren eine bessere Verträglichkeit als die global wirkenden CDKis³⁰.

Ein Vorteil von Abemaciclib gegenüber Palbociclib ist dessen breiteres Einsatzspektrum, etwa bei viszeralen Komorbiditäten, Lebermetastasen oder einer primären Resistenz gegenüber einer endokrinen Therapie. Es induziert verstärkt Seneszenz und Apoptose in Tumorzellen. Außerdem besitzt Abemaciclib das Potential, bereits nach einmaliger Gabe eine Remission etablierter Mammakarzinome zu induzieren²⁹.

Abemaciclib weist eine hohe Plasmaproteinkonzentration von ca. 96 % auf und wird durch CYP3A4 metabolisiert²². Seit 2017 ist Abemaciclib, ergänzend zu Palbociclib, für die Therapie fortgeschrittener, metastasierter hormonrezeptorpositiver und HER2-negativer Mammakarzinome zugelassen. Im Rahmen einer antihormonellen Therapie wird Abemaciclib mit einem Aromataseinhibitor oder Fulvestrant kombiniert. Zu den häufigen Nebenwirkungen zählen Diarrhö, Übelkeit und eine Leberdysfunktion²⁹.

Um das Anwendungsspektrum von Abemaciclib zu erhöhen, wurden entsprechende präklinische Studien an verschiedenen Tumorentitäten (z.B. Glioblastome, akute myeloische Leukämie, kolorektales Karzinom) durchgeführt. In diesen konnte u.a. gezeigt werden, dass die kombinierte Gabe von Abemaciclib und Gemcitabin im Xenograft-Modell additiv wirkt und somit die Effekte der Monotherapie verstärkt werden²². Hinsichtlich der HNSCC Therapie laufen aktuell klinische Studien, die Abemaciclib in Mono- oder Kombinationstherapien testen. Eine dieser Studien (Phase 1 und 2, NCT03655444) wurde 2020 bereits abgeschlossen (*clinicaltrials.gov*, Stand: 03. August 2022), die Ergebnisse sind ausstehend.

1.3.3 DINACICLIB

Dinaciclib ist ein niedermolekularer Inhibitor der CDK1, CDK2, CDK5 und CDK9, wodurch es eine verhältnismäßig globale Wirkung auf den Zellzyklus hat³¹. Im Rahmen von *in vitro* Studien konnte für mehr als hundert Zelllinien verschiedener Entitäten gezeigt werden, dass Dinaciclib eine komplette Unterdrückung der Rb-Phosphorylierung zur Folge hat. Dies führt zu einem fehlenden G1-Progress und G1/S-Übergang³⁰, was zu einer Induktion der Apoptose und vollständigen Hemmung der Proliferation führt³¹. Auch die Komplexe CDK2/Cyclin A und CDK1/Cyclin B werden gehemmt, wodurch es zu einem fehlenden Fortschreiten im S/G2-Übergang und der M-Phase kommt³⁰. Außerdem kommt es durch die Blockade des Thymidineinbaus in die DNA zu einer potenten Inhibition der Replikation³¹.

Durch Hemmung der CDK9 kommt es zu einer ausbleibenden Initiation, Elongation und Prozessierung der Transkription³⁰.

In *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass bereits eine kurzzeitige Therapie mit Dinaciclib langanhaltende Effekte vermittelt. *In vivo* wurde unter Dinaciclib-Behandlung eine Hemmung des Tumorwachstums und eine Regression in Xenograft-Modellen unterschiedlicher Herkunft beschrieben³¹.

Während es aktuell keine laufenden klinischen Studien zum Einsatz von Dinaciclib an HNSCCs gibt (*clinicaltrials.gov*, Stand: 03. August 2022), konnte in einer Phase 1-Studie, die verschiedene fortgeschrittene Tumoren einschloss, festgestellt werden, dass eine eskalierende Therapie durch hämatologische Nebenwirkungen (z.B. Panzytopenien, neutropenisches Fieber) limitiert wird. Weitere Nebenwirkungen umfassen v.a. Hypotonien, erhöhte Transaminasespiegel und Hyperurikämien. Je nach Therapieschema können zudem neurologische Symptome, Fatigue und Übelkeit auftreten³⁰.

1.3.4 THZ1

THZ1 ist ein hochselektiver kovalenter Inhibitor der CDK7, dem ein hohes antitumorales Potential zugesprochen wird. Die CDK7 ist mit der Initiierung der Transkription über TFIIH assoziiert und übernimmt verschiedene Funktionen im Rahmen der Zellzyklusregulation. Außerdem vermittelt CDK7 die Phosphorylierung der RNA-Polymerase II. THZ1 hat unter anderem einen negativen Einfluss auf mehrere Prozesse der Transkription, des co-transkriptionellen Cappings und der Elongation³².

Als Teil der CAK aktiviert die CDK7 andere CDKs über eine Phosphorylierung. Durch Gabe von THZ1 konnte an kolorektalen Karzinomzellen gezeigt werden, dass es über eine selektive Blockade der CDK7 und damit der CAK zu einer Inaktivierung der CDK1 und CDK2 kommt. Dies führt zu einem Arrest des Zellzyklus, sowohl am Übergang von der G1- zur S-Phase, als auch von der G2- zur M-Phase³³. Weiterhin wird berichtet, dass CDK4 und CDK6 unmittelbar nach Hemmung der CDK7 ihre Funktion verlieren, da die Aktivierung durch Phosphorylierung fehlt.

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass THZ1 alle Phosphorylierungen der großen Untereinheit der C-terminalen Domäne an der RNA-Polymerase II inhibiert, die für ihre Wirkung essentiell sind. So hat THZ1 unter anderem Einfluss auf das Capping längerer Transkripte³². Bereits bei Konzentrationen unter 200 nM zeigt sich für viele Zelllinien eine halbmaximale Inhibitionskonzentration (IC_{50}), während es nicht bzw. nur sehr wenig toxisch auf benigne Zellen wirkt. Auf Grundlage der molekularen Struktur von THZ1 wurden bereits weitere CDK7-Inhibitoren, wie QS1189, SY-1365 und ICEC0942, entwickelt, welche ebenfalls vielversprechende antikanzerogene Effekte zeigen³².

Liegt THZ1 in höheren Konzentrationen vor, hat es außerdem einen inhibierenden Effekt auf die CDK12 und CDK13, da diese eine ähnliche Struktur aufweisen wie CDK7³².

Derzeit gibt es keine laufenden klinischen Studien zum Einsatz von THZ1 (*clinicaltrials.gov*, Stand: 03. August 2022).

1.4 PRÄKLINISCHE MODELLE

In der präklinischen Forschung finden sich verschiedene Modelle für die Untersuchung von Tumoren. Zu diesen zählen unter anderem Langzeit-kultivierte, Patient:innen-abgeleitete Zelllinien sowie Patient:innen-abgeleitete Xenograftmodelle^{34,35}. Idealerweise werden in diesen präklinischen Modellen Phänotyp und molekulare Struktur der Tumoren, ebenso wie das komplexe und heterogene Tumormikromilieu, welches mit Immun- und Stromazellen interagiert, erhalten. Bisher konnte jedoch keines der verfügbaren präklinischen Modelle all diese Charakteristika abdecken³⁴.

Patient:innen-abgeleitete Zelllinien werden aus frischem Biopsie- oder OP-Resektatgewebe gewonnen. Über eine Vereinzellung der Zellen wird das Gewebe in eine Zellkultur überführt. Es kommt durch die *ex vivo* Prozessierung zu einer Selektion, wodurch eine phänotypische Homogenisierung der Kultur hervorgerufen wird³⁶. Vorteil hierbei ist der verhältnismäßig geringe Aufwand oder das unbegrenzte Wachstum der Zellen³⁷. Erfolgreich etablierte Zelllinien können häufig über viele Passagen verwendet werden und zeitgleich ist die Durchführung verschiedener Untersuchungen mit hoher Durchsatzrate möglich³⁷. Außerdem werden keine Versuchstiere für die Forschung benötigt.

Gerade in hohen Passagen einer Zellkultur kommt es jedoch zu genetischen Veränderungen, unter anderem ausgelöst durch *in vitro* Manipulationen. Da diese nicht die natürlichen Veränderungen einer Tumorzelle *in vivo* abbilden, entstehen hier Limitationen in der Aussagekraft von Untersuchungsergebnissen, insbesondere in Bezug auf das Ansprechen auf verschiedene Therapeutika³⁶. Dennoch stellen sie einen wertvollen Ausgangspunkt für Therapieversuche in der präklinischen Forschung dar³⁷. Die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse müssen in der Folge durch *in vivo* bzw. klinische Untersuchungen weiterverfolgt werden³⁷.

Weiterhin können aus frischgewonnenem Gewebe sogenannte Patient:innen-abgeleitete Xenografts (*Patient-derived Xenografts*, PDX) gewonnen werden. Hierfür wird das Gewebe in immundefiziente Mäuse implantiert, um ein Milieu zu schaffen, in welchem der Tumor unter stetigem Monitoring wachsen kann³⁶. PDX sind geeignet, um Aussagen über den ursprünglichen Tumor zu treffen, da sie - zumindest in niedriger Passage - die intratumorale Heterogenität und das physiologische Tumormikromilieu (unter anderem Sauerstoffsättigung, Hormonschwankungen, Nährstoffversorgung) abbilden³⁸. Außerdem findet kaum eine genetische Transformation des Gewebes statt, da es nicht *in vitro* prozessiert wird. Eine entsprechend hohe prädiktive Wertigkeit für ein klinisches Ansprechen auf neue Therapeutika wurde mehrfach gezeigt³⁹.

Jedoch haben auch PDX-Modelle Limitationen, insbesondere durch den obligaten Einsatz immundefizienter Mäuse. Da die Immunabwehr gesunder Tiere das Fremdgewebe abstoßen würde, führt ihre Verwendung ebenfalls zu einer eingeschränkten Aussagekraft präklinischer Studien, insbesondere bei der Testung immunmodulierender Wirkstoffe, die durch Aktivierung

des Wirtsimmunsystems wirken⁴⁰. Zusätzlich ist keine Sicherheit eines erfolgreichen Engraftments bei jeder Maus bzw. jeder Gewebeprobe gegeben.

Aus den genannten Vor- und Nachteilen der beschriebenen präklinischen Modelle ergibt sich ein Bedarf für einen kombinierten Einsatz von *in vitro* und *in vivo* Modellen. Auf diese Weise können die Vorteile der jeweiligen Modelle genutzt und Nachteile bestmöglich kompensiert werden. Dieser Ansatz war Grundlage für die vorliegende Arbeit, deren Zielsetzung im folgenden Kapitel erläutert wird.

II. ZIELSETZUNG

Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses zeichnen sich durch eine hochgradige intra- und intertumorale Heterogenität aus. Zusätzlich werden die Tumoren oftmals erst in fortgeschrittenen oder metastasierten und damit nicht-resezierbaren Stadien diagnostiziert. Auch die bekannten systemischen Therapien zeigen häufig ein nur unzureichendes Ansprechen, so dass die Prognose der betroffenen Patient:innen weiterhin eher ungünstig ist. Um die Heterogenität abzubilden und innovative Therapiekonzepte präklinisch zu validieren, sollten Patient:innen-individuelle Modelle herangezogen werden.

Das Ziel dieser Studie war zunächst die umfassende Charakterisierung der neu etablierten PDX-abgeleiteten HNSCC Zelllinien, um diese in einem zweiten Schritt für Therapiestrategien im Sinne einer personalisierten Tumorthherapie einzusetzen. Eine vielversprechende Substanzklasse sind CDKis, welche zunehmend Anwendung in der Präklinik und Klinik finden. Im Bereich der HNSCC gibt es bisher jedoch nur wenige Vorarbeiten, die sich mit dem Einsatz dieser zielgerichteten Therapien befassen. Folglich wurde in dieser Arbeit sowohl die Wirksamkeit einzelner CDKis in Mono- als auch in Kombinationstherapie mit klassischen Substanzen evaluiert, sowie anhand der zugrunde liegenden molekularen Veränderungen Marker für das Ansprechen definiert.

Wir erhoffen uns mit diesem Ansatz einen Beitrag zum besseren Verständnis der Tumorbilogie zu leisten und die Entwicklung neuer personalisierter Therapiekonzepte voranzubringen.

Zusammenfassend ergaben sich für diese Arbeit folgende Untersuchungsschwerpunkte:

- Basale Charakterisierung und Qualitätskontrolle der neu etablierten Zelllinien
- Wirksamkeit von Cisplatin, 5-FU und Cetuximab sowie der CDKis Palbociclib, Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 in Mono- und Kombinationstherapie
- Funktionelle Analyse der Therapie-vermittelten zytotoxischen Effekte
- Korrelation des Ansprechens auf CDKis mit zugrunde liegenden molekularen Alterationen
- Translation *in vitro* gewonnener Ergebnisse auf ein *in vivo* Modell

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 LABORGERÄTE

<i>Laborgerät</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Hauptsitz</i>
Accu-Jet™ pro	Brand	Wertheim, Deutschland
BD FACSVerse™	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus instruments	Hanau, Deutschland
Brutschrank CB 170	Binder	Tuttlingen, Deutschland
Flockeneisbereiter AF 80	Scotsman	Mailand, Italien
Freezing Container, Nalgene™ Mr. Frosty™	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
Gefrierschrank -80°C	Liebherr Deutschland	Bulle, Schweiz
GloMax Discover Microplate Reader	Promega	Madison, USA
Invitrogen™ EVOS™ XL Core Imaging System	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
Kühlschrank 4°C / Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Bulle, Schweiz
Kühlschrank Siemens	Siemens	München, Deutschland
Laser-Scanning Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Lichtmikroskop Eclipse™ TE200	Nikon	Tokio, Japan
Neubauer Zählkammer	Marienfeld	Lauda Königshofen, Deutschland
Pipetten (2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reax top™ Vortex- Gerät	Heidolph	Schwabach, Deutschland

Schieblehre M.Nonius, Messbereich 100 mm	B. Braun	Tuttlingen, Deutschland
Stickstofflagerbehälter Apollo™	Cryotherm GmbH	Kirchen, Deutschland
Transport-Dewargefäß Typ B	KGW Isotherm	Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Deutschland
Werkbank Herasafe™	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420	Hettich	Tuttlingen, Deutschland

3.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Hauptsitz
Aesculap Division - Sterile Surgical Blades	B. Braun	Tuttlingen, Deutschland
Aesculap Skalpell-Halter BB073R	B. Braun	Tuttlingen, Deutschland
Alu-Folie 20 µm Stärke	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Cell Strainer, 40 µm Nylon	Falcon	Durham, USA
CellStar 24-Well Multiwell- Platten, Polystyrol	Greiner Bio One	Kremsmünster, Öster- reich
CellStar 6-Well Multiwell- Platten, Polystyrol	Greiner Bio One	Kremsmünster, Öster- reich
CellStar 96-Well Multiwell- Platten, F-Boden, Polystyrol	Greiner Bio One	Kremsmünster, Öster- reich
Chirurgisches Besteck-Set (chirurgische Schere, chirurgi- sche/anatomische Pinzette)	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland
Combitips advanced, steril (2 ml; 5 ml; 10 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Combitips advanced, unsteril (2 ml; 5 ml; 10 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Deckgläser (24 x 32 mm)	iDL	Nidderau, Deutschland
EASYstrainer, 100 µm	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Multipette M4	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Nunc™ 96-Well Polystyrene Conical Bottom MicroWell™ Plates	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
Nunc™ CryoTube Vials	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
Omnifix Luer Lock Solo, 5 ml	B. Braun	Tuttlingen, Deutschland
Peha-soft nitrile fino puderfrei Handschuh, unsteril	Paul Hartmann AG	Heidenheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Polypropylen (PP) Röhrchen, steril, 15 ml	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Polypropylen (PP) Röhrchen, steril, 50 ml	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Probenröhren 75 x 12 mm, 5 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, safe-lock	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten, 10 ml	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 2 ml	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 5 ml	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Surgical Disposable Scalpel	B. Braun	Tuttlingen, Deutschland
µ-Slide 8 Well	ibidi GmbH	Martinsried, Deutschland

3.1.3 CHEMIKALIEN

Chemikalien	Hersteller	Hauptsitz
5-FU	VEZ Universität Rostock	Rostock, Deutschland

96% Ethanol	Walter CMP	Kiel, Deutschland
Abemaciclib	Selleckchem	München, Deutschland
Acridinorange	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	SGWater – Analge	Barsbüttel, Deutschland
Bacillol AF	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
CaCl₂	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Calcein AM	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
Cetuximab	VEZ Universität Rostock	Rostock, Deutschland
Cisplatin	VEZ Universität Rostock	Rostock, Deutschland
Dinaciclib	Selleckchem	München, Deutschland
DMEM/Ham's F12 (1:1)	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
DMSO (dimethyl sulfoxide)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,5 M in H₂O	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
HCl	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Walter CMP	Kiel, Deutschland
Ketamin/Xylazin (90/6 mg/kg KG)	Bela-pharm GmbH & Co. KG	Vechta, Deutschland
Kollagenase 500 mg/ml	Nordmark Biochemicals	Uetersen, Deutschland
Kristallviolett	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
Matrigel Matrix	Corning	Corning, USA

NaCl	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Palbociclib	Selleckchem	München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Phosphat buffered saline (PBS; pH 7,4)	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Heidelberg, Deutschland
THZ1	Hycultec	Beutelsbach, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)amino-methan 0,5 M	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% in PBS	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland

3.1.4 ANTIKÖRPER

<i>Antikörper</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
anti-Calreticulin	unkonjugiert	human	polyklonal	Antibodies-online GmbH
CD3	FITC	human	OKT-3	ImmunoTools GmbH
CD4	PE	human	IT4	ImmunoTools GmbH
CD8	PE	human	MEM-31	ImmunoTools GmbH
CD14	FITC	human	63D3	BioLegend
CD16	APC	human	3G8	ImmunoTools GmbH
CD25	APC	human	MEM-181	ImmunoTools GmbH
CD56	PE	human	MEM-188	ImmunoTools GmbH
CD69	PE	human	IT8G1	ImmunoTools GmbH
CD70	FITC	human	113-16	BioLegend
CD152	PE	human	BNI3	BioLegend

CD163	PECy7	human	GHI/61	BioLegend
CD169	APC	human	7-239	BioLegend
CD204	PE	human	7C9C20	BioLegend
CD273	APC	human	24F.10C12	BioLegend
CD274	PECy7	human	29E.2A3	BioLegend
CD276	PE	human	DCN.70	BioLegend
CD279	APC	human	EH12.2H7	BioLegend
CD326	Alexa 488	human	9C4	BioLegend
CD366	APC	human	F38-2E2	BioLegend
Donkey-anti Rabbit	FITC	rabbit	Poly4064	BioLegend
HLA-A2	PE	human	BB7.2	Nordic BioSite
HLA-ABC	FITC	human	W6/32	ImmunoTools GmbH
HLA-DR	PE	human	MEM-12	ImmunoTools GmbH
LAG-3	FITC	human	11C3C65	BioLegend

3.1.5 FARBSTOFFE

<i>Farbstoff</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Hauptsitz</i>
Propiumiodid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Yo-Pro-1	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA

3.1.6 FÄRBEKITS

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Hauptsitz</i>
Senescence β-Galactosidase Staining Kit	Abbkine	Wuhan, China

3.1.7 MEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN

Produkt	Zusammensetzung
2% BSA in PBS	2 g BSA in 100 ml PBS
70% Ethanol	36 ml Ethanol (96%) 15 ml Aqua dest.
Erythrozytenlysepuffer	0,16 M Ammoniumchlorid 0,17 M Tris; Verhältnis 1:10
Freezing Medium	45 ml FKS (90% final) 5 ml DMSO (10% final)
PBS	80 g NaCl 2 g KCl 18 g Na ₂ HPO ₄ 2x H ₂ O 2 g K ₂ HPO ₄ ad 1000 ml Aqua dest.
Standardmedium	500 ml DMEM/Ham's F12 (1:1) 50 ml FKS (final 10%) 6 - 8 ml L-Glutamin (final: 20 mM)
Trypanblau-Lösung (pH 7,4)	0,16% (W/V) Trypanblau 150 nM NaCl
Vollmedium	400 ml DMEM/Ham's F12 (1:1) 100 ml FKS (final 20%) 6 - 8 ml L-Glutamin (final: 20 mM)

3.1.8 SOFTWARE

Die vorliegende Arbeit wurde mit Microsoft Office Word™ 2021 angefertigt. Statistische Analysen sowie die Erstellung von Graphen erfolgte mittels GraphPad™ Prism Version 8.0.2. Für die Auswertung durchflusszytometrischer Daten wurde die BD FACSSuite™ genutzt. Illustrationen wurden mit www.biorender.com erstellt. Für das Literaturverzeichnis wurde Mendeley Desktop 1.19.8 verwendet.

Weiterhin fand Verwendung: Pubmed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.1.9 VERSUCHSTIERE

NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1} Wjl (NSG) Mäuse	eigene Zucht, Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung
-------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------

3.2 METHODEN

3.2.1 PROZESSIERUNG VON TUMORGEWEBE UND BLUT

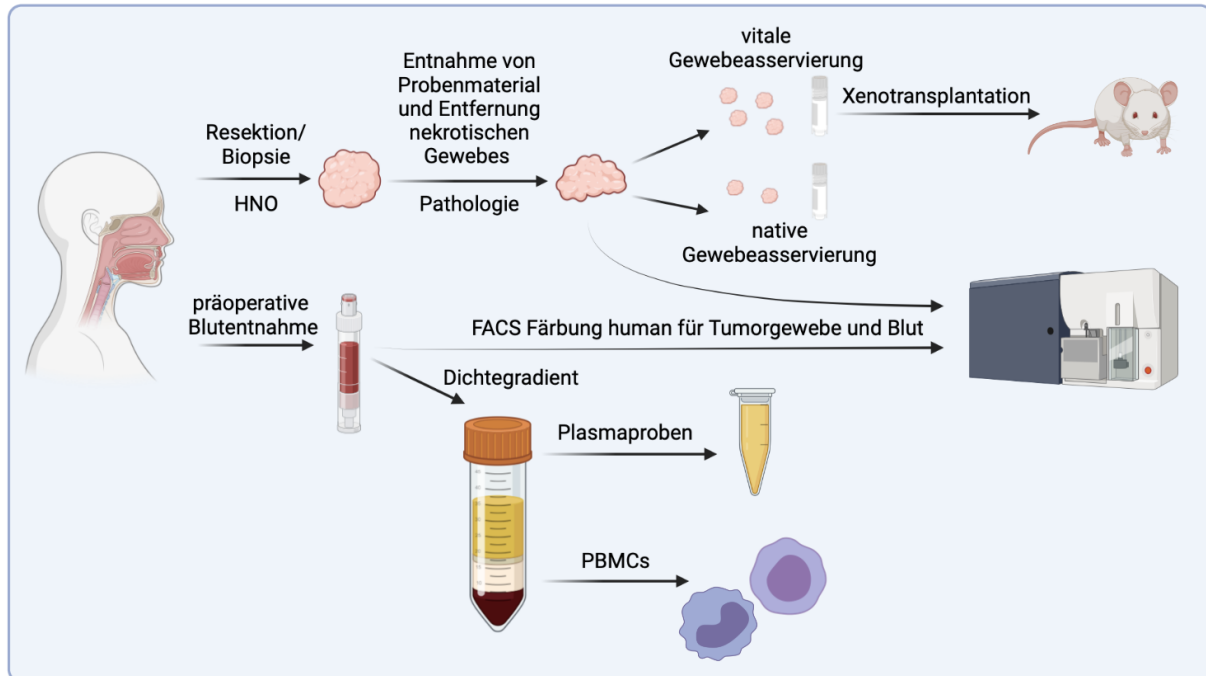


ABBILDUNG 4: ÜBERSICHT DER TUMORAUFBEREITUNG FÜR DIE AUFNAHME IN DIE BIOBANK. ERSTELLT MIT BIORENDER.COM

3.2.1.1 AUFBEREITUNG VON TUMORGEWEBE

OP-Resektate und Biopsien aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie „Otto Körner“, entnommen durch Dr. D. Strüder, wurden zunächst im Institut für Pathologie im Rahmen der intraoperativen Diagnostik und Schnittrandkontrolle durch PD Dr. A. Zimpfer untersucht. Die schriftliche Einwilligung der Patient:innen wurde entsprechend der Richtlinien für die Verwendung von menschlichem Material (Deklaration von Helsinki) und der lokalen Ethikkommission (Referenznummer A2018-0003) eingeholt.

Überschussgewebe aus der Diagnostik wurde der Biobank zugeführt und im Labor unter sterilen Bedingungen weiter prozessiert. Zunächst wurde es in etwa 3 x 3 x 3 mm kleine Stücke geschnitten. Ein Teil der Proben wurde nativ asserviert, der Großteil vital.

Für die native Asservierung wurden Gewebestücke in ein Kryoröhrchen gegeben und dieses in Flüssigstickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Für die vitalen Proben wurden jeweils vier Gewebestücke pro Kryoröhrchen in 1 ml Einfriermedium (50 ml FKS + 5 ml DMSO) aufgenommen. Diese wurden schonend (*Mr. Frosty*) auf -80°C herabgekühlt und anschließend in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert.

Ein weiterer Teil des Tumorgewebes wurde mithilfe eines Cellstrainers in eine Einzelzellsuspension überführt und für eine durchflusszytometrische Messung eingesetzt (siehe 3.2.4.1 *Immunphäotypisierung von humanem Tumorgewebe und Blut*).

3.2.1.2 DICHTEGRADIENT ZUR ISOLATION VON PERIPHEREN MONONUKLEÄREN ZELLEN (PBMCs)

15 ml Vollblut (EDTA-Blut oder Heparin-Blut) wurden unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und mit 10 ml PBS verdünnt. Anschließend wurden 14 ml Biocoll vorsichtig unterschichtet und bei 1140 x g für 15 min ohne Bremse zentrifugiert, sodass sich mehrere Phasen bildeten. Von der obersten Phase (= Blutplasma) wurden drei Aliquots à 1 ml entnommen und bei -80°C gelagert.

Der Interphasering unterhalb der Plasmaphase, beinhaltete die PBMCs. Diese Zellen wurden in ein neues PP-Röhrchen transferiert, mit PBS auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und die Zellen gezählt. Die verbleibende Suspension wurde bei 300 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in Einfriermedium aufgenommen, wobei das Gesamtvolumen abhängig von der absoluten Zellzahl gewählt war (ca. 10 Mio. Zellen/Kryo). Die Zellen wurden schonend (*Mr. Frosty*) bei -80°C kryokonserviert. Für die langfristige Lagerung wurden die Kryoröhrchen in die Gasphase von Flüssigstickstoff überführt.

3.2.2 TIEREXPERIMENTELLE METHODEN

3.2.2.1 XENOTRANSPLANTATION UND TUMORMONITORING VON NSG MÄUSEN

Alle Versuche wurden an sechs bis acht Wochen alten, weiblichen NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}Wjl (NSG) Mäusen durchgeführt. Vor Versuchsbeginn erhielten die NSG Mäuse für 24 h eine prophylaktische Analgesie mit Metamizol (vier Tropfen einer 500 mg/ml Metamizollösung in 100 ml Trinkwasser).

Am Tag der Operation wurde das vitale Tumorgewebe aufgetaut und in 50 ml PP-Röhrchen überführt, in welchem 5 ml PBS vorgelegt waren, um es vorsichtig zu waschen. Eine Petrischale wurde auf Eis gelagert und auf dieser je ein 50 µl-Tropfen Matrigel pro aufgetautem Gewebestück (pro Tumorfall vier Gewebestücke und Tropfen) pipettiert. Die Tumorstücke wurden in das Matrigel eingetaucht und bis zur Transplantation auf Eis gelagert (max. 30 min).

Die Allgemeinanästhesie wurde durch eine intraperitoneale Injektion einer Narkoselösung aus Ketamin und Xylazin eingeleitet (Dosierung: 90/6 mg/kg KG). Für die Dauer der Operation wurden die Tiere auf einer Wärmplatte bei 37,5°C gelagert. Um einem Austrocknen der Cor-

neae vorzubeugen, wurden die Augen mit einer Augensalbe bestrichen. Es wurden beide Flanken rasiert und eine dorsolaterale Inzision von maximal einem Zentimeter durchgeführt. Es erfolgte die stumpfe Präparation einer subkutanen Hauttasche, in welche ein Gewebstück (ca. 3 x 3 x 3 mm) implantiert wurde. Die Wunde wurde mit zwei Einzelknopfnähten verschlossen und es erfolgte eine Wunddesinfektion mit Octenisept. Anschließend wurden die Tiere durch das Licht einer Rotlichtlampe warmgehalten und bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.

Die ersten 14 postoperativen Tage erhielten die Mäuse antibiotikahaltiges Trinkwasser (Cotrimoxazol, Dosis: 8 mg Trimethoprim und 40 mg Sulfamethoxazol pro kg KG; gemäß GV-SOLAS; entspricht 2,5 ml/l Trinkwasser).

Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurde das Gewicht der Tiere und das Tumorstadium einmal wöchentlich dokumentiert. Das Allgemeinbefinden wurde anhand eines *Score-sheets* beurteilt. Die Tumorstadium wurde mittels Schieblehre bestimmt. Das Tumorstadium errechnete sich gemäß folgender Formel: $Volumen = 0,52 \cdot Länge \cdot Breite \cdot Höhe$.

3.2.2.2 XENOTRANSPLANTATION UND *IN VIVO* THERAPIE ZELLINIEN-ABGELEITETER XENOGRAFTS

Es wurden pro NSG Maus fünf Millionen HNSCC-Zellen in 50 µl PBS aufgenommen und subkutan in die rechte Flanke injiziert. Während des Beobachtungszeitraumes wurde einmal wöchentlich das Gewicht und Tumorstadium dokumentiert. Die Tumorstadium wurde mittels Schieblehre bestimmt.

Neben der Erfassung der *in vivo* Tumorigenität wurden auch Therapieversuche durchgeführt. Bei letztgenanntem wurden die Tiere ab einer Tumorstadium von ca. 4 x 4 mm in die Versuchsgruppen eingeteilt. Hierfür erhielten sie entweder einmal pro Woche eine intraperitoneale Injektion mit Cisplatin (6 mg/kg KG, q1Wx4) oder PBS in der gleichen Dosierung.

Hierbei wurden sämtliche Injektionen durch Frau M. Sc. N. Schönwälder durchgeführt.

3.2.2.3 VERSUCHSENDE UND GEWEBEENTNAHME

Der Versuch wurde anhand definierter Abbruchkriterien beendet. Zu diesen zählten u.a. eine Tumorstadium von ca. 10 x 10 mm, das Ende des Beobachtungszeitraumes (= sechs Monate nach Implantation), sowie eine gesundheitliche Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere (u.a. Ulzeration des Tumors).

Der Versuchsabschluss mit Tötung des Tieres erfolgte durch CO₂-Begasung und anschließende zervikale Dislokation, welche von PD Dr. C. Maletzki oder Frau M. Sc. N. Schönwälder durchgeführt wurde. *Post mortem* wurden die Tiere systematisch auf Metastasen untersucht.

Im Anschluss an die Tötung wurden die Tumoren unter möglichst sterilen Bedingungen reseziert. Hierfür wurde ein Hautschnitt gesetzt und das Tumorgewebe freipräpariert. Das entnommene Gewebestück wurde zur weiteren Prozessierung in steriler PBS-Lösung auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Tumorgewebe sowohl nativ, als auch vital asserviert und der Biobank zugeführt. Zusätzlich wurde ein Teil des Gewebes in Formalin fixiert, sowie ein weiterer Teil zur Herstellung einer Einzelzellsuspension verwendet, um Xenograft-abgeleitete Zelllinien zu etablieren (siehe 3.2.3.1 *Kollagenaseverdau für ex vivo Primärkulturen*).

3.2.3 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITEN

3.2.3.1 KOLLAGENASEVERDAU FÜR EX VIVO PRIMÄRKULTUREN

In Vorbereitung wurde die Kollagenase aliquotiert und verdünnt. Hierfür wurden zunächst 500 mg/ml Kollagenase in 5 ml 0,5 M Tris und 150 mM CaCl_2 gelöst, jeweils 250 μl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Um die Zielkonzentration von 2,5 mg/ml Kollagenase zu erreichen, wurde ein Aliquot einem PP-Röhrchen mit 9,75 ml PBS hinzugegeben.

Es wurden zwei Zellgewebestück der Größe 2 x 2 mm benötigt. Hierfür wurde ein Teil des PDX-Gewebes direkt nach Explantation genutzt. Es wurde darauf geachtet, dass es sich um vitales Gewebe ohne Einblutungen handelte. Unter sterilen Bedingungen wurden die Gewebestücke zweimal mit PBS gewaschen. Für den anschließenden Gewebeverdau wurden die Stücke in die Kollagenaselösung gegeben und für eineinhalb bis zwei Stunden bei 37°C kultiviert. Alle 5 bis 10 min wurde das PP-Röhrchen gevortext.

Anschließend wurden 10 ml 1x PBS hinzugegeben. Das Volumen wurde mit einer serologischen Pipette mehrfach auf- und abpipettiert, um eine Homogenisierung der Zellverteilung zu erzielen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und mit PBS gewaschen, bevor sie in Vollmedium resuspendiert wurden. Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml Vollmedium (DMEM/Hams F12 + 20 % FKS + 3 mM Glutamin + 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen.

Noch vorhandene Gewebestücke wurden mittels Filtration von Einzelzellen getrennt und in ein Well einer 6-well Platte gegeben. Dafür wurde ein 100 μm Cellstrainer über dem Well platziert und das in Vollmedium aufgenommene Zellpellet vorsichtig durch diesen gesiebt. Der Cellstrainer wurde um 180° gedreht, über ein weiteres Well gehalten und mit 5 ml Vollmedium gespült. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert und regelmäßig auf das Anwachsen einer Primärkultur überprüft.

3.2.3.2 ZELLKULTIVIERUNG

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei konstanter Temperatur von 37°C und einer CO₂-Sättigung von 5 % unter sterilen Bedingungen. Das Standardzellkulturmedium setzte sich zelllinienspezifisch aus DMEM/Hams F12 + 3 mM Glutamin + 1% Penicillin Streptomycin und 10 % FKS (HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2) bzw. 15 % FKS (HNSCC48 P0 M1) zusammen. Zweimal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.3.3 ZELLERNTTE

Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS gespült, erneut abgesaugt und mit 3,5 ml einer Trypsin-/Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) für 10 - 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde die Reaktion mit Standardmedium abgestoppt und die Suspension in 50 ml PP-Röhrchen überführt. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt.

3.2.3.4 ZELLZÄHLUNG MITTELS NEUBAUERZÄHLKAMMER

Der Zellsuspension wurden 50 µl entnommen und in eine unsterile 96-well Platte mit flachem Boden transferiert. Anschließend wurden 50 µl Trypanblau hinzugegeben. Der Suspension wurden 10 µl entnommen und in die Neubauerzählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden zwei bis vier der Großquadrate ausgezählt. Die gezählten Zellen wurden durch die Anzahl der ausgezählten Quadrate dividiert und mit der Verdünnung (1:2) und dem Kammerfaktor multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

3.2.3.5 KRYOKONSERVIERUNG UND REKULTIVIERUNG VON ZELLEN

Für die Langzeitasservierung von Zellen wurde ein *Freezing*-Medium (90 % FKS + 10 % DMSO) angesetzt, in welches die Zellen aufgenommen wurden. In einem *Freezing Container* (Mr. Frosty) wurden sie dann bei -80°C gelagert, wodurch sie um 1°C pro Minute herabgekühlt wurden. Im Anschluss wurden die Zellen dauerhaft bei -190°C in der Gasphase von Flüssigstickstoff gelagert.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut, in Standardmedium aufgenommen und mittels Zentrifugation (300 x g, 8 min) pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in Standardmedium resuspendiert.

3.2.3.6 PROLIFERATIONSINDEX

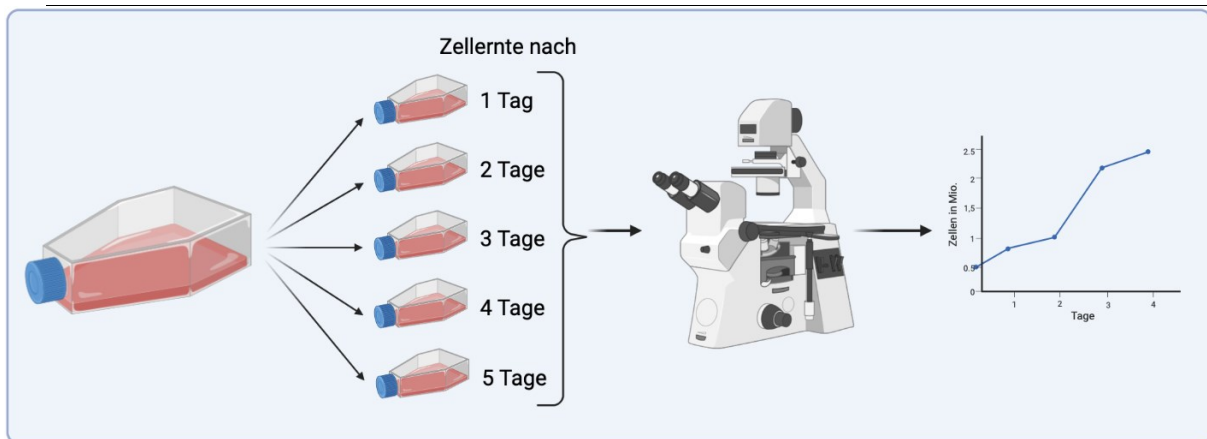


ABBILDUNG 5: METHODIK PROLIFERATIONSINDEX. ERSTELLT MIT BIORENDER.COM

Um die Proliferationskinetik der Zelllinien zu erfassen, wurden je 500.000 Zellen in fünf kleinere Zellkulturflaschen (T25 bzw. T75) ausgesät. Diese wurden im Abstand von je 24 h geerntet, um erneut die Zellzahl zu bestimmen. Die gewonnenen Daten wurden genutzt um die Verdopplungszeit der Zelllinien (PDT) auf Grundlage der folgenden Formel zu berechnen⁴¹:

$$PDT = T \cdot \frac{\ln 2}{\ln \frac{N_{expo}}{N_0}}$$

Dabei ist PDT die Verdopplungszeit der Zellkultur (in Stunden), T die Inkubationszeit (in Stunden), N_{expo} die Zellzahl am Ende der exponentiellen Wachstumsphase und N_0 die Zellzahl am Beginn der exponentiellen Wachstumsphase.

3.2.3.7 WOUND HEALING ASSAY

In einer 6-well Platte wurden 500.000 Zellen/Well ausgesät. Im Anschluss wurde die Platte im Brutschrank inkubiert, bis der gesamte Boden eines Wells mit einer Monolayerschicht bedeckt war. Dann wurde mit einer sterilen 200 µl-Pipettenspitze eine „Wunde“ (= *Scratch*) gezogen. Über die folgenden Tage wurde die gesetzte Wunde lichtmikroskopisch beobachtet und photographisch dokumentiert, bis diese vollständig verschlossen war.

3.2.3.8 INVASIONS-ASSAY

In Vorbereitung auf diesen Versuch wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt und für 24 h kultiviert.

Transwells wurden in einer 24-well Platte platziert und mit vorverdünntem Matrigel (80 µl Matrigel + 1920 µl serumfreies Medium) beschichtet. Es wurden 70 µl Matrigel pro Insert pipettiert, wobei eine Blasenbildung zu vermeiden war. Pro Transwell wurden fünf Millionen Zellen ausgesät und für 72 h im Brutschrank inkubiert. In die Wells, unterhalb der Transwells, wurde

serumhaltiges Medium pipettiert, sodass der Boden der Transwells davon berührt wurde. Die Platte inkubierte anschließend für 72 h bei 37°C.

Anschließend wurden die nicht invasiven Zellen von der Oberseite der Transwells entfernt und Medium und Zellen mit einer Pipettenspitze abgesaugt. Sie wurden mit 300 µl PBS gewaschen, bevor eventuell verbliebene Zellen mit leicht angefeuchteten Wattestäbchen entfernt wurden. Zwei weitere Male wurden die Well mit PBS gewaschen. In einer neuen 24-well Platte wurden 200 µl serumfreies Medium und 20 µl WST-1 Substanz vorgelegt. Hierhin wurden die Transwells überführt. Anschließend inkubierte die Platte für 90 min im Brutschrank, bevor 100 µl/Well in eine 96-well Platte überführt wurden. Die Messung wurde in Duplikaten am *Tecan Reader* durchgeführt. (Absorption: 450 nm, Referenzwellenlänge: 750 nm)

Dieser Versuch entspricht einer Kombination aus einem modifizierten *Boyden-Chamber-Assay* und einem WST1-Assay^{42,43} und wurde freundlicherweise von Frau M. Sc. N. Schönwälder durchgeführt.

3.2.3.9 DOSISREIHENTESTUNG

Für die Bestimmung der dosisabhängigen Reaktion der Zellen auf verschiedene Testsubstanzen wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in 96-well Platten mit flachem Boden ausgesät (Zelllinien-spezifisch: 5.000 bis 20.000 Zellen/Well). Die Zellen inkubierten für 24 h im Brutschrank, um am Plattenboden zu adhären. Anschließend wurden sie erstmalig und nach weiteren 72 h erneut mit verschiedenen Wirkstoffdosen behandelt. Dieses Procedere wurde für alle folgenden Versuche gleichermaßen durchgeführt.

Die Testungen erfolgten stets in Triplikaten. 72 h nach der zweiten Behandlung wurde die Biomasse mittels Kristallviolett bestimmt. Die mithilfe einer photometrischen Messung gewonnenen Daten wurden genutzt, um die Konzentration zu bestimmen, bei welcher nach den zwei Zyklen der Behandlung noch ca. 80% der Zellen vital sind (IC₂₀).

3.2.3.10 KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG (KV)

Diese Färbung erlaubt eine quantitative Aussage über die Biomasse einer Zellkultur in Monolayerschicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium der Kultur verworfen. Anschließend wurde die Platte vorsichtig mit 100 µl/Well 1x PBS gespült, bevor je 50 µl der 0,2 %igen KV-Lösung in die Wells gegeben wurden. Die Platte inkubierte für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Danach wurde die Kristallviolettlösung verworfen, die Platte mit 100 µl/Well zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und auf Papiertüchern abgeklopft. Nachdem die Platte getrocknet war, wurden 100 µl/Well einer 1 %igen Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) hinzugegeben. Erneut inkubierte die Platte bei Raumtemperatur für 10 min auf einem Schüttler. Die photometrische Messung fand am *GloMax* mit einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge: 620 nm) statt.

3.2.3.11 KOMBINATIONSTESTUNGEN

Die IC₂₀-Dosen der verschiedenen zuvor in Monotherapie getesteten Substanzen wurden kombiniert, um eine Aussage über potentiell synergistische, additive bzw. antagonistische Effekte zu treffen. Dabei wurden Zellen in Triplikaten in 96-well Platten mit flachem Boden ausgesät (Zelllinien-spezifisch: 5.000 bis 20.000 Zellen/Well), adhärten über Nacht und wurden danach behandelt. Es wurden zwei verschiedene Ansätze für die Testung gewählt.

Für die simultane Kombination wurden die Zellen mit zwei Substanzen gemeinsam für zwei Zyklen von je 72 h behandelt.

Für die sequentielle Kombination wurden die Zellen nacheinander mit zwei verschiedenen Substanzen für jeweils 72 h behandelt. Die Substanzen wurden in den beiden möglichen Reihenfolgen verwandt.

Sowohl beim simultanen, als auch beim sequentiellen Ansatz wurde im Anschluss an die zwei Behandlungszyklen eine KV-Färbung durchgeführt.

Um eine Aussage über das Zusammenwirken der verschiedenen Substanzen treffen zu können, wurde die Unabhängigkeit nach Bliss bestimmt. Hierfür wurde die folgende Formel genutzt:

$$Y_{ab,P} = Y_a + Y_b - Y_a Y_b$$

Dabei ist a die Dosis der Substanz A und b die Dosis der Substanz B, Y_a die prozentuale Inhibition des Tumorwachstums für a und Y_b die prozentuale Inhibition des Tumorwachstums für b. $Y_{ab,P}$ bezeichnet die vorhersagbare kombinierte prozentuale Inhibition, wenn die Substanzen A und B unabhängig wirken. $Y_{ab,O}$ bezeichnet dann die beobachtete kombinierte prozentuale Inhibition. Ist $Y_{ab,O} > Y_{ab,P}$ wirken die Substanzen synergistisch, gilt $Y_{ab,O} = Y_{ab,P}$ wirken sie additiv, aber unabhängig voneinander und bei $Y_{ab,O} < Y_{ab,P}$ wirken sie antagonistisch.

3.2.3.12 NACHWEIS VON AUTOPHAGIE

In 8-*Chamber Slides* wurden unter sterilen Bedingungen je 150.000 Zellen in 200 µl Medium pro Kammer ausgesät und 2 x 72 h mit vorausgewählten Mono- und Kombinationstherapien behandelt. Nach Beendigung des zweiten Behandlungszyklus wurde der Überstand abgesaugt und einmal vorsichtig mit PBS gespült. Es wurde eine Acridinorange Stock Lösung hergestellt, bestehend aus 200 mg Acridinorange, 450 mg Natriumchlorid und 500 ml *Aqua dest.* Vor Gebrauch wurde diese Lösung im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Zu dieser Arbeitslösung wurde Calcein AM hinzugegeben, welches im Verhältnis 1:250 in Acridinorange verdünnt wurde (Stock: 4 mM).

Pro Kammer wurden dann 50 µl der Acridinorange/Calcein AM Lösung hinzugegeben und für 15 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl PBS abgestoppt und der Überstand abgesaugt. Erneut wurden 400 µl pro Kammer

hinzugegeben. Bis zur Analyse am *Laser-Scanning* Mikroskop wurden die *Slides* bei 4°C gelagert.

3.2.3.13 SENESZENZ

In einer 24-well Platte wurden je 400.000 Zellen in 500 µl Medium ausgesät und für 2 x 72 h mit ausgewählten Mono- und Kombinationstherapien behandelt. Nach Beendigung des zweiten Zyklus (= 72 h nach der zweiten Behandlung) wurden die Zellen entsprechend der Anleitung des Seneszenz-Kits gefärbt. In Vorbereitung hierfür wurde das 10x PBS auf 1x PBS verdünnt und mit diesem eine 1x Fixationspuffer-Lösung hergestellt. Zusätzlich wurde die Färbelösung, bestehend aus Reagenz A, Reagenz B, Reagenz C, 5-Brom-4-chlor-3-inoxyl-β-D-galactopyranosid (xGal) und 1x PBS aus dem Kit im Verhältnis 1:1:1:5:92 angesetzt. Die Lösung wurde mit Natriumhydroxid und Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 titriert.

Der Überstand der Behandlungen wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie 15 min mit je 200 µl/Well 1x Fixationspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer wurde abgenommen und die Zellen erneut dreimalig mit 1x PBS gewaschen, bevor 200 µl/Well Färbelösung hinzugegeben wurden. Unter CO₂-Ausschluss inkubierten die Zellen über Nacht bei 37°C. Hierbei wurde die Well-Platte mit Para- und Tesafilm luftdicht verschlossen. Vor der Mikroskopie am Folgetag wurde die Färbelösung abgenommen und 1x PBS zu den Zellen gegeben. Die semiquantitative Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

3.2.4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNGEN

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse verschiedener Parameter von Zellen innerhalb einer heterogenen Population⁴⁴.

Das allgemeine Funktionsprinzip einer durchflusszytometrischen Messung beruht auf Zellen, die sich mit hoher Geschwindigkeit im Durchflusszytometer, der so genannten Flusskammer, einer schmalen Messkammer, bewegen und hier mit Lasern bestrahlt werden. Gelangt eine Zelle in den Laserstrahl, kommt es zur Streuung des Lichtes in alle Richtungen⁴⁴. Hierbei wird unterschieden in die Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC)⁴⁴. Als FSC wird der Teil des gestreuten Lichts definiert, der in die gleiche Richtung strahlt wie der Laser. Das Ausmaß der Streuung in dieser Richtung ist proportional zur Größe der Zelle⁴⁴. Streuung in andere Richtungen wird als SSC zusammengefasst. Die intrazelluläre Granularität und strukturelle Komplexität führt zur Reflexion des Laserstrahls, weshalb der SSC eine Aussage über diese Parameter trifft. Für gewöhnlich wird der SSC im 90°-Winkel zum Laser detektiert und gemessen⁴⁴.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Zellen gearbeitet, die mit unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern gefärbt wurden, die spezifische Oberflächenantigene auf bzw. an

Zellen binden. Beim Durchfluss durch die Messkammer wird das Fluoreszenzsignal durch die Laser angeregt. Bei dem in dieser Arbeit genutzten Gerät standen ein blauer (488 nm) und ein roter Laser (633 nm) zur Verfügung. Von Detektoren werden diese Signale, sowie FSC und SSC registriert. Die Zellzahl wird erhoben, ebenso wie die Zellgröße, -konfiguration und Intensität der Fluoreszenzsignale. Diese Daten werden vom Durchflusszytometer verarbeitet, ausgewertet und grafisch dargestellt.

Alle in dieser Arbeit erhobenen durchflusszytometrischen Daten wurden am BD FACS Verse™ gemessen. Im Live Gate wurden 20.000 Events gemessen und mit der BD FACSSuite™ Software ausgewertet.

3.2.4.1 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG VON HUMANEM TUMORGEWEBE UND BLUT

Zur Phänotypisierung der Primärtumoren und zur Erhebung des allgemeinen Immunstatus wurden in einer 96-well Platte mit konischem Boden jeweils 2 µl pro Antikörper entsprechend der folgenden Liste vorgelegt (~ 1 µg):

Ansatz	Antikörper
1	ungefärbte Probe
2	CD3 FITC / CD4 PE / CD25 APC
3	CD3 FITC / CD8 PE / CD25 APC
4	CD3 FITC / CD56 PE / CD16 APC
5	CD69 PE / CD19 APC
6	LAG-3 FITC / CD152 PE / CD366 APC / CD174 PECy7
7	CD70 FITC / CD276 PE / CD273 APC
8	CD14 FITC / CD204 PE / CD169 APC / CD163 PECy7
9	CD3 FITC / CD276 PE / CD273 APC / CD274 PECy7
10	CD14 FITC / HLA-DR PE
11	CD3 FITC / CD4 PE / CD279 APC
12	CD326 Alexa 488 / HLA-A2 PE

TABELLE 1: VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DEREN KOMBINATIONSANSÄTZE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG.

Aus dem primären Tumorgewebe wurde mithilfe eines 40 µm *Cellstrainers* eine Einzelzellsuspension hergestellt. Von dieser wurden je 50 µl in die 96-well Platte transferiert. Zusätzlich wurden 100 µl Vollblut in 550 µl PBS verdünnt. Auch hiervon wurden je 50 µl in 12 Wells derselben Platte überführt. Die Platte inkubierte lichtgeschützt für 30 min bei 4°C. Im Anschluss wurde das Vollblut mit 200 µl Erylysepuffer versetzt und inkubiert für 15 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl PBS abgestoppt. Die Platte wurde bei 300 x g für 8 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 200 µl PBS resuspendiert.

Bis zur Messung am BD FACS Verse™ wurde die Platte bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

3.2.4.2 PHÄNOTYPISIERUNG

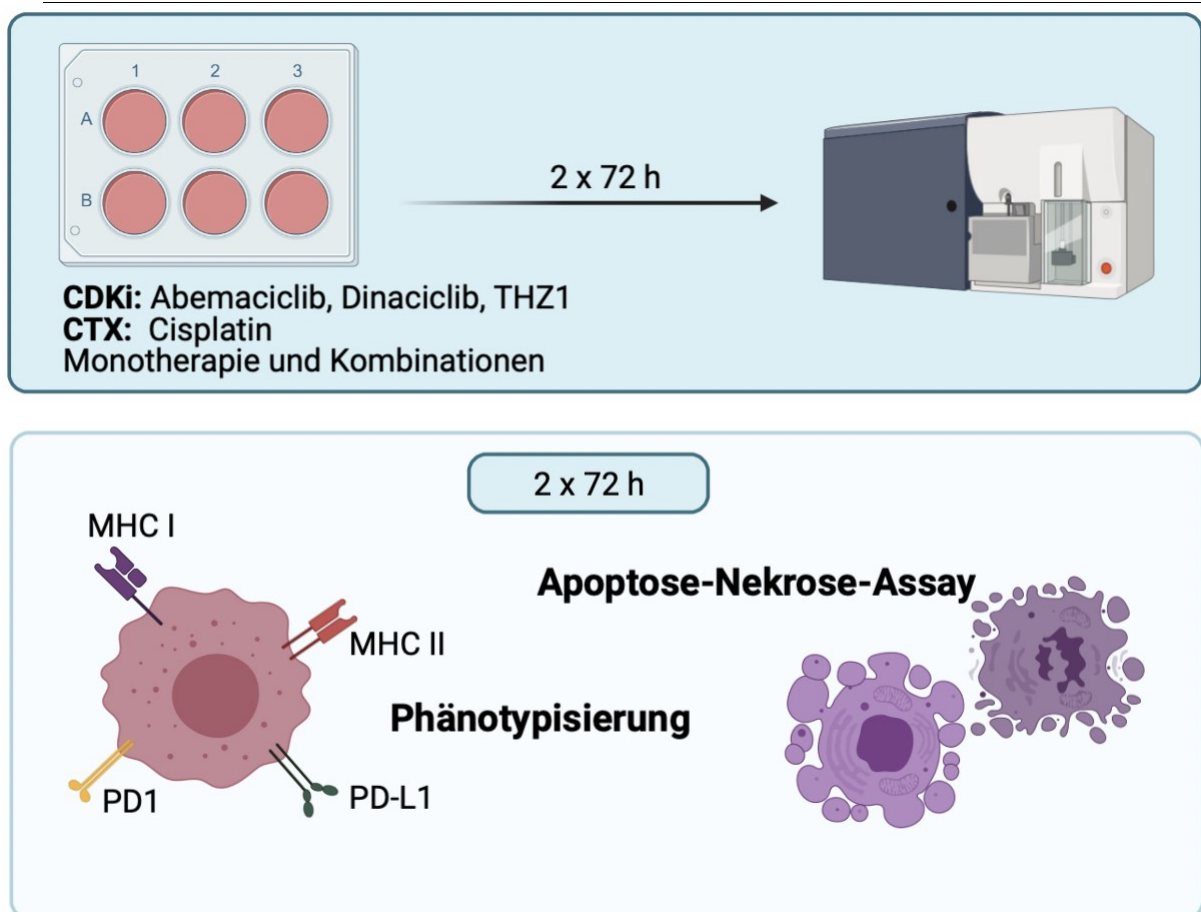


ABBILDUNG 6: METHODIK PHÄNOTYPISIERUNG UND APOPTOSE-NEKROSE-ASSAY. ERSTELLT MIT BIORENDER.COM

In einer 6-well Platte mit flachem Boden wurden unter sterilen Bedingungen 500.000 Zellen/Well ausgesät und für 2 x 72 h mit zuvor ausgewählten Mono- und Kombinationstherapien behandelt. Nach dem zweiten Behandlungszyklus wurde der Überstand verworfen, die Zellen geerntet und in FACS Tubes überführt. Die Wells wurden noch einmal mit 500 µl PBS gewaschen, welches anschließend ebenfalls in die FACS Tubes gegeben wurde. Die FACS Tubes

wurden für 8 min bei 300 x g zentrifugiert. Währenddessen wurde ein Antikörpergemisch aus je 2 µl je Antikörper (HLA-ABC, HLA-DR, PD1, PD-L1, je 2 µl/Antikörper in 2 mM EDTA, 2% bovines Serumalbumin; ~ 1 µg) erstellt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand aus den FACS Tubes dekantiert, das Antikörpergemisch hinzugegeben und für 30 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl PBS abgestoppt, die Zellen erneut bei 300 x g für 8 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zuletzt wurde das Zellpellet in 200 µl PBS pro Tube resuspendiert. Bis zur Messung am BD FACS Verse™ wurden die Proben bei 4°C gelagert.

3.2.4.3 APOPTOSE-NEKROSE-ASSAY

Die Zellen wurden ausgesät und behandelt, wie zuvor unter Punkt 3.2.4.2 *Phänotypisierung* beschrieben. Für den Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde eine Yo-Pro1- und Propidiumiodid (PI)-Messung durchgeführt. Die Färbung hierfür erfolgte im Dunkeln.

Der Überstand der behandelten Zellen wurde in FACS Röhrchen überführt, die Wells mit 200 µl PBS gespült und auch dieses in die FACS Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und zum Überstand gegeben.

Die Zellen wurden bei 300 x g für 8 min pelletiert und der Überstand anschließend dekantiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 200 µl Färbelösung (Yo-Pro, 1:5000 mit PBS verdünnt) resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit PBS abgestoppt und die Zellen erneut bei 300 x g für 8 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Kurz vor der Messung wurden 50 µl PI pro FACS Röhrchen hinzugegeben. Bis zur Messung am BD FACS Verse™ wurden die Proben bei 4°C gelagert (FL1 – Yo-Pro: Ex/Em: 491 nm/509 nm; FL3 – PI: Ex/Em: 488 nm/615 nm).

3.2.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.5.1 FINGERPRINT PCR

Zunächst wurde genomische DNA (gDNA) aus dem Tumorprimärgewebe, dem dazugehörigen Xenograft und den entsprechenden daraus etablierten Zelllinien isoliert. Die Isolation der gDNA und die folgende PCR wurde von Frau M. Sc. N. Schönwälder und Herrn Dr. B. Schneider durchgeführt. Für die Durchführung der PCR wurden 25 ng Probenmaterial pro Reaktion eingesetzt. Die Primer wurden vorab bereits gelöst und Multiplexe erstellt. Folgende Mikrosatellitenmarker wurden untersucht: CSF1; TPOX; TH01; vWA; D5S818; D7S820; D16S539; D13S317; Amelogenin.

Es wurde ein Mastermix angelegt und in PCR-Tubes vorgelegt. Anschließend wurden die 25 ng gDNA pro Reaktion hinzugegeben.

Bestandteil	Volumen/Reaktion (µl)
gDNA (12,5 – 25 ng)	x µl
10X PCR- Puffer komplett (BIORON)	1,25
dNTP-Mix	0,25
Primer-Mix PM1 (final:0,2µM/Primer)	4,5
DFS-Taq	0,1
A. dest ad	Σ 12,5

TABELLE 2: METHODIK FINGERPRINT PCR.

Es wurden die Cycling-Bedingungen eingehalten:

96°C	2 min	} 30x
94°C	30 sek	
59°C	2 min	
72°C	1,5 min	
60°C	45 min	
4°C	∞	

Danach wurden die Proben sofort auf Eis gelagert. Für die sich anschließende Multiplex-PCR wurden die PCR-Proben nach der Reaktion 1:10 mit dH₂O verdünnt, wofür jeweils 112,5 µl dH₂O in die PCR Tubes gegeben wurde.

Je Reaktion wurde ein Mastermix aus 23,7 µl Hi-Di® und 0,3 µl LIZ-500 angesetzt. 24 µl des Mixes wurden in einer 96-well Multiply Half-Skirt-Platte vorgelegt und 1 µl der 1:10-PCR-Produkt-Verdünnung hinzugegeben. Die Platte wurde mit Optical-Clear Klebefolien verschlossen und abschließend kurz anzentrifugiert. Die Platte wurde bis zur finalen Auswertung nicht entsorgt. Die eigentliche Analyse erfolgte durch das Molekularpathologische Labor des Instituts für Pathologie der Universität Rostock. Zur Fragmentlängenanalyse mittels Elektrophorese wurde ein ABI PRISM™ 3500 *Genetic Analyzer* mit einem achtfachen Kapillarsystem eingesetzt.

3.2.5.2 CYTO-FLUORESZENZ *IN SITU* HYBRIDISIERUNG (CYTO-FISH)

Für die Überprüfung genspezifischer Aberrationen wurden je 30.000 Zellen pro Zelllinie mit dem SHANDON cytospin3 Zentrifugen-Zellpräparationssystem auf einem beschichteten Objektträger fixiert. Anschließend fand die Zentrifugation für 10 min bei 700 U/min statt. Nach 24 h wurde die genspezifische Färbung von *CDKN2A* und *CDK4* gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dieser Versuch wurde freundlicherweise von Frau M. Sc. N. Schönwälder und Herrn Dr. B. Schneider des Instituts für Pathologie durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde in enger Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie "Otto Körner" sowie dem Institut für Pathologie mit dem Aufbau einer HNSCC-Biobank begonnen⁴⁵. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese fortgeführt. Zudem wurde PDX-Gewebe verwendet, um hieraus Zelllinien zu etablieren, welche im folgenden Kapitel näher charakterisiert werden sollen.

4.1 BASALE CHARAKTERISIERUNG PDX-ABGELEITETER ZELLINIEN

4.1.1 KLINISCHE DATEN

In dieser Arbeit konnten drei Zelllinien aus individuellen PDX etabliert werden: HNSCC16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 und HNSCC48 P0 M1. Dabei steht das P für die Xenograftpassage und das M für die Mausnummer.

Die klinischen Falldaten werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	HNSCC 16 P1 M1	HNSCC46 P0 M2	HNSCC48 P0 M1
Alter, Geschlecht	82, m	69, m	63, m
TNM-Klassifikation	rpT4a pN0 cM0 G2	pT3 pN3b cM0 G2	pT3 pN3 cM0 G2
Lokalisation	Larynx	Hypopharynx	Lymphknoten (Primarius: Mundboden)
Art	Rezidiv	Primarius	Metastase
p16	-	+	-
HPV	-	-	-
Noxen	Nichtraucher	Nikotin, C2	Nichtraucher
Behandlung	OP (2008), Radiatio (2015), OP (2020)	OP (später adjuvante RCT)	RCT (64 Gy, Cisplatin), OP, (später Nivolumab)
Follow-up	lebend	†	†

TABELLE 3: KLINISCHE DATEN DER STUDIENFÄLLE UND DAZUGEHÖRIGEN ZELLINIEN HNSCC16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 UND HNSCC48 P0 M1.

SPÄTER: POSTOPERATIV. RCT: RADIOCHEMOTHERAPIE.

In der folgenden Abbildung sind die Zelllinien jeweils in einer niedrigen und hohen Passage dargestellt:

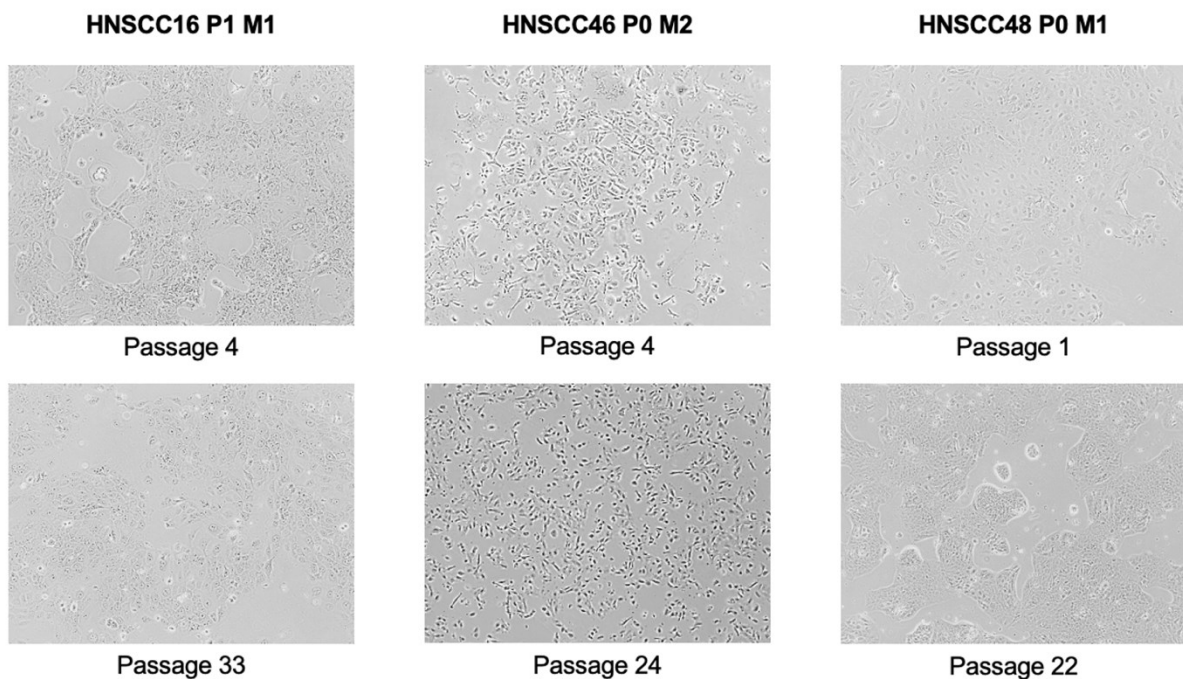


ABBILDUNG 7: LICHTMIKROSKOPISCHE FOTOGRAFIEEN DER ZELLINIEN. JEWEILS IN FRÜHER UND SPÄTERER PASSAGE. VERGRÖßERUNG: 100 X.

Die Zellen aller Zelllinien zeichneten sich durch ein adhärentes Wachstum als konfluente Monolayerschicht am Boden der Zellkulturflaschen mit epithelialen Charakteristika aus. Die Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC48 P0 M1 wiesen sich durch ein clusterartiges Wachstum aus, wohingegen HNSCC46 P0 M2 eher durch vereinzelte Zellen auffiel.

Die Zellen der HNSCC16 P1 M1 waren deutlich größer, als die der Zelllinie HNSCC46 P0 M2. Die Zelllinie HNSCC48 P0 M1 veränderte im Rahmen der Kultivierung ihre Morphologie, so dass in frühen Passagen ein größerer, in späteren Passagen ein kleinerer Zellklon dominierte.

4.1.2 HISTOPATHOLOGIE UND TUMORMIKROMILIEU DES PRIMÄREN TUMORGEWEBES

In allen drei Fällen zeigte sich das histologische Muster eines mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinoms (Abbildung 8). Während sich bei Fall HNSCC48 ein für *TP53*-Mutationen typisches Expressionsmuster zeigte, war das p53-Expressionsmuster für HNSCC16 und HNSCC46 nicht mutationsspezifisch.

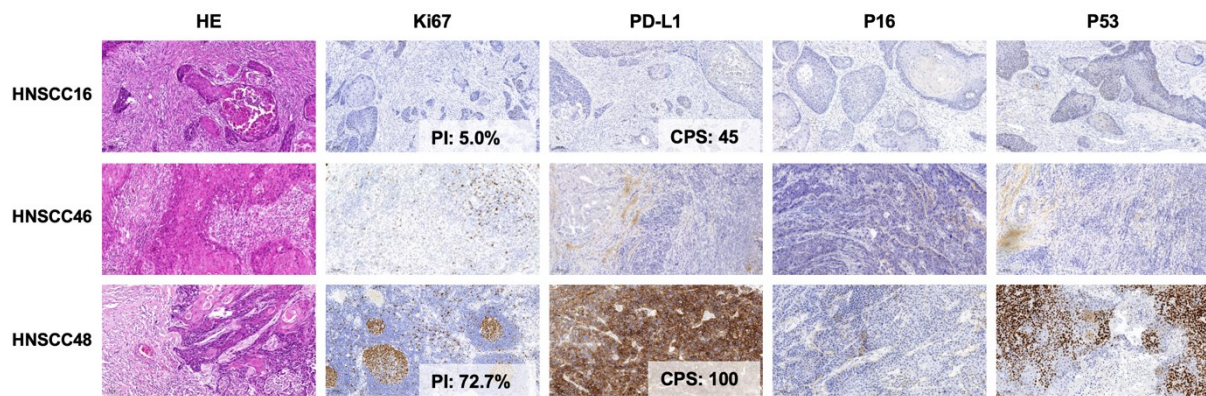


ABBILDUNG 8: REPRÄSENTATIVE MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER TUMORFÄLLE. TUMORFÄLLE HNSCC16, HNSCC46 UND HNSCC48 IN HE-, KI67-, PD-L1-, P16- UND P53-FÄRBUNG.

Aufgrund von verarbeitungsbedingten Artefakten sind die Daten der Immunhistochemie (Ki-67, p53, PD-L1) für HNSCC46 nicht vollständig auswertbar.

Es zeigte sich ein heterogenes Tumormikromilieu (TME). Die stärkste lymphozytäre Infiltration war im Fall HNSCC16 nachweisbar. Hier wurden $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ T-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen detektiert. Jeder der Fälle zeigte eine Infiltration mit $CD16^+CD56^+$ natürlichen Killerzellen, eine besonders hohe Dichte war im Fall HNSCC46 zu verzeichnen. Zudem war in diesem Fall die höchste Zahl an Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) nachweisbar.

Infiltrierende $CD3^+$ T-Zellen waren zu einem geringen Anteil ebenfalls $CD274^+$ (= PD-L1), wobei für HNSCC48 keine entsprechenden Daten vorliegen.

Etwa 15 % der T-Zellen waren $CD273^+$ (= PD-L2), wobei die Werte zwischen den drei HNSCC-Fällen vergleichbar waren. Demgegenüber war der Anteil $CD276^+$ Zellen (= B7-H3) heterogen und bei HNSCC46 bzw. HNSCC48 im Vergleich zu HNSCC16 erhöht.

4.1.3 QUALITÄTSKONTROLLE UND VERGLEICHENDE ANALYSE DES MOLEKULAREN PROFILS SOWIE NACHWEIS GENSPEZIFISCHER VERÄNDERUNGEN VON *CDK4* UND *CDKN2A*

Mithilfe der Fingerprint-PCR konnte die Übereinstimmung der Zelllinien mit den entsprechenden Primär- und PDX-Geweben validiert werden. Diese Analyse bestätigte die Authentizität innerhalb eines Falls, sodass Verwechslungen oder Kreuzkontaminationen innerhalb der *ex vivo* Prozessierung ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 9).

Darüber hinaus wurde das Mutationsprofil mithilfe des *Cancer Hotspot Panels* erfasst. Hierbei werden die 50 häufigsten genetischen Aberrationen (Hotspotmutationen) untersucht. Beim Fall HNSCC48 wurde die *CDKN2A*-Mutation p.R58* und die *SMAD4*-Mutation p.R135* gefunden. Beide Mutationen werden als pathogen klassifiziert und führen zur Entstehung eines trunkierten, funktionslosen Proteins (*loss of functions mutation*).

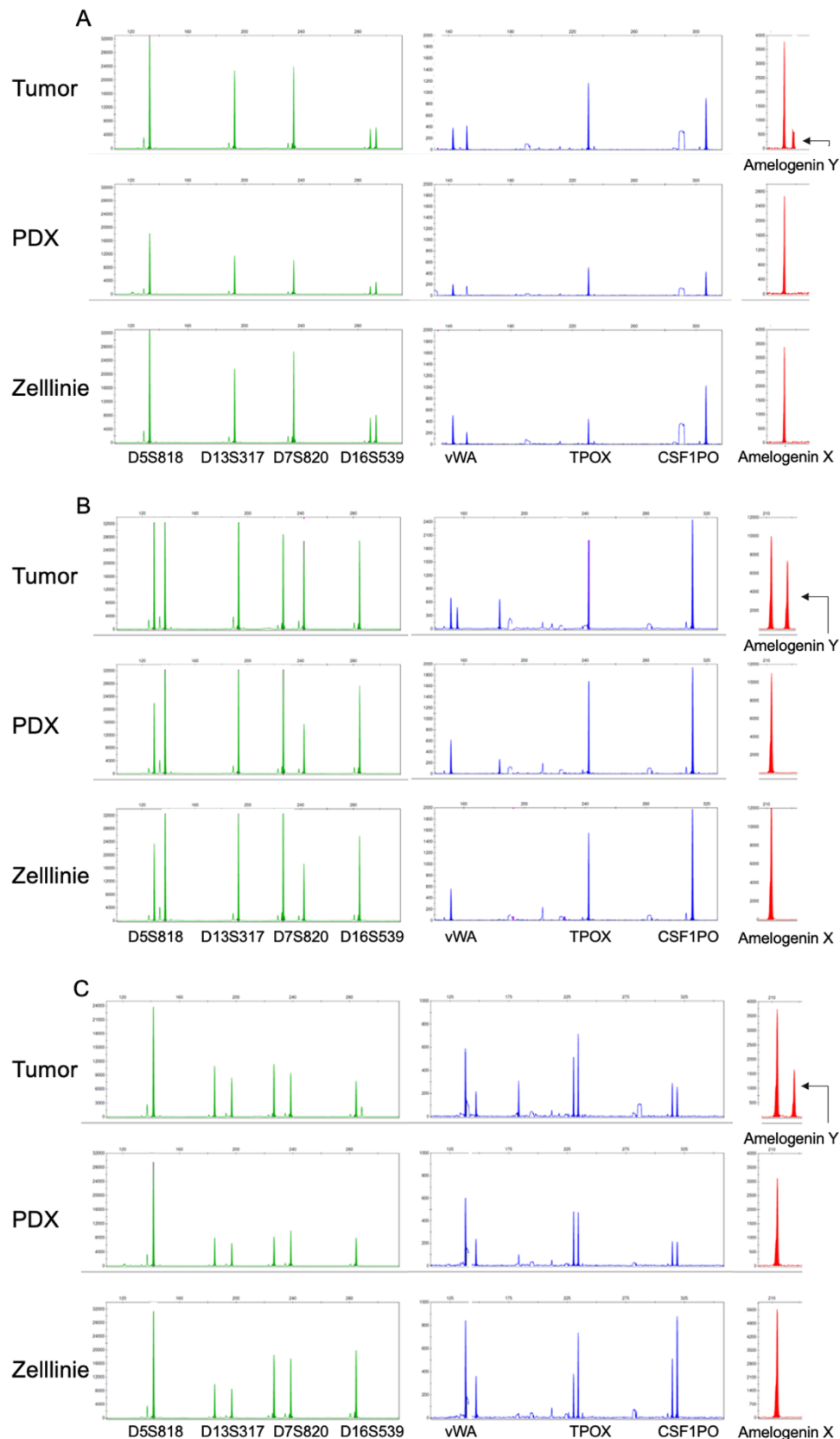


ABBILDUNG 9: FINGERPRINT-PCR DES PRIMÄR-, PDX-GEWEBES UND DER ZELLINIEN. (A) *HNSCC16* (B) *HNSCC46* (C) *HNSCC48*. ZUR BESTÄTIGUNG MIT DER PATIENTENIDENTITÄT. BENUTZTE LOCI: *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *vWA*, *THO1*, *TPOX*, *CSF1PO* UND *AMELOGENIN X* UND *Y*. HEX (GRÜN), FAM (BLAU), TAMRA (ROT).

Die Allelfrequenzen (*Variant allele frequency*, VAF) der einzelnen Mutationen ergaben, mit Ausnahme des Falls HNSCC48, höhere VAFs in den PDX und Zelllinien im Vergleich zu den Tumoren der Patienten, welche vermutlich auf einen höheren Anteil an Tumorzellen in den letztgenannten zurückzuführen ist.

Darüber hinaus wurden genspezifische Aberrationen von *CDKN2A* (auf Chromosom 9p21) und *CDK4* als Biomarker für eine CDKi-Behandlung erfasst. Alle Zelllinien wiesen eine Chromosom-9-Polysomie mit hoher Kopienzahl des jeweiligen Zentromers auf (Abbildung 10). Bei HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2 entsprach der *CDKN2A*-Zuwachs den Kopien von Chromosom 9. Im Falle der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 wurden weniger Kopien des *CDKN2A*-Gens im Vergleich zur Anzahl der Kopien des Zentromers von Chromosom 9 gefunden (Verhältnis 3:1). Dies deutet auf eine genspezifische *CDKN2A*-Deletion hin und bestätigt die Sequenzierungsdaten.

CDK4 ist ein spezifisches Targetmolekül selektiver CDKis. HNSCC16 P1 M1 und HNSCC48 P0 M1 wiesen eine Polysomie des Chromosoms 12 auf, wobei letzteres vier bis sechs Chromosomen pro Zelle aufwies (Abbildung 9). Dies ging mit einem Anstieg der genspezifischen Kopienzahlen einher, der bei HNSCC48 P0 M1 am stärksten ausgeprägt war.

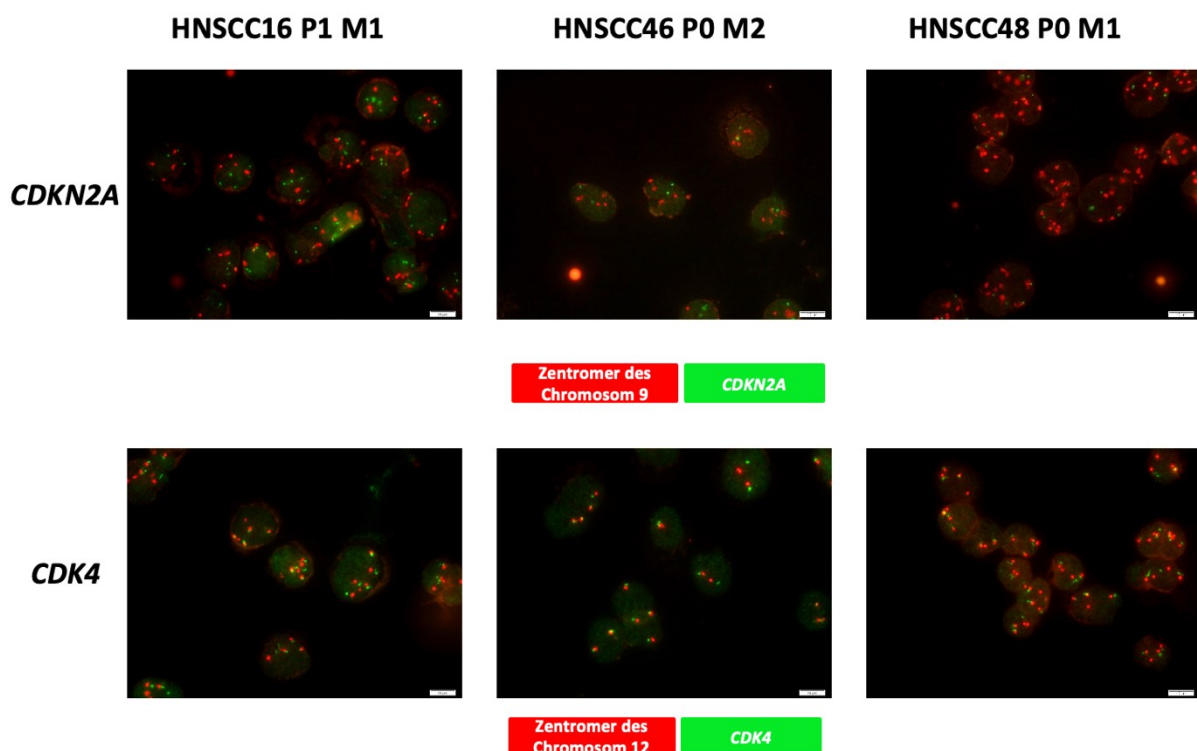


ABBILDUNG 10: CYTO-FISH FÜR *CDKN2A* UND *CDK4*. CYTOSPINS VON HNSCC-ZELLINIEN WURDEN MIT DER SPEC *CDK4/CEN 12 DUAL COLOR PROBE* ODER SPEC *CDKN2A/CEN9 DUAL COLOR PROBE* ANGEFÄRBT, UM DIE GENSPEZIFISCHE AMPLIFIKATION VON *CDKN2A* UND *CDK4* ZU ÜBERPRÜFEN. DIE ROTEN PUNKTE ZEIGEN DIE ZENTROMERE UND DIE GRÜNEN PUNKTE DAS SPEZIFISCHE GEN AN. DIE AUSLESUNG ERFOLGTE MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP OLYMPUS BX53. ORIGINALVERGRÖßERUNG: 1000 X.

4.1.4 VERDOPPLUNGSZEIT DER ZELLPOPULATIONEN

Die Verdopplungszeiten (*population doubling time*, PDT) der drei Zelllinien wurden untersucht und untereinander verglichen. Dabei zeigte sich die höchste Proliferationsrate bei der HNSCC48 P0 M1 (30,70 h \pm 4,12 h), gefolgt von der HNSCC16 P1 M1 (35,65 h \pm 6,16 h) und HNSCC46 P0 M2 (44,87 h \pm 3,90 h). In der nachfolgenden Abbildung 11 sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen dargestellt, wobei Tag 1 dem ersten Tag nach der Aussaat einer definierten Zellzahl (500.000 Zellen) entspricht.

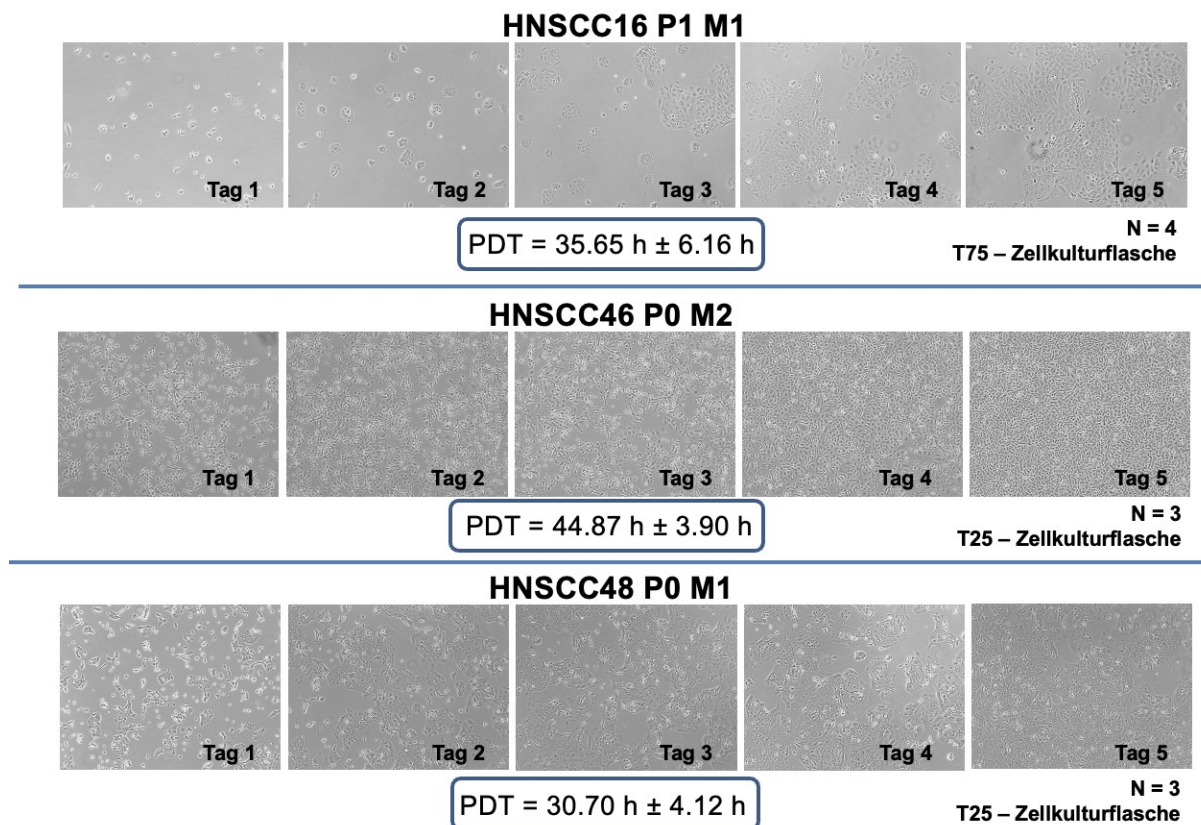


ABBILDUNG 11: PROLIFERATIONSINDEX. DAS PROLIFERATIONSVERHÄLTNISS DER ZELLINIEN WURDE ÜBER FÜNF TAGE BEOBSACHTET UND LICHTMIKROSKOPISCH DOKUMENTIERT. ORIGINALVERGRÖßERUNG: 100 X. DARGESTELLT SIND REPRÄSENTATIVE BILDER ZUM JEWEILIGEN DOKUMENTATIONSZEITPUNKT. UNTER DER ABBILDUNG IST DIE ERMITTELTE POPULATION DOUBLING TIME (PDT) \pm SD ANGEZEIGT, RESULTIEREND AUS N=3 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN.

4.1.5 WOUND HEALING ASSAY UND INVASIONS-ASSAY

Mit einer Pipettenspitze wurde in einer geschlossenen Monolayerschicht eine Wunde gesetzt. Über die folgenden Tage wurde diese lichtmikroskopisch begutachtet und fotografisch dokumentiert, um das Wundheilungs- bzw. Proliferations-/Migrationspotential der Zelllinien zu untersuchen. Repräsentative Aufnahmen sind in der Abbildung 12 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass die Wunde der Zelllinie HNSCC46 P0 M2 bereits nach einem Tag eine deutlich verringerte Breite aufweist und nach zwei Tagen komplett geschlossen ist. Ein

vergleichbares Wundheilungspotential zeigte sich bei der Zelllinie HNSCC16 P1 M1. Nach einem Tag ist keine scharfe Begrenzung der Wundränder mehr erkennbar, nach einem weiteren Tag liegt eine konfluierende Zellschicht vor.

Im direkten Vergleich mit den genannten Zelllinien zeigte die HNSCC48 P0 M1 ein geringeres Proliferations- bzw. Migrationspotential. Zwar ist auch hier nach etwa einem Tag eine beginnende Zellproliferation am Wundrand zu erkennen, eine vollständig konfluente Zellschicht ist jedoch erst nach acht Tagen zu beobachten.

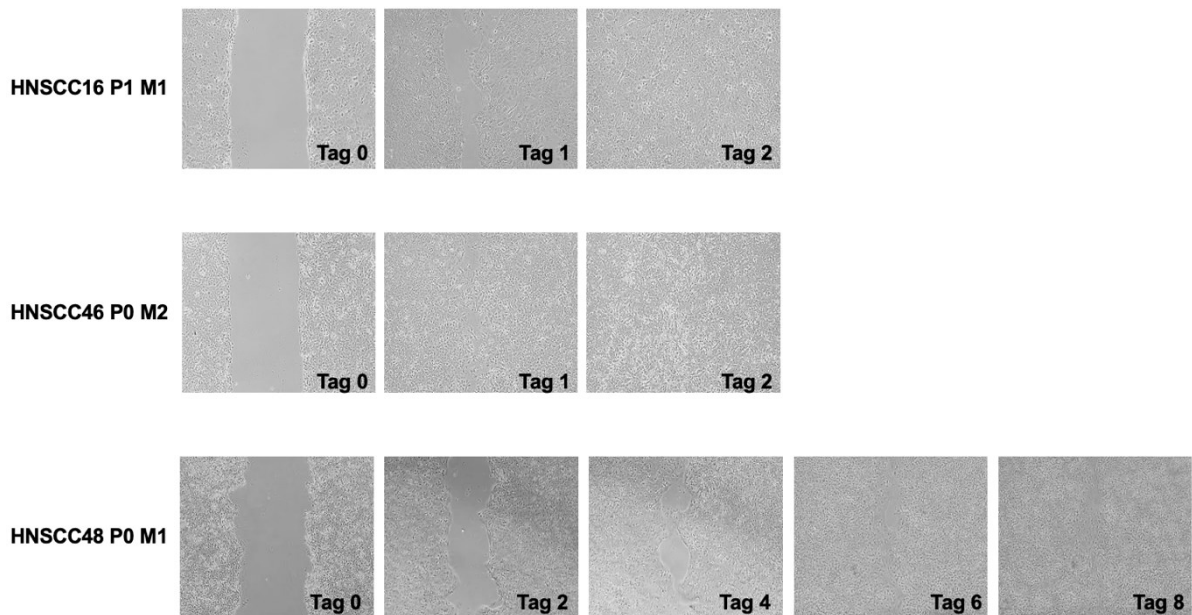


ABBILDUNG 12: MIGRATION. DAS MIGRATIONSPOTENTIAL WURDE MITTELS WOUND HEALING-ASSAY UNTERSUCHT. DIE ZUGEFÜGTE WUNDE WURDE TÄGLICH LICHTMIKROSKOPISCH BEOBACHTET, BIS DIE WUNDE GESCHLOSSEN WAR. ORIGINALVERGRÖßERUNG: 100 X.

Das Invasionspotential der drei Zelllinien wurde mittels Invasions-Assay (modifizierter *Boyden-Chamber*-Assay und WST1-Assay) mit dem der Zelllinie UT-SCC-15 (Zelllinie abgeleitet von der Lymphknotenmetastase eines HNSCC) verglichen, für welche bereits aus Vorarbeiten Vergleichswerte vorlagen⁴². Es zeigte sich, dass sich die Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2 durch ein höheres Invasionspotential auszeichneten, als UT-SCC-15 und HNSCC48 P0 M1. Es zeigen sich so übereinstimmende Ergebnisse der Migration und Invasion. Während die Zelllinie HNSCC48 P0 M1 ein geringeres Invasionspotential zeigte, benötigte auch die zugefügte Wunde im vorhergehenden Versuch länger, um sich zu verschließen.

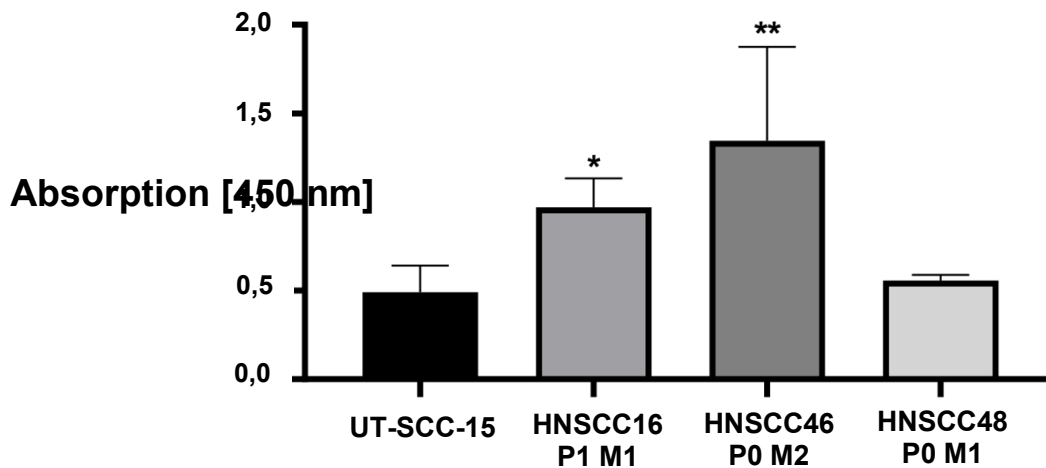


ABBILDUNG 13: INVASION. DAS INVASIONSPOTENTIAL WURDE ANHAND EINER MODIFIZIERTEN BOYDEN-CHAMBER-ASSAYS ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 72 H ERFASST. DIE ANZAHL INVADIERENDER ZELLEN WURDE MITTELS WST-1 ASSAY SPEKTROMETRISCH ERFASST (ABSORPTION: 450 NM). ALS KONTROLLE WURDEN UT-SCC-15 ZELLEN (HNSCC, NODALES REZIDIV) EINGESETZT, DEREN INVASIONSPOTENTIAL IN VORHERIGEN UNTERSUCHUNGEN BESTÄTIGT WURDE. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD, N = 3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE, 1WAY ANOVA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. INVASION DER UT-SCC-15.

4.1.6 PHÄNOTYPISIERUNG PRIMÄRER ZELLINIEN

Die Zellen wurden durchflusszytometrisch in niedriger und hoher Passage auf die Oberflächenmoleküle MHC I, MHC II, PD1 und PD-L1 untersucht.

Es zeigte sich für alle drei Zelllinien eine basale Abundanz von MHC I (HNSCC16 P1 M1: 31,8 %; HNSCC46 P0 M2: 22,7 %; HNSCC48 P0 M1: 13,1 %) und PD-L1 (HNSCC16 P1 M1: 68,8 %; HNSCC46 P0 M2: 91,4 %; HNSCC48 P0 M1: 51,8 %). MHC II konnte in keiner der Zelllinien nachgewiesen werden. Die Expression von PD1 war zelllinienspezifisch gering (HNSCC16 P1 M1: 3,4 %; HNSCC48 P0 M1: 0,8 %) bis moderat (HNSCC46 P0 M2: 36,9 %) ausgeprägt.

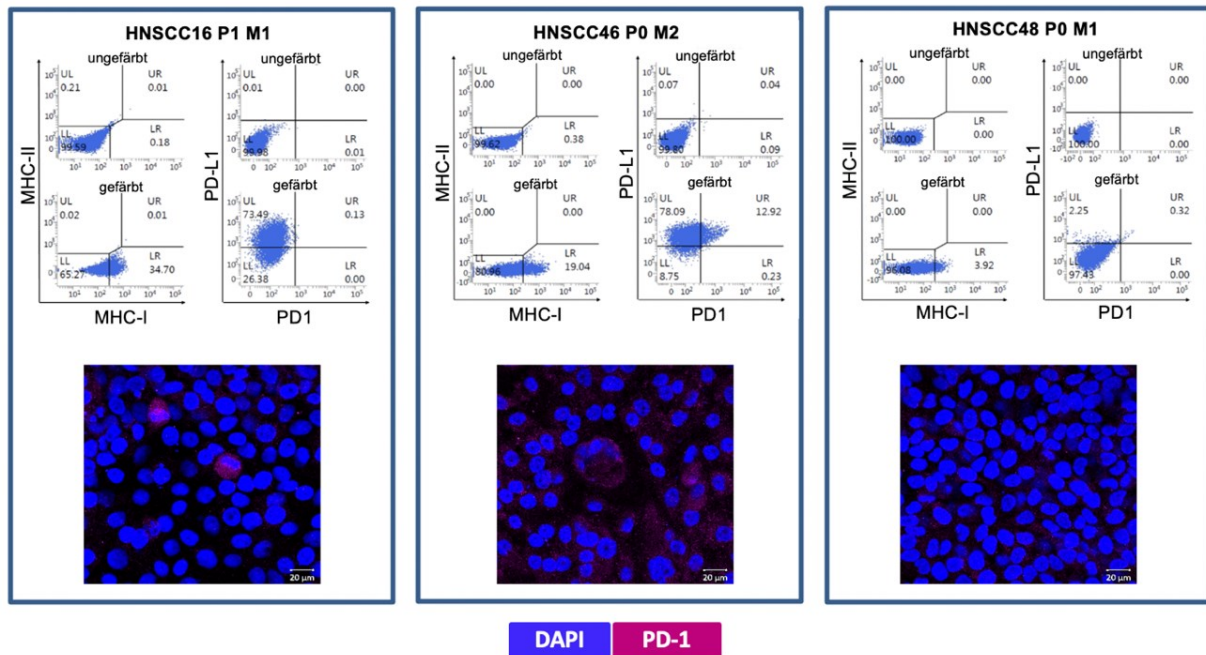


ABBILDUNG 14: FACS-BASIERTE PHÄNOTYPISIERUNG UND IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG. FACS-BASIERTE PHÄNOTYPISIERUNG FÜR MHC I, MHC II, PD1 UND PD-L1 (OBEN) UND IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON PD1 (UNTEN) ZUR BESTÄTIGUNG VON PD1 AUF DER OBERFLÄCHE VON HNSCC46 P0 M2. DIE ANALYSE ERFOLGTE MIT DEM ZEISS ELYRA 7 CONFOCAL LASER MICROSCOPE (ZEISS). ORIGINALVERGRÖßERUNG: 400 X. DARGESTELLT SIND REPRÄSENTATIVE AUFNAHMEN VON N = 3 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN.

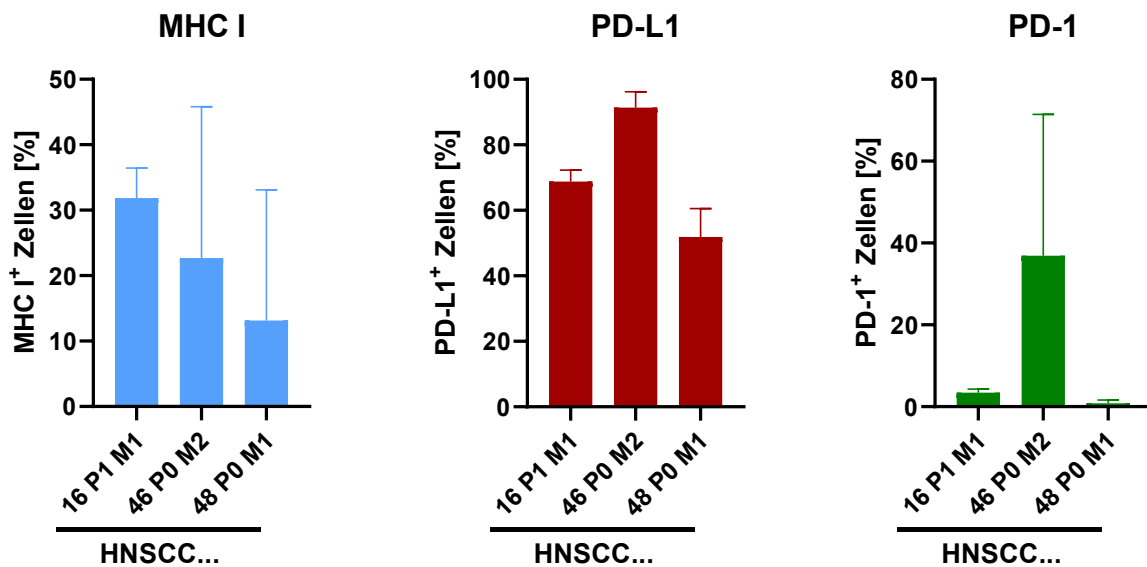
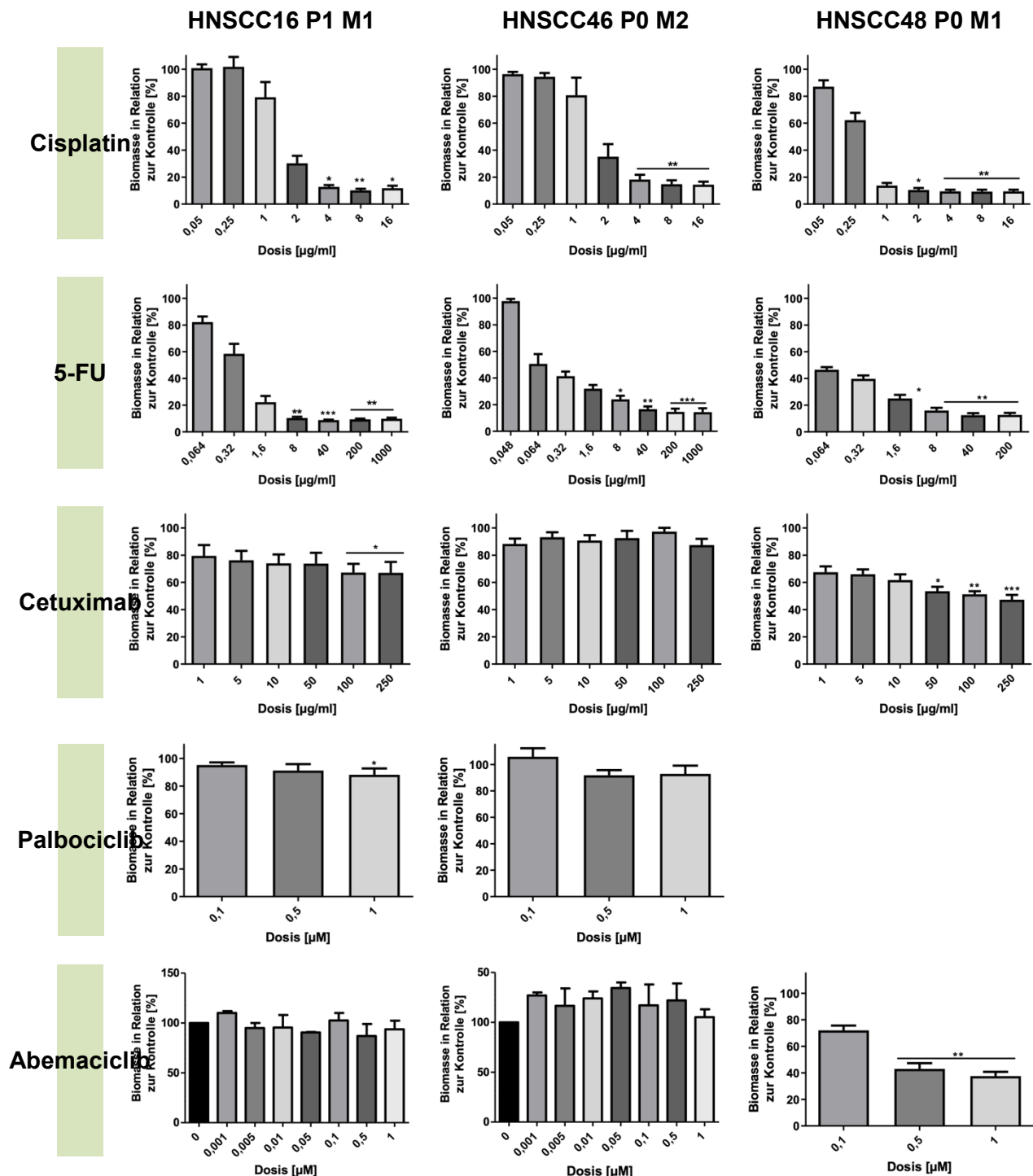


ABBILDUNG 15: BASALE ABUNDANZ VERSCHIEDENER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE. QUANTITATIVE ABUNDANZ DER MOLEKÜLE MHC I, PD-L1 UND PD1 DER ZELLINIEN HNSCC16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 UND HNSCC48 P0 M1 IN FRÜHEN PASSAGEN. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD, N = 2-4 UNABHÄNGIGE VERSUCHE.

4.2 IN VITRO WIRKUNG AUSGEWÄHLTER TESTSUBSTANZEN

4.2.1 BESTIMMUNG VON DOSISREIHEN

Die Zellen wurden für je 2 x 72 h mit aufsteigenden Konzentrationen der konventionellen Zytostatika Cisplatin und 5-FU, dem therapeutischen Antikörper Cetuximab bzw. den CDKis Palbociclib, Abemaciclib, Dinaciclib oder THZ1 behandelt. Im Anschluss wurde mittels KV-Färbung die Biomasse nach der Behandlung quantifiziert.



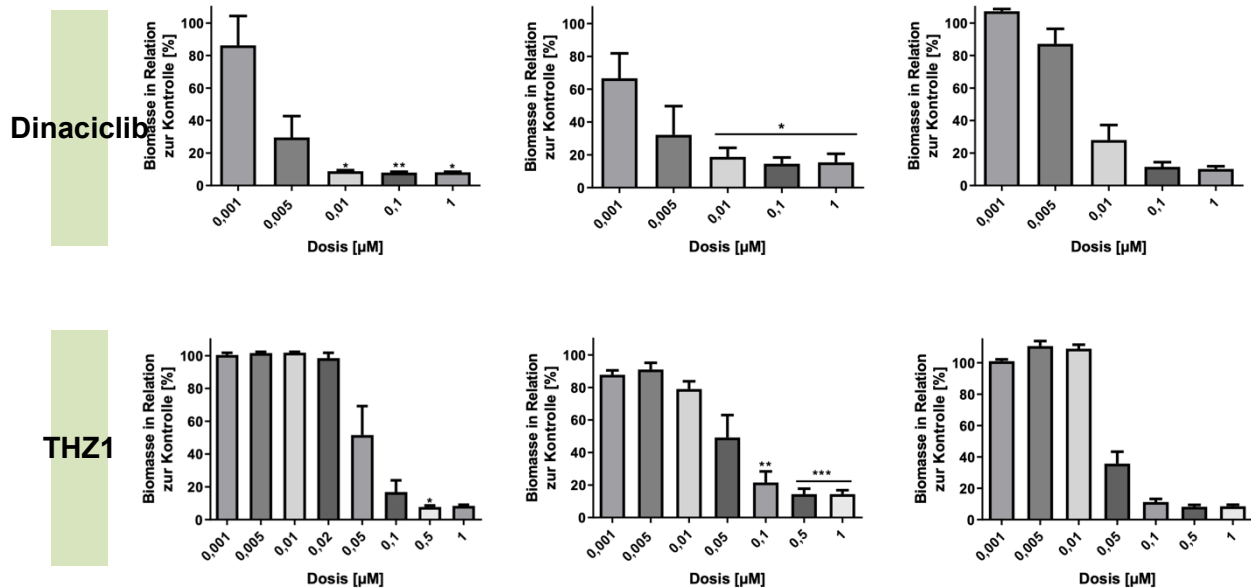


ABBILDUNG 16: DOSISREIHEN DER ZELLINIEN HNSCC16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 UND HNSCC48 P0 M1. ES WURDE DIE BIOMASSE DER ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN DOSEN DER WIRKSTOFFE CISPLATIN, 5-FU, CETUXIMAB SOWIE DER CDKIS PALBOCICLIB, ABEMACICLIB, DINACICLIB UND THZ1 UNTERSUCHT. ANGEGEBEN IST DER MITTELWERT + SD AUS N = 3 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN. KRUSKAL-WALLIS UND DUNN'S MULTIPLE COMPARISON BZW. U-TEST. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ VS. KONTROLLE.

Für die Behandlung mit Cisplatin wurden Konzentrationen zwischen 0,05 µg/ml und 16 µg/ml gewählt, für 5-FU zwischen 0,064 µg/ml und 1000 µg/ml und für die Behandlung mit Cetuximab zwischen 1 µg/ml und 250 µg/ml. Bei allen Zelllinien konnte unter der Therapie mit den Zytostatika Cisplatin und 5-FU eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung festgestellt werden, ebenso bei Behandlung der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 mit Cetuximab. Für die Linien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2 konnte hierbei keine solche Beziehung nachgewiesen werden. Während HNSCC46 P0 M2 unabhängig von der Cetuximab-Konzentration keine signifikante Biomassereduktion erkennen lässt, kommt es bei der HNSCC16 P1 M1 zu einem Abfall um ca. 20-30 %, es ist allerdings keine Dosisabhängigkeit erkenntlich.

Bei der Behandlung der Zellen mit den CDKis wurden Konzentrationen zwischen 1 nM und 1 µM getestet. Alle Zelllinien zeigten bei der Therapie mit Dinaciclib und THZ1 eine zunehmende Reduktion der Biomasse im Sinne einer erwartbaren Dosis-Wirkungs-Kurve. Dabei zeigte sich zunächst ein starker Abfall der Biomasse bei Dosissteigerung, welcher schließlich in ein Plateau übergeht.

Weder Palbociclib noch Abemaciclib zeigten eine vergleichbare Wirkung bei den Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2, was eine intrinsische Resistenz vermuten lässt. Tatsächlich kam es unter der Therapie mit Abemaciclib bei der HNSCC16 P1 M1 eher zu einer Steigerung der Biomasse nach zwei Behandlungszyklen. Die Zelllinie HNSCC46 P0 M2 zeigte ab einer Zieldosierung von 1 µM Abemaciclib einen dezenten Abfall der Biomasse. Die Zelllinie

HNSCC48 P0 M1 zeigte im Gegensatz dazu einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Abemaciclib-Dosis und vitaler Biomasse. Palbociclib wurde an dieser Zelllinie nicht getestet. Insgesamt zeigte sich im Vergleich mit selektiven CDKis eine stärkere Wirkung global wirkender CDKis.

Mittels IC₅₀-Rechner von AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator/>) wurden für alle getesteten Substanzen die IC₅₀ berechnet, welche der nachfolgenden Tabelle 4 zu entnehmen sind. Kam es unter der höchsten applizierten Dosis im Vergleich zur Kontrolle nicht zur Reduktion der Biomasse wurde dies als Nichterreichen der IC₅₀ definiert (= intrinsische Resistenz).

Substanz	HNSCC 16 P1 M1	HNSCC46 P0 M2	HNSCC48 P0 M1
Cisplatin [µg/ml]	1,4	1,54	0,30
5-FU [µg/ml]	0,31	0,17	0,04
Cetuximab [µg/ml]	Nicht erreicht	Nicht erreicht	137,26
Dinaciclib [nM]	2,69	1,65	7,33
THZ1 [nM]	49,22	39,47	32,00
Abemaciclib [nM]	Nicht erreicht	Nicht erreicht	696,65

TABELLE 4: IC₅₀ FÜR DIE JEWEILIGEN TESTSUBSTANZEN

Zusammenfassend zeigt sich, dass alle Zelllinien eine Chemorespositivität gegenüber Cisplatin und 5-FU aufweisen. Dabei ist ein individuelles Ansprechen erkennbar, wobei die Zelllinie HNSCC48 P0 M1 sich tendenziell durch eine höhere Sensitivität auszeichnet.

Der global wirksame CDKi Dinaciclib ist durch eine deutlich stärker ausgeprägte antitumorale Wirkung gekennzeichnet, als die selektiveren CDKis. Im Falle von Abemaciclib konnte nur für die Zelllinie HNSCC48 P0 M1 eine IC₅₀ berechnet werden. Da unter einer hohen Konzentration jedoch auch für die HNSCC46 P0 M2 eine leichte Reduktion der Biomasse erkennbar war, wurde Abemaciclib dennoch in die weiteren Versuche eingeschlossen.

Im Gegensatz dazu wurden aufgrund der anzunehmenden intrinsischen Resistenzen gegenüber Cetuximab und Palbociclib keine weiteren Testungen mit diesen Substanzen durchgeführt.

Anhand der gewonnenen Dosisreihen wurde zudem die IC₂₀ an den Graphen abgelesen. Die entsprechenden Dosierungen wurden für weiterführende Kombinationsansätze genutzt.

4.2.2 KOMBINATIONSBEHANDLUNGEN

Nach der Responsivitätstestung der Zelllinien gegenüber den genannten Substanzen in Monotherapie wurden verschiedene Kombinationstherapien getestet. Hierbei kam es sowohl zur Kombination von einem CDKi und einem klassischen Zytostatikum als auch der zweier CDKis. Für die Kombinationsbehandlungen wurden zunächst simultane und sequentielle Therapieansätze gewählt. Da sich bei den sequentiellen Versuchen keine positiven Effekten im Vergleich zu den Monotherapien zeigten, wurde im Folgenden nur der simultane Therapieansatz weiterverfolgt. In der folgenden Tabelle sind die genutzten Substanzdosen pro Zelllinie aufgeführt:

Zelllinien	Substanz	Dosis
HNSCC16 P1 M1	Cisplatin	1 µg/ml
	5-FU	0,064 µg/ml
	Abemaciclib	1 µM
	Dinaciclib	1 nM
	THZ1	20 nM
HNSCC46 P0 M2	Cisplatin	1 µg/ml
	5-FU	0,048 µg/ml
	Abemaciclib	1 µM
	Dinaciclib	1 nM
	THZ1	10 nM
HNSCC48 P0 M1	Cisplatin	0,05 µg/ml
	5-FU	0,032 µg/ml
	Abemaciclib	0,1 µM
	Dinaciclib	5 nM
	THZ1	20 nM

TABELLE 5: IN FOLGEVERSUCHEN VERWENDETE DOSIS FÜR DIE JEWEILIGEN TESTSUBSTANZEN.

Die Zellen wurden zweimal für je 72 h mit einer Kombination aus zwei der oben genannten Substanzen behandelt, im Anschluss wurde für die Bestimmung der Biomasse eine KV-Färbung durchgeführt.

Die berechneten Bliss-Indizes wurden mithilfe einer Heatmap verbildlicht. Dabei werden antagonistische Effekte rot, additive gelb und synergistische Effekte grün dargestellt.

Synergistische Effekte konnten bei den Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC48 P0 M1 für die Kombinationen aus THZ1/Abemaciclib, Cisplatin/Abemaciclib und Cisplatin/THZ1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Zelllinie HNSCC46 P0 M2 für sämtliche Kombinationsansätze eine antagonistische Wirkung, mit Ausnahme der Kombination aus 5-FU und Abemaciclib, was interessant in Hinblick darauf ist, dass alle anderen Kombinationsansätze mit 5-FU an den getesteten Zelllinien antagonistisch wirkten. Dies spiegelt die individuelle Heterogenität der HNSCCs wider.

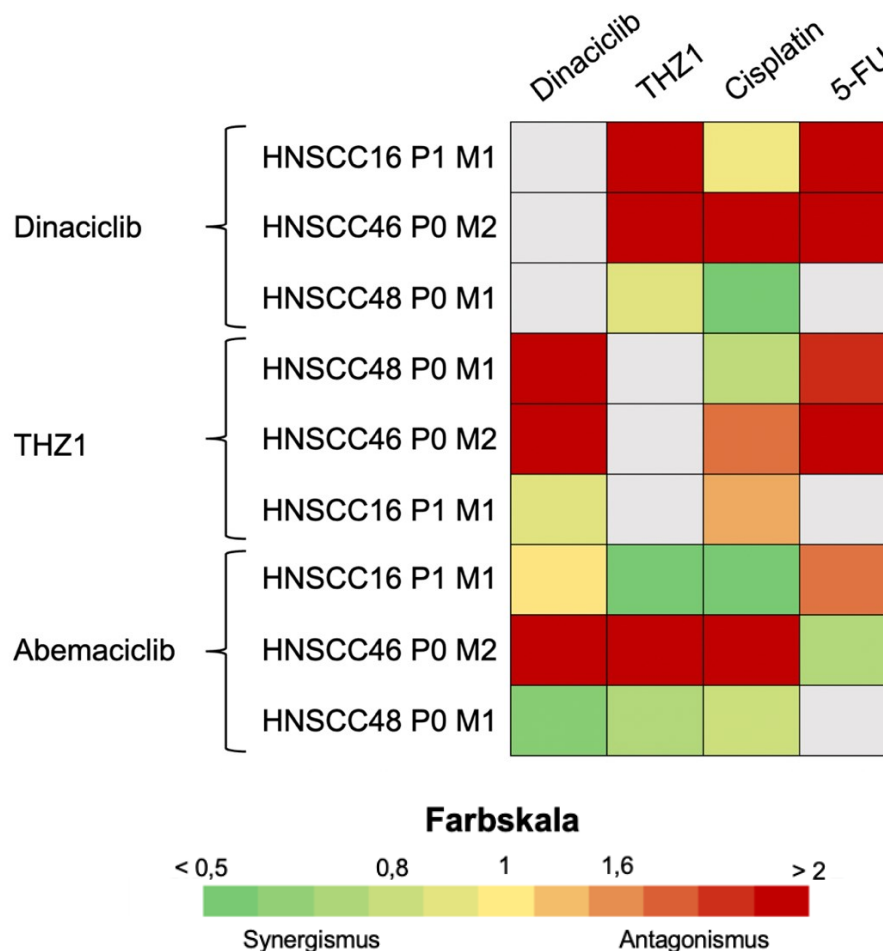


ABBILDUNG 17: HEATMAP DER BERECHNETEN BLISS-INDIZES AUSGEWÄHLTER THERAPIEKOMBINATIONEN.

4.2.3 THERAPIEBEDINGTE VERÄNDERUNGEN IM PHÄNOTYP

Es wurde untersucht, ob zuvor ausgewählte Mono- und Kombinationstherapien zu einer Veränderung des zellulären Phänotyps führen. Hierfür wurden die Oberflächenmoleküle MHC I, MHC II, PD1 und PD-L1 mittels Durchflusszytometrie erfasst. Die Zellen wurden erneut über 2 x 72 h behandelt.

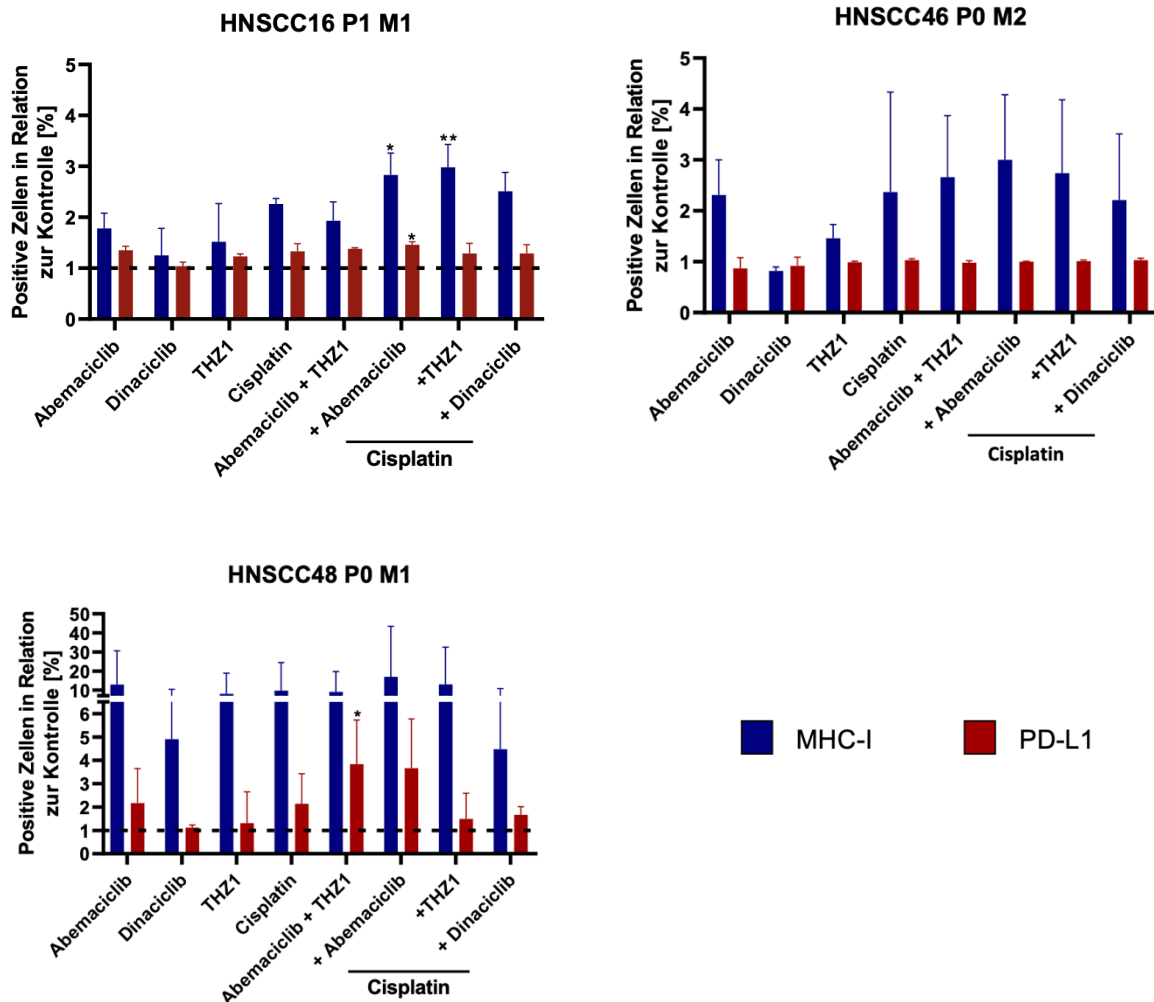


ABBILDUNG 18: PHÄNOTYPISIERUNG NACH THERAPIE. DARSTELLUNG VON MHC I UND PD-L1-POSITIVEN ZELLEN IM VERHÄLTNIS ZUR KONTROLLE. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD AUS N=3 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN. KRUSKAL-WALLIS. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ vs. KONTROLLE.

Im Verhältnis zur Kontrolle zeigt sich eine deutliche Induktion von MHC I über alle Mono- und Kombinationstherapien hinweg. Besonders stark zeigt sich diese bei sämtlichen Therapieansätzen der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 um zum Teil mehr als das Zehnfache gegenüber der Kontrolle.

Die MHC II-Expression wurde unter keiner der Therapien induziert (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich zur Kontrolle führten die Kombinationstherapien mit Abemaciclib/THZ1 bzw. Abemaciclib/Cisplatin bei der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 zu einer leichten Steigerung der PD-L1-

Abundanz. Noch deutlicher waren die Effekte bei der Zelllinie HNSCC48 P0 M1. Die duale CDK-Inhibition mit Abemaciclib und THZ1 führte zu einer signifikanten Hochregulation von PD-L1. Hingegen wurden nahezu keine Veränderungen bei der Zelllinie HNSCC46 P0 M2 detektiert. Dies ist jedoch vermutlich auf die bereits hohe basale Abundanz zurückzuführen.

PD1 wurde insbesondere bei der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 unter der Therapie deutlich induziert, wobei v.a. Abemaciclib- und Cisplatin-haltige Therapien einen starken Einfluss hatten, mit einer Hochregulation auf etwa das Vierfache.

4.2.4 DETEKTION VON APOPTOSE UND NEKROSE UNTER THERAPIE

Zur Untersuchung zytotoxischer Effekte wurde die Induzierbarkeit von Apoptose und Nekrose untersucht. Hierfür wurden die Zellen erneut für je 2 x 72 h mit den bereits zuvor getesteten Mono- und Kombinationstherapien behandelt, bevor sie unter Verwendung der Farbstoffe Yo-Pro 1 und PI durchflusszytometrisch analysiert wurden. Über dieses Verfahren können dabei spät-apoptotische (Yo-Pro 1/PI: +/+), früh-apoptotische (Yo-Pro 1/PI: +/-) sowie nekrotische (Yo-Pro 1/PI: -/+) Zellen unterschieden werden.

Exemplarisch wurden die Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2 untersucht, wobei sich zeigte, dass die einzelnen Behandlungsschemata Apoptose und Nekrose in unterschiedlichem Maße induzierten. So zeigten unbehandelte Zellen erwartungsgemäß zu etwa 90 % vitale Zellen, während bei der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 eine leichte Steigerung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen unter den Monotherapien mit Cisplatin und Abemaciclib induziert wurde. Ein starker Anstieg nekrotischer Zellen konnte unter der dualen CDK-Inhibition bestehend aus Abemaciclib und THZ1 nachgewiesen werden, während es unter der Therapie mit Cisplatin und THZ1 zu einem Anstieg der Nekrose- und Apoptoserate kam. Bei der Zelllinie HNSCC46 P0 M2 zeigte die alleinige Behandlung mit Cisplatin einen deutlichen Anstieg der Apoptose und Nekrose. Dies konnte jedoch nicht in Kombinationsbehandlungen gesteigert werden.

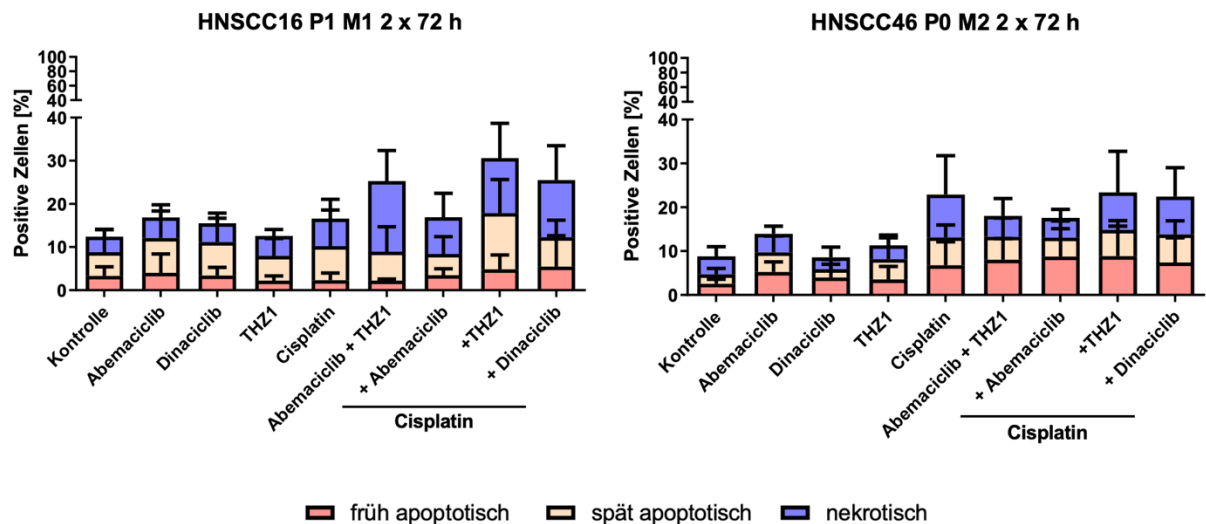


ABBILDUNG 19: APOPTOSE-NEKROSE-ASSAY. FRÜH APOPTOTISCHE ZELLEN SIND DEFINIERT ALS POSITIV FÜR Yo-Pro1, SPÄT APOPTOTISCHE ZELLEN ALS POSITIV FÜR YoPro1 UND PI UND NEKROTISCHE ZELLEN ALS PI-POSITIV. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD AUS N=4 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN. KRUSKAL-WALLIS VS. KONTROLLE.

Zusammenfassend konnte insbesondere beim Einsatz Cisplatin-haltiger Therapien zelllinienunabhängig eine deutliche Induktion der Nekrose nachgewiesen werden. Bei einigen Behandlungsansätzen wurden überdies zusätzlich vermehrt apoptotische Zellen detektiert. Dies lässt auf eine hohe zytotoxische Aktivität der ausgewählten Substanzen schließen, welche in Kombination teilweise verstärkt wird.

4.2.5 SEMI-QUANTITATIVE ANALYSE DES AUTOPHAGIEVERHALTENS

In weiterführenden Untersuchungen wurde betrachtet, ob die ausgewählten Behandlungsschemata Autophagie induzieren. Hierzu erfolgte nach 2 x 72 h Behandlung eine Färbung mit Acridinorange und Calcein AM. In autophagozytotischen Zellen kommt es zur Akkumulation saurer Vesikel im Zytoplasma, welche sich mit dieser Färbung darstellen lassen, da sich das rot fluoreszierende Acridinorange in den Vesikeln anreichert⁴⁶. Calcein AM hingegen wird durch intrazelluläre Esterasen umgewandelt und fluoresziert grün. Es dient der Detektion vitaler Zellen⁴⁷.

In Abbildung 20 sind repräsentative Aufnahmen der HNSCC-Zelllinien dargestellt, um die Therapie-assoziierte Autophagie zu visualisieren.

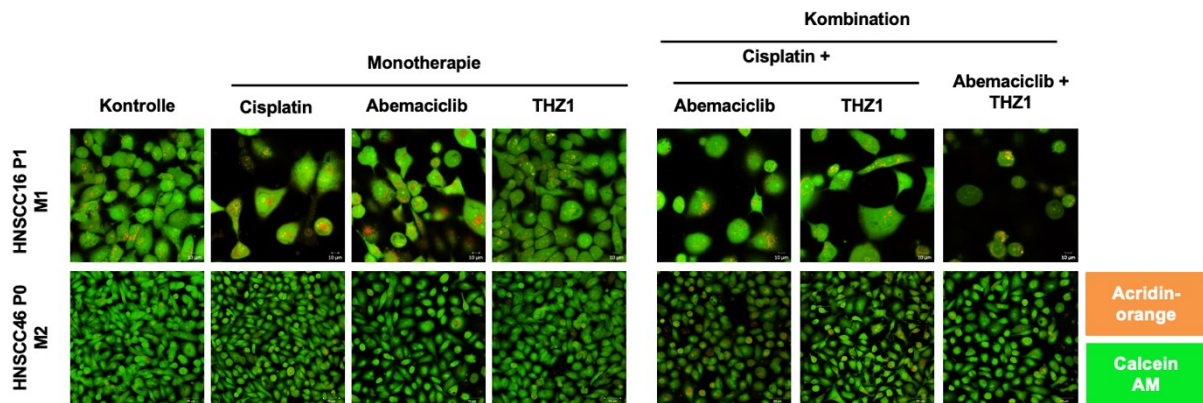


ABBILDUNG 20: REPRÄSENTATIVE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER HNSCC ZELLEN ZUM NACHWEIS VON AUTOPHAGIE. DIE AUFNAHMEN WURDEN ERSTELLT AM ZEISS ELYRA 7 CONFOCAL LASER MICROSCOPE (ZEISS). ORIGINALVERGRÖßERUNG: 400 X.

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist deutlich erkennbar, dass im Falle der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 Cisplatin und Abemaciclib sowohl in Mono- als auch Kombinationstherapie Autophagie induzieren. In diesen Behandlungsansätzen konnten vermehrt autophagozytotische Vakuolen detektiert werden. Darüber hinaus wurden morphologische Veränderungen, im Sinne eines Anschwellens der Zellen beobachtet. Ähnliche Veränderungen wurden bei der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 nachgewiesen.

Bei der Zelllinie HNSCC46 P0 M2 hingegen waren die Effekte bei allen Therapieschemata deutlich schwächer ausgeprägt.

4.2.6 SEMI-QUANTITATIVER NACHWEIS VON SENESZENZ

Unter Seneszenz versteht man den hochstabilen Zellzyklusarrest, insbesondere alter und geschädigter Zellen, als Reaktion auf verschiedene Stressoren. Durch diesen Arrest kommt es zur Limitation der Replikation. Gleichzeitig werden senescente Zellen einer Reihe phänotypischer Alterationen unterzogen, zum Beispiel einer metabolischen Umstellung, einer Neuordnung des Chromatins oder einer Modulation der Autophagie⁴⁸.

Um zu untersuchen, ob die ausgewählten Therapieschemata ebenfalls Seneszenz induzieren, wurden exemplarisch die Zellen der Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2 entsprechend der Anleitung des Seneszenz-Kits nach der Therapie gefärbt und im Anschluss lichtmikroskopisch dokumentiert. Abbildung 21 zeigt repräsentative Bilder. Eine bläuliche Färbung der Zellen (= xGal positiv) lässt dabei darauf schließen, dass es sich um eine senescente Zelle handelt. Es zeigt sich, dass nach Therapie nur vereinzelte Zellen seneszent wurden. Die einzige Ausnahme stellten die Mono- oder Kombinationstherapien mit Abemaciclib bei der Zelllinie HNSCC46 P0 M2 dar. Insbesondere nach dualer CDKi-Applikation waren senescente Zellen deutlich vermehrt detektierbar. Bei der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 war dieser Effekt hingegen schwächer ausgeprägt.

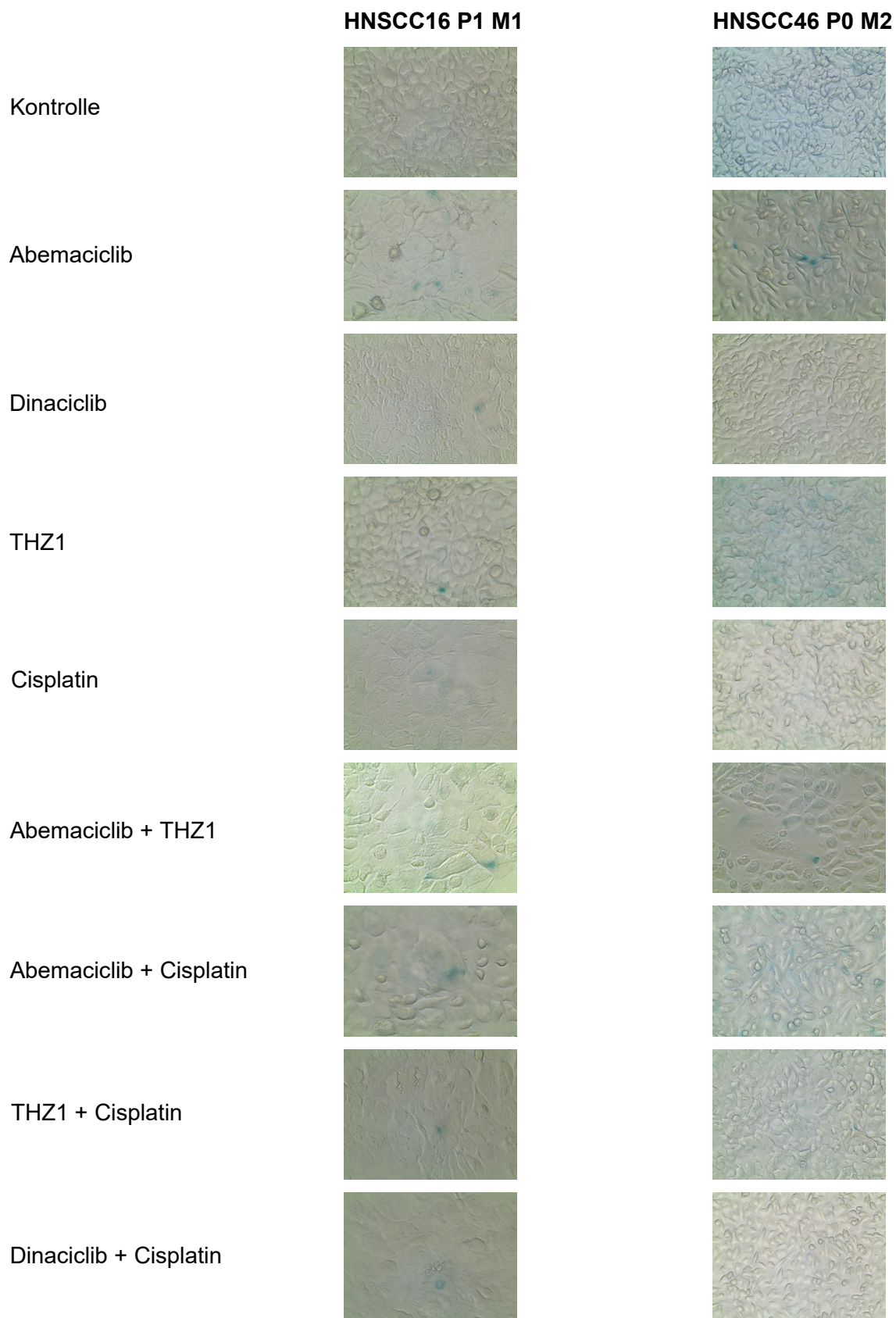


ABBILDUNG 21: REPRÄSENTATIVE LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER HNSCC ZELLEN ZUM NACHWEIS VON SENESZENZ. SENESZENZINDUKTION DER ZELLINIEN HNSCC16 P1 M1 UND HNSCC46 P0 M2 DURCH VERSCHIEDENE MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIEN. ORIGINALVERGRÖßERUNG: 100 X.

4.3 ÜBERTRAGUNG GEWONNENER *IN VITRO* DATEN AUF EIN XENOGRAFTMODELL

Zur Untersuchung des tumorigenen Potentials der Zelllinien wurden je fünf Millionen Zellen subkutan in die Flanken von NSG Mäusen injiziert. Anschließend wurde das Wachstum der soliden Tumoren und das Ansprechen auf eine Therapie mit Dinaciclib, Cisplatin oder einer kombinierten Behandlung untersucht.

4.3.1 WACHSTUMSVERHALTEN DER ZELLLINIEN *IN VIVO*

Bei den Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC48 P0 M1 kam es zu einem raschen Engraftment. Palpable Tumoren mit einer Größe von 4 x 4 mm ($\pm 33,3 \text{ mm}^3$) wurden bei der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 im Mittel nach 10,2 Tagen ($\pm 2,7$ Tage) und bei der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 nach 13,1 Tagen ($\pm 2,3$ Tage) beobachtet. Die Zelllinie HNSCC46 P0 M2 zeigte ein langsames Engraftment. Eine Tumorgöße von 4 x 4 mm wurde im Mittel nach 55,8 Tagen ($\pm 5,2$ Tagen) erreicht.

Insgesamt konnte in diesem subkutanen Xenograftmodell eine Engraftmentrate von 100 % erreicht werden.

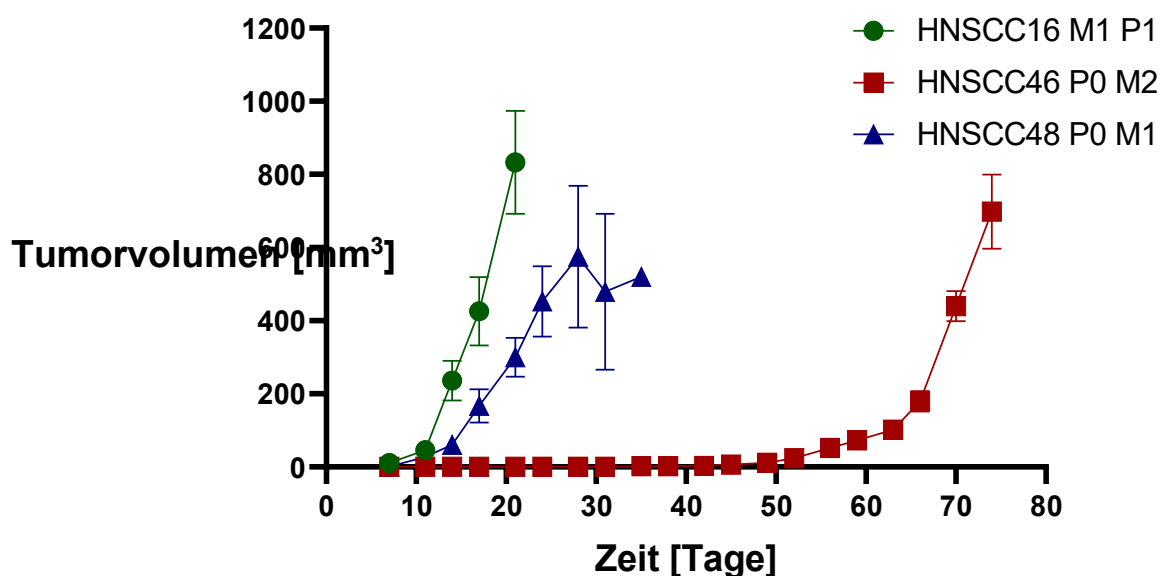


ABBILDUNG 22: ENGRAFTMENT DER ZELLLINIEN HNSCC 16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 UND HNSCC48 P0 M1 *IN VIVO* IN NSG MÄUSEN. DARGESTELLT IST DAS TUMORVOLUMEN IN mm^3 IM ZEITVERLAUF. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD, N = 4 - 7 TIERE/INDIVIDUELLEM XENOGRAFT.

Bei genauerer Betrachtung des Wachstumsverhaltens der einzelnen Xenografts zeigte die Zelllinie HNSCC16 P1 M1 das größte tumorigene Potential, verbunden mit einem schnellen Engraftment und progredientem Tumorwachstum, welches bei 2/6 Tieren bereits am Tag 20 zum Versuchsabbruch führte (= maximales Tumorumfang). Weitere zwei Tumoren ulzerierten vor dem Erreichen des angestrebten Maximalvolumens. Zwei Tiere mussten aufgrund eines

reduzierten Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Die Xenografts der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 zeigten ein stabiles und kontinuierliches Wachstum (6/7 Tiere), ein Tumor ulcerierte, was zum vorzeitigen Versuchsabbruch führte. Trotz des vergleichsweisen langsamen Wachstums der Xenografts der Zelllinie HNSCC46 P0 M2 wurde in 3/4 Fällen das maximale Tumolvolumen erreicht, ein Tumor ulcerierte. In diesem Fall erfolgte der umgehende Versuchsabbruch.

4.3.2 ANSPRECHEN AUF THERAPIE *IN VIVO*

Ausgehend von den zuvor beschriebenen Befunden wurden die Zelllinie HNSCC16 P1 M1 in die Therapieversuche aufgenommen.

Die Therapie wurde ab einer Tumorgroße von ca. 4 x 4 mm begonnen. Es wurden Therapien mit Cisplatin und Dinaciclib gewählt, da diese Substanzen *in vitro* eine starke Dosis-Wirkungs-Beziehung aufzeigten. Die Xenografts der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 wurden entweder mit Cisplatin, Dinaciclib bzw. einer Kombination behandelt. Kontrolltiere erhielten PBS in äquivalenten Volumina.

Die Tiere wurden entsprechend des folgenden Schemas therapiert:

- Cisplatin: 6 mg/kg KG, i.p., q1Wx4
- Dinaciclib: 20 mg/kg KG, i.p., q3Wx6
- Kombination: 6 mg/kg KG, i.p., q1Wx4 und 20 mg/kg KG, i.p., q3Wx6

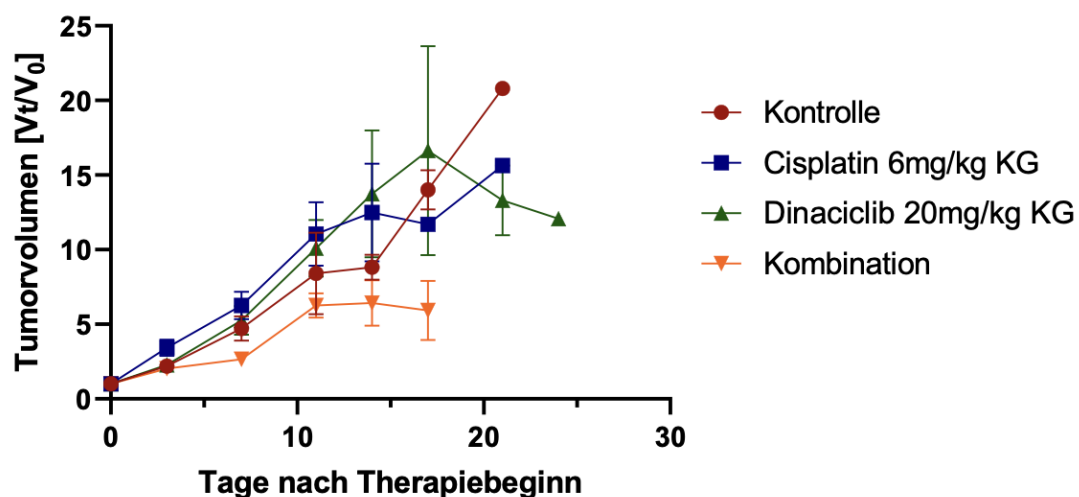


ABBILDUNG 23: HNSCC48 P0 M1 TUMORWACHSTUMSKURVE UNTER MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIEN MIT CISPLATIN UND DINACICLIB *IN VIVO*. DARGESTELLT IST DAS TUMORVOLUMEN IN RELATION ZUM THERAPIEBEGINN [=1] ZEITVERLAUF. MITTELWERT + SD, N = 7 TIERE/GRUPPE.

Anhand der Abbildung 23 ist zu erkennen, dass die jeweiligen Monotherapien keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hatten. Demgegenüber wurde das Wachstum in der Kombinationstherapie verlangsamt. Allerdings kam es unter dieser in 57,1% der Fälle (4/7) zu Ulzerationen

des Tumors. Ein weiteres Tier musste aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

Damit konnte *in vivo* eine leichte, jedoch nicht signifikante Hemmung des Tumorwachstums durch die ausgewählte Kombinationstherapie induziert werden.

4.3.3 ÜBERLEBEN

Um eine abschließende Aussage über die *in vivo* Effektivität der Therapie treffen zu können, wurde eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier erstellt.

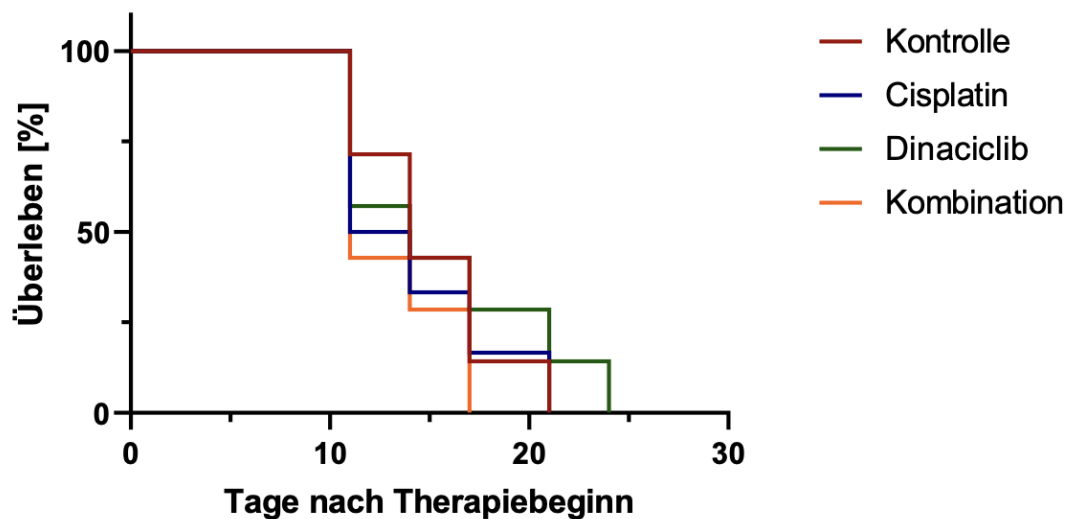


ABBILDUNG 24: KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE VON NSG MÄUSEN UNTER MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE MIT CIS-PLATIN UND DINACICLIB. N = 7 TIERE/GRUPPE.

Anhand dieser konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und den Therapiegruppen festgestellt werden. Lediglich die Gabe von Dinaciclib als Monotherapie verlängerte das Gesamtüberleben der Tiere leicht. An dieser Stelle sei aber noch einmal auf die bedingte Auswertbarkeit insbesondere der Kombinationstherapie hingewiesen. Unter Anwendung der zuvor definierten Abbruchkriterien mussten die Tiere vorzeitig getötet werden, da ein Großteil der Tumoren ulzerierte. Die Tiere verstarben nicht an den Folgen der Grunderkrankung (progressives Wachstum).

V. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei PDX-abgeleitete HNSCC-Zelllinien etabliert. Ziel der Studie war die Charakterisierung dieser, sowie die Untersuchung gezielter Therapiestrategien durch den Einsatz verschiedener CDK-Inhibitoren sowohl in Mono- als auch Kombinationstherapie mit konventionellen Therapeutika. Auf diese Weise sollte die Individualität der HNSCCs adressiert und untersucht werden.

Hierfür wurden, wie in Abschnitt 4 dargelegt, eine Vielzahl verschiedener Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass das TME durch eine verschieden ausgeprägte Infiltration an Lymphozyten, TAMs und Immun-Checkpoint-Molekülen geprägt ist. Alle Tumoren wurden in lokal fortgeschrittenen Stadien reseziert, die klinisch typischerweise mit einer infausten Prognose einhergehen⁴⁹. Gleichzeitig werden diese Tumoren häufig systemtherapeutisch behandelt⁵. Somit haben Therapieversuche an klinisch-relevanten Modellen in niedriger Passage eine besonders hohe klinische Relevanz⁴³.

CDKs spielen eine zentrale Rolle im Zellzyklus und sind somit vielversprechende Angriffspunkte für zielgerichtete Therapieansätze, was bereits für andere Tumorentitäten gezeigt werden konnte. Für einige Entitäten, wie bspw. das Mammakarzinom, erfolgte bereits die Zulassung selektiver CDKis^{50,51} (in Kombination mit einem Aromatasehemmer^{52–54}). Auf dieser Grundlage sollte ihre Wirkung auf PDX-abgeleitete HNSCC-Zelllinien *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Im nachfolgenden Kapitel werden die gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

5.1 ETABLIERUNG PDX-ABGELEITETER HNSCC-ZELLINIEN

Zu Beginn der Studie wurde versucht, HNSCC-Zelllinien direkt aus Biopsien bzw. OP-Resektaten zu generieren. Obwohl dies zuvor bereits beschrieben wurde⁵⁵, konnte aufgrund übermäßigen Wachstums Tumor-assoziiierter Fibroblasten keine *in vitro* Kultur etabliert werden (Daten nicht gezeigt). Vor diesem Hintergrund wurden Zelllinien sekundär aus zuvor *in vivo* expandiertem Xenograftgewebe generiert. Hierzu wurde das NSG-Maus-PDX-Modell verwendet. Mithilfe dieser Methode konnte das Fibroblastenwachstum aus PDX-abgeleiteten Zelllinien reduziert werden⁵⁶. Es wurden drei individuelle PDX-abgeleitete Zelllinien etabliert.

Alle Zellen wurden als epitheliale, nicht HPV-assoziierte HNSCC-Zellen definiert. Sie zeigten ein typisches adhärentes Wachstum, in Form von kleinen Zellclustern bzw. als Einzelzellen. Molekular wurde in allen Fällen eine *TP53*-Mutation nachgewiesen. Die Zelllinie HNSCC48 hatte zusätzlich trunkierende und damit pathogene Mutationen in den Genen *SMAD4*- und *CDKN2A*. Mittels Cyto-FISH wurde in diesem Fall eine partielle *CDKN2A*-Gendeletion in Verbindung mit einer Polysomie von Chromosom 9 festgestellt. In den Fällen HNSCC16 und HNSCC46 entsprachen die *CDKN2A*-Zuwächse den Chromosom-9-Kopien (HNSCC16,

N = 4-5/Zelle) oder blieben unverändert, wobei nur eine Chromosom-9-Polysomie vorlag (HNSCC46). Chromosomenpolysomie ist ein häufiges Merkmal fortgeschrittener Tumoren und wurde bereits bei p53-dysregulierten HNSCC beschrieben⁵⁷.

Hinsichtlich der leukozytären Infiltration des TME konnten deutliche Unterschiede zwischen den drei Fällen aufgezeigt werden. So zeichnete sich HNSCC16 durch eine besonders starke lymphozytäre Infiltration, inklusive CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen, sowie durch die höchste Dichte an TAMs aus. Diese erlangten in den letzten Jahren Aufmerksamkeit als potentielle Zielstrukturen antitumoraler Therapien⁵⁸. Es werden die klassisch aktivierten M1-Makrophagen, welche u.a. durch direkt medierte und Antikörper-abhängig Zell-medierte Zytotoxizität eine antitumorale Wirkung aufweisen, und die alternativ aktivierten M2-Makrophagen, die das Auftreten und Metastasieren von Tumorzellen und einer Tumorangio-genese begünstigen, eine T-Zell-vermittelte antitumorale Immunantwort unterdrücken und so ein Tumorstadium fördern, differenziert⁵⁹. Aufgrund ihrer hochgradigen zellulären Plastizität können M1- und M2-Zellen dabei, u.a. durch Veränderungen des TME oder therapeutischer Interventionen, ineinander umgewandelt werden⁶⁰. Dieses Potential kann in der antitumoralen Therapie genutzt werden, um eine Repolarisation zugunsten der M1-Makrophagen zu induzieren⁵⁹.

HNSCC46 und HNSCC48 wiederum zeigten eine höhere Infiltration durch CD276⁺ Zellen. Darüber hinaus ähnelten sich die drei Tumoren in ihrer Infiltration durch CD16⁺CD56⁺ NK-Zellen und PD-L2⁺ Zellen. Die deutlichen Unterschiede in Hinblick auf die Leukozyteninfiltration der betrachteten HNSCC-Fälle lassen sich dabei am ehesten auf die bekanntermaßen hohe inter-tumorale Heterogenität zurückführen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das TME aus verschiedenen Untergruppen immunologischer Zellen besteht, welche den Tumor infiltrieren und miteinander interagieren⁶¹. Dabei nimmt es u.a. eine bedeutende immunsuppressive Rolle bei der Tumorgenese von HNSCC-Rezidiven ein, kann aber auch als Target antitumoraler Therapien fungieren⁶².

Im Rahmen der vergleichenden molekularen Analysen konnte bestätigt werden, dass das molekulare Profil des Patientengewebes in den hier verwendeten frühen Passagen in PDX und Zelllinie größtenteils erhalten wurde. Dies wurde bereits in früheren Studien für andere Entitäten gezeigt, wie z.B. für das Glioblastoma multiforme⁶³ oder das kolorektale Karzinom⁶⁴. Hier wurde ebenfalls das genetische Profil, teils über mehrere PDX-Passagen hinweg, beibehalten. Dies lässt den Schluss zu, dass PDX-Modelle sich sowohl für grundlagenwissenschaftliche Fragestellungen, als auch für translationale Therapiestudien eignen⁶⁴.

Ein weiterer Befund dieser Arbeit ist die Zunahme der Allelfrequenz von *TP53* Mutationen infolge der *in vivo/ex vivo* Kultivierung. Unter dem Begriff der Allelfrequenz wird dabei das Verhältnis aus der Menge einer tumorspezifisch mutierten Variante und der Wildtyp-DNA Kopien beschrieben⁶⁵.

Dass es zu einer solchen Zunahme kommt, ist entweder auf einen höheren Anteil an malignen Zell(klon)en nach Kultivierung zurückzuführen und/oder das Auswachsen eines dominierenden Klons in der Kultur. Derartige Veränderungen wurden bei den Fällen HNSCC16 und HNSCC46 nachgewiesen. Demgegenüber wurden bei dem Fall HNSCC48 transient geringere *TP53* Allelfrequenzen detektiert, was vermutlich auf eine intratumorale Heterogenität zurückführbar ist^{66,67}. Es ist anzunehmen, dass sich hier ein Subklon in dem für die PDX-Generierung verwendeten Gewebe nicht an die *in vitro* Bedingungen anpassen konnte. Hier zeigt sich eine Limitation unserer Studie und von Zelllinien im Allgemeinen. Solide Karzinome entstehen in der Regel aus einem mutierten Zellklon, welcher die Fähigkeit besitzt sich dem körpereigenen Immunsystem zu entziehen. Im Verlauf der Zeit kommt es zu weiteren, auf genomische Instabilität zurückführbaren, Veränderungen im Genom. In vorherigen Studien wurden bei HNSCC bis zu sechs verschiedene Subklone innerhalb eines Tumors identifiziert^{68,69}. Jedoch ist nur etwa ein Drittel der somatischen Mutationen ubiquitär in jeder Tumorregion nachweisbar^{69,70}. Einzig unter Einbeziehung verschiedener Tumorregionen (inklusive Tumorrand, -zentrum, -invasionsgrenze) kann ein umfassenderes Bild der intratumoralen Heterogenität auch *ex vivo* dargestellt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen bereits vorherige Studien. So konnte bspw. gezeigt werden, dass routinemäßige Probeentnahmen in der klinischen Diagnostik oftmals nicht repräsentativ für den gesamten Tumor sind⁷¹. Für das klarzellige Nierenzellkarzinom wurde die sogenannte *Multi-Side-Tumor-Sampling*-Methode entwickelt, welche auf Grundlage von mathematischen Computermodellen die intratumorale Heterogenität untersucht⁷². Auch für orale und oropharyngeale Tumoren wurde die Anwendbarkeit dieser Methode betrachtet. Die Ergebnisse zeigten u.a. eine signifikant höhere Detektionsrate von *PIK3CA*- und *CDK2NA*-Mutationen, sowie unterschiedliche Ausprägungen verschiedener histologischer, klinisch-pathologischer und epigenetischer Charakteristika⁷¹. Diese Analysen sind jedoch zeitaufwändiger und zum Teil sehr kostenintensiv, hier zeigt sich ein Bedarf für weiterentwickelte diagnostische Methoden.

Durch die Sammlung weiterer Hintergrundinformationen mittels NGS, TME und einer umfassenden Bewertung des Ansprechens auf Arzneimittel versuchten wir diese Einschränkungen zu überwinden und hilfreiche Informationen für Folgestudien zu generieren.

5.2 BASALE ZELLINIENCHARAKTERISIERUNG

Zur Durchführung komplexer präklinischer Therapiestudien ist zunächst die grundlegende Charakterisierung frisch etablierter Tumormodelle erforderlich. Im Rahmen dieser präliminären Untersuchungen wurde aufgezeigt, dass die etablierten Zelllinien sich in Phänotyp, Wachstumskinetik, Migrations- und Invasionspotential unterscheiden.

Hinsichtlich der Expression des Immun-Checkpoint-Moleküls PD1 konnte in 1/3 Fällen (HNSCC46 P0 M2) eine basale Abundanz nachgewiesen werden. PD1 ist ein inhibierender Rezeptor, wird vor allem von T-Zellen während der Aktivierung exprimiert und reguliert deren Effektor-Funktionen in verschiedenen physiologischen Reaktionen. Dies schließt akute und chronische Infektionen ebenso ein wie Karzinome, Autoimmunreaktionen und die Immunhomöostase⁷³. PD1 wird typischerweise auf Immunzellen nachgewiesen, die Anwesenheit auf Tumorzellen wurde bislang nur sehr selten in der Literatur dokumentiert. In einer Studie wurde allerdings PD1 auf Tumorzellen als Tumorsuppressor beschrieben und mit einer Resistenz gegenüber Immun-Checkpoint-Inhibitoren assoziiert⁷⁴.

Dem gegenüber ist eine Vielzahl von Tumoren durch eine hohe Abundanz von PD-L1 charakterisiert. In dieser Arbeit wurde PD-L1 ebenfalls mehrheitlich auf den HNSCC-Linien nachgewiesen. PD-L1 ist ein Faktor, der die Inhibition der T-Zell-Antwort vermittelt. Maligne Zellen nutzen PD-L1 zur Hemmung antitumoraler/zytotoxischer Immunantworten, was prinzipiell mit einer schlechteren Prognose verbunden ist⁷⁵. Darüber hinaus kann PD-L1 als Biomarker für die Indikation einer Immun-Checkpoint-Blockade dienen. Hierfür ist der sogenannte *combined positive score* (CPS) von Relevanz, welcher das Verhältnis PD-L1⁺ Zellen (Tumorzellen, Lymphozyten, Makrophagen) an der Gesamtzahl viabler Tumorzellen angibt. Es wurde gezeigt, dass eine Immun-Checkpoint-Blockade bei einem CPS von 20 das Gesamtüberleben deutlich verlängern kann (14,9 Monate vs. 10,7 Monate bei Cetuximab-Applikation)⁷⁶. Dies wurde auch in der aktuellen S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms berücksichtigt, laut welcher eine Behandlung bei einem CPS ≥ 1 *first line* mit Pembrolizumab als Monotherapie oder in Kombination mit Platin und 5-FU erfolgen, während bei Tumoren mit einem CPS < 1 in erster Linie Cetuximab und palliativ eine Kombination aus Cetuximab mit Platin und 5-FU eingesetzt soll.

Die Unterschiede in der Wachstumskinetik der betrachteten Zelllinien *in vitro* zeigten ein höheres Proliferationsverhalten der Zelllinien HNSCC16 P1 M1 (PDT = 35,65 h \pm 6,16 h) und HNSCC 48 P0 M1 (PDT = 30,70 h \pm 4,12 h) gegenüber der HNSCC46 P0 M2 (PDT = 44,87 h \pm 3,90 h). Als Zelllinie, die vom Gewebe einer Metastase abgeleitet wurde, ist HNSCC48 P0 M1 damit die Linie mit dem höchsten Proliferationspotential. Hierbei ist zu beachten, dass alle drei Zelllinien von verschiedenen Patienten abgeleitet wurden. In einer Studie zu kolorektalen Karzinomen wurden Zelllinien von Primären und zugehörigen Metastasen *gematcht*. Es zeigte sich bei einigen dieser Paare ein leicht erhöhtes Proliferationspotential bei

den Metastasen-Zelllinien, allerdings konnte dies nicht auf alle Paarungen übertragen werden⁷⁷. Eine Studie zu Lungenkarzinomen zeigte im Gegensatz dazu für zwei von drei untersuchten Zelllinienpaaren eine signifikant langsameres Wachstum der Metastasen-Zelllinien⁷⁸. Darüber hinaus finden sich ähnliche Verdopplungszeiten auch bei kommerziell erwerblichen HNSCC-Zelllinien. So ist bspw. die Verdopplungszeit der Linie UM-SCC-12 (Larynxkarzinom, männlicher Patient, 71 Jahre) mit ca. 34 h angegeben, die der Zelllinie HN-2 (Larynxkarzinom, männlicher Patient, 49 Jahre) mit 48 h. Es gibt jedoch auch Zelllinien, die ein deutlich geringeres Proliferationsverhalten zeigen, wie bspw. die Zelllinie HN-8 (Larynxkarzinom, männlicher Patient, 56 Jahre) mit 170 h⁷⁹. In Anbetracht dessen ähnelt sich die Proliferationskinetik der von uns etablierten Zelllinien unabhängig von der Lokalisation oder Art des Ursprungsgewebes recht stark.

Weiterhin ist auffällig, dass sich die Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2 in Bezug auf ihr Wundheilungspotential mehr ähnelten, als diese und die HNSCC48 P0 M1. Die beiden erstgenannten Zelllinien zeigten im *Wound Healing*-Assay bereits nach zwei Tagen einen vollständigen Schluss der zuvor gesetzten Wunde, während vergleichbare Resultate bei der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 erst nach weiteren sechs Tagen erzielt wurden. Hier zeigt sich ein offenbar vermindertes Migrationsverhalten der Zellen. In Übereinstimmung mit diesem Befund zeigte die Zelllinie auch im Invasions-Assay ein deutlich reduziertes Invasionspotential. In weiterführenden Studien sollte näher charakterisiert werden, welche Mechanismen diesem, im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien verminderten Migrations- und Invasionspotential zugrunde liegen.

5.3 ARZNEIMITTELWIRKUNGEN AUF HNSCC-ZELLEN *IN VITRO*

5.3.1 EINFLUSS DER MONOTHERAPIEN AUF DIE BIOMASSE *IN VITRO*

In der Behandlung von Karzinomen sind, neben Radiotherapie und chirurgischer Tumoresektion, systemische Therapien nicht wegzudenken⁸⁰. Auch im Bereich der HNSCC gehört die Radiochemotherapie zum festen Behandlungsspektrum⁵. Unter anderem aufgrund von relativ hohen Rezidivraten unter (Radio-)Chemotherapie bedarf es jedoch neuer und individuellerer Untersuchungen⁸¹.

Zunächst wurde als Grundlage für die folgenden Experimente die Chemoresponsivität der drei etablierten Zelllinien unter Berücksichtigung der klassischen Zytostatika Cisplatin und 5-FU, des EGFR-Antikörpers Cetuximab und der CDKis Palbociclib, Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 untersucht. Anhand der durch Kristallviolettffärbung gewonnenen Daten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, welche die spezifische Wirksamkeit der Arzneistoffe auf die Zellen

verdeutlichten. Es konnte für alle Zelllinien eine Sensitivität gegenüber den klassischen Zytostatika Cisplatin und 5-FU nachgewiesen werden, ebenso wie für global wirkende CDKis Dinaciclib und THZ1, wobei sich individuelle Unterschiede in der Chemoresponsivität zeigten. Dass alle Zelllinien besser auf diese global wirkenden CDKis ansprachen, ist vermutlich darin begründet, dass es hier nicht nur zu einer unmittelbaren Inhibition des Zellzyklus (wie im Falle der selektiven CDK4/6-Inhibition) kommt. So inhibiert bspw. Dinaciclib CDK1, CDK2, CDK5 und CDK9³¹, während THZ1 CDK7, CDK12 und CDK13³² beeinflusst. Auf diese Weise hemmen sie nicht nur direkt den Zellzyklus (CDK1, CDK2, CDK7), sondern zusätzlich auch die RNA-Polymerase II (CDK7, CDK9, CDK12) und damit die Transkription^{31,32}.

Ein schlechtes bis kein Ansprechen war bei den Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2 sowohl bei der Behandlung mit Cetuximab als auch bei einer Therapie mit Abemaciclib zu erkennen. HNSCC48 P0 M1 hingegen war diesen Substanzen gegenüber sensitiv. Für alle getesteten Zelllinien (HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2) konnte eine intrinsische Resistenz gegenüber Palbociclib nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass das unterschiedliche Ansprechen auf Palbociclib und Abemaciclib darauf zurückzuführen ist, dass Palbociclib eine höhere Affinität zu CDK6 und Abemaciclib zu CDK4 hat²⁹. Als prädiktive Biomarker für das Ansprechen der CDKi-Therapie sind hierbei u.a. *CCDN1*-Veränderungen sowie die Inaktivierung von *CDKN2A/B*/p16^{INK4A} bekannt²⁷, was durch unsere Detektion einer partiellen *CDKN2A*-Deletion bestätigt wird.

Allgemein stimmten die zytotoxischen Wirkungen mit denen überein, die bereits bei anderen Entitäten beschrieben wurden^{82,83}.

Es wurden die IC₅₀-Werte für die jeweiligen Therapien in Bezug auf alle Zelllinien berechnet und die IC₂₀ für nachfolgende Versuche bestimmt. Bereits anhand dieser grundlegenden Daten zeigt sich das hohe Maß an intertumoraler Heterogenität, durch welche sich HNSCCs auszeichnen.

5.3.2 EINFLUSS DER KOMBINATIONSTHERAPIEN AUF DIE BIOMASSE *IN VITRO*

Im Folgenden sollten die Effekte untersucht werden, die die zuvor in Monotherapie betrachteten Substanzen in Kombination auf die etablierten Zelllinien haben. Hierfür wurde mit den Substanzen Cisplatin, 5-FU, Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 entsprechend eines simultanen Therapieregimes gearbeitet. Es wurden anhand der zuvor bestimmten Dosis-Wirkungs-Kurven die IC₂₀ ermittelt.

Für zwei der drei Zelllinien konnten synergistische Effekte nachgewiesen werden. So kam es bei der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 unter der kombinierten Gabe von Abemaciclib und THZ1 sowie Cisplatin und Abemaciclib bzw. THZ1 zu einer signifikanten Verstärkung der Einzelwirkungen. Auffallend ist hier, dass die Resistenzen gegenüber Abemaciclib in der Zelllinie

HNSCC16 P1 M1 durch die zusätzliche Therapie mit Cisplatin reversibel waren. In einer aktuellen Studie zur Therapie von Gallengangskarzinomen wurde der Einfluss mehrerer CDK4/6 Inhibitoren untersucht, insbesondere in Kombination mit Gemcitabin (Cytosinanalogon) und Cisplatin. Bei einer Tripeltherapie mit Abemaciclib konnte dabei eine verminderte chemotherapiebedingte Toxizität sowie eine Aufhebung von Abemaciclib-Resistenzen durch die Unterbindung von Autophagie festgestellt werden, wodurch in diesen *in vitro* und *in vivo* Modellen ein dauerhaftes Therapieansprechen gesichert wurde⁸⁴. Dieser Erklärungsansatz überrascht, da es in unseren Untersuchungen zu einer vermehrten Autophagieinduktion unter der Therapie mit Cisplatin und/oder Abemaciclib gegenüber der Kontrolle kam. Dennoch wurde ein signifikanter synergistischer Effekt gezeigt. Zur Klärung der möglichen zugrundeliegenden Mechanismen bedarf es hier jedoch weiterer Untersuchungen.

Die Zelllinie HNSCC48 P0 M1 zeigte synergistische Effekte unter der Kombinationstherapie von Cisplatin mit Abemaciclib bzw. Dinaciclib. Wir folgerten hier, dass die partielle Deletion von *CDKN2A* aufgrund einer pathogenen R58*-Mutation das wahrscheinlichste molekulare Korrelat für das Ansprechen auf Abemaciclib sein könnte^{85,86}, was im Folgenden untersucht wurde.

Als besonders chemoresistent bezüglich der Kombinationstherapien stellte sich die Zelllinie HNSCC46 P0 M2 dar. So zeigten alle untersuchten Kombinationsansätze einen antagonistischen Effekt. Hier ist zu erwähnen, dass sich das TME des Tumors durch eine hohe Anzahl von TAMs und NK-Zellen auszeichnete, was wahrscheinlich auf ein schlechtes Ansprechen auf Wirkstoffe hinweist. Bisher wurde ein solcher Zusammenhang zwischen dem TME und zellulären Merkmalen nur für (intrinsisch arzneimittelresistente) Tumorstammzellen beschrieben⁸⁷. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Strahlenresistenz einer HNSCC-Zelllinie durch die vorherige Gabe eines CDK4/6 Inhibitors aufhebbar ist⁸⁸. Auch bei metastasierten Mammakarzinomen wurde die Kombination der bekannten CDK4/6 Inhibitoren mit einer palliativen Radiotherapie im Rahmen einer klinischen Studie untersucht. Es zeigte sich ein angemessenes akutes und langfristiges Toxizitätsprofil mit vereinzelt Episoden hochgradiger jedoch reversibler intestinaler Toxizität. Außerdem zeigte sich eine Schmerzlinderung und eine lokale Tumorkontrolle⁸⁹. Nicht-medikamentöse Kombinationspartner zur CDK-Inhibition wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet, könnten aber potentiell das *Outcome* im Falle von Resistenzen oder Antagonismen verbessern.

Weiterhin wurde in Studien die Kombinationsmöglichkeit von CDKi und Immun-Checkpoint-Inhibitoren betrachtet. Diesbezüglich zeigen verschiedene klinische Studien, dass diese Kombination effektiv ist, jedoch ein erhöhtes Toxizitätspotential birgt, wenn das Therapieschema aus einer Vorbehandlung mit einem CDKi und einer anschließenden Gabe von Immun-Checkpoint-Inhibitoren besteht^{90,91}. So zeigte bspw. Abemaciclib mit nachfolgender LY3300054-

Gabe (PD-L1 Antikörper) eine erhöhte Hepatotoxizität, weshalb eine sorgsame Therapieplanung unumgänglich ist⁹⁰. Zudem muss eine eingehende Risiko-Nutzen-Erwägung durchgeführt werden, um die Patient:innensicherheit zu gewährleisten⁹¹.

Für ein besseres Verständnis der hier wirkenden molekulare Wirk- und Toxizitätsmechanismen bedarf es weiterer Untersuchungen⁹⁰.

Zusammenfassend konnten für zwei der drei verwendeten Zelllinien synergistische Effekte bei der kombinierten Therapie mit Zytostatika und CDKis nachgewiesen werden, wodurch bei dualer zytotoxischer Behandlung auf eine erhöhte Chemosensitivität zu schließen ist. Auffallend ist, dass Cisplatin offenbar das Potential trägt trotz einer Autophagieinduktion intrinsische CDKi-Resistenzen, wie anhand der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 und derer Resistenz gegen Abemaciclib nachgewiesen, aufzuheben. Unsere aktuellen Untersuchungsergebnisse bieten hier noch keine aufschlussreichen Erklärungsansätze, sodass weitere Untersuchungen unternommen werden sollten.

5.3.3 ANALYSE THERAPIE-BEDINGTER ZYTOTOXISCHER EFFEKTE

Für ein besseres Verständnis der zuvor erhobenen Befunde, wurden im Folgenden funktionelle Analysen Therapie-bedingter zytotoxischer Effekte in Mono- und Kombinationsbehandlung durchgeführt. Auf diese Weise erhofften wir uns eine Evaluation der zugrunde liegenden Mechanismen.

Zunächst wurde die Veränderung des Phänotyps unter der Therapie untersucht. Hier zeigte sich über alle Therapieansätze hinweg eine Hochregulierung von MHC I. Besonders stark war dies bei der Zelllinie HNSCC48 P0 M1 ausgeprägt, bei welcher die Abundanz zum Teil auf mehr als das Zehnfache im Vergleich zur Kontrolle stieg. MHC I repräsentiert körpereigene Peptidfragmente zur Erkennung durch zytotoxische T-Zellen auf der Zelloberfläche. Der Verlust der MHC I-Expression auf Tumorzellen ist ein Mechanismus von Tumoren zur Umgehung des Immunsystems. Durch MHC I-Moleküle wird die Immunerkennung erleichtert, weshalb eine Hochregulation der Expression und damit einhergehenden vermehrten Antigenpräsentation positiv auf das Ansprechen gegenüber immuntherapeutischen Strategien auswirken könnte⁹².

Ebenso kam es, insbesondere unter den ausgewählten Kombinationstherapien, bei den Zelllinie HNSCC16 P1 M1 und HNSCC48 P0 M1 zu einer gesteigerten PD-L1-Expression. Nahezu keine Veränderung konnte für die Zelllinie HNSCC46 P0 M2 nachgewiesen werden, wobei dies vermutlich auf die bereits basal hohe Expressionsrate zurückzuführen ist. Insbesondere die Zelllinie HNSCC16 P1 M1 zeigte zudem auch eine deutliche Hochregulation der PD1-Expression, insbesondere in Bezug auf Therapien mit Cisplatin und Abemaciclib.

Wie bereits unter 5.2 *Basale Zellliniencharakterisierung* beschrieben, sind hohe PD-L1-Werte mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Kommt es jedoch zur Unterbrechung der Interaktion zwischen PD1 und PD-L1, bspw. durch Antikörper gegen eine dieser Strukturen, wird die Funktion der T-Zellen wiederhergestellt, was zu einer verbesserten Anti-Tumor-Reaktion führen kann⁷⁵. Immunhistochemisch wird eine erhöhte PD-L1-Expression mit höheren Gesamtansprechraten auf die Blockade der PD1/PD-L1-Achse in Verbindung gebracht. Folglich hat sich PD-L1 als prädiktiver Marker für bessere Behandlungsmöglichkeiten etabliert^{93,94}. Es wurde bereits der Einsatz des anti-PD1-Antikörpers Nivolumab in der Therapie von HNSCCs beschrieben⁹⁵, wovon Patient:innen jedoch nicht mehrheitlich zu profitieren schienen⁹⁶. Für nachfolgende Arbeiten könnte hier ein Ansatzpunkt für die Kombination mit Immuntherapien bestehen. Insgesamt konnten im Rahmen der durchgeführten Phänotypisierung der HNSCC-Zelllinien Unterschiede in der Expression von Oberflächenmoleküle detektiert werden.

In prospektiv größer angelegten Zelllinienpanels muss evaluiert werden, ob es sich bei den Kreuzsensitivitäten und -resistenzen um einmalige Befunde oder ein allgemeines Phänomen handelt.

Hinsichtlich der Identifikation molekularer Korrelate für das Ansprechen und Versagen zielgerichteter Therapien konnten wir – wie zuvor dargelegt – chromosomale Aberrationen in *CDKN2A* und *CDK4* identifizieren. Die Zelllinie HNSCC16 P1 M1 weist jedoch einen *CDKN2A*-Wildtyp auf. Aus diesem Grund prüften wir mittels Cyto-FISH zusätzlich auf *CDK4*-Genamplifikationen, da Abemaciclib eine höhere Selektivität für CDK4 als für CDK6 aufweist^{22,97}. Es zeigte sich die erwartete Chromosom-12-Polysomie mit *CDK4*-Verstärkung bei Zellen der Linie HNSCC48 P0 M1. Diese Polysomie-assoziierten *CDK4*-Erhöhungen waren auch in Zellen der Linie HNSCC16 P1 M1, nicht aber der HNSCC46 P0 M2 nachweisbar, was höchstwahrscheinlich unsere Ergebnisse erklären könnte. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung morphologischer Veränderungen, wie eine erhöhte Anzahl saurer Organellen und eine geschwollene Zellstruktur nach Abemaciclib-Monotherapie in HNSCC16 P1 M1. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine Polysomie und die damit erhöhte Kopienzahl des *CDK4*-Gens das Ansprechen auf Abemaciclib, insbesondere in Kombinationsgabe mit Cisplatin, steigert. Aufgrund dessen schlagen wir, zusätzlich zu der bekannten *CDKN2A*-Deletion, *CDK4*-Zuwächse als Biomarker für das Ansprechen auf Abemaciclib vor.

Für die weiterführende Untersuchung zytotoxischer Effekte der ausgewählten Therapien wurde der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach zwei Behandlungszyklen à 72 h erfasst. Dabei konnten vitale Zellen von nekrotischen sowie von früh- und spät-apoptotischen Zellen differenziert werden. Es war zu erkennen, dass die verschiedenen Behandlungsschemata Apoptose und Nekrose in unterschiedlichem Ausmaß induzierten. Die Zelllinie HNSCC16 P1 M1 zeigte unter der Monotherapie mit Cisplatin und Abemaciclib einen leichten

Anstieg nekrotischer und apoptotischer Zellen. Unter der dualen CDK-Inhibition mit Abemaciclib und THZ1 zeigte sich eine deutliche Zunahme an Nekrose. Die Kombinationstherapie aus Cisplatin und THZ1 wiederum führte zu einem Anstieg der Nekrose- und der Apoptoserate. Ähnlich Ergebnisse konnten auch in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe anhand der Zelllinien UT-SCC-14 und UT-SCC-15 gewonnen werden. Hier zeigte sich unter der Therapie von THZ1 in Mono- v.a. aber in Kombinationstherapie eine Induktion der Apoptose oder einer Mischform aus Apoptose und Nekrose⁴². Die Zelllinie HNSCC46 P0 M2 wiederum zeigte allein unter der Behandlung mit Cisplatin einen deutlichen Anstieg des Zelltodes, welcher auch in Kombinationsansätzen nicht gesteigert werden konnte. Andere Therapien hatten einen deutlich geringeren Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen an den Zelllinien UT-SCC-14 und UT-SCC-15, bei welchen Cisplatin eine eher untergeordnete Relevanz in der Zelltodinduktion spielte, während bspw. unter der Therapie mit THZ1 oder 5-FU ein deutlich gesteigerter Anteil früh-apoptotischer Zellen nachgewiesen wurde⁴². Der Vergleich der Studien zeigt einmal mehr, dass HNSCC durch ein hohes Maß intertumoraler Heterogenität geprägt sind, was im Behandlungssetting berücksichtigt werden sollte^{98,99}.

Dass nach zwei Behandlungszyklen nur bis zu 30 % der Zellen in eine Form des Zelltodes übergingen, ist sehr wahrscheinlich darin begründet, dass insbesondere sehr sensible Zellen bereits beim ersten Zyklus abstarben, weshalb diese nach dem zweiten Zyklus nicht mehr quantifiziert werden konnten.

Da bereits in früheren Studien gezeigt wurde, dass die Behandlung von Tumorzellen mit CDKi zur Induktion von Autophagie führen kann^{100,101}, wurde dies weiterhin mittels Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Durch den Mechanismus der Autophagie wird zelluläres Material in Lysosomen transportiert, wodurch der Umsatz zu Energie und Makromolekülen ermöglicht wird. Im Rahmen einer malignen Tumorerkrankung wird Autophagie aktuell mit konkurrierenden und kontextabhängigen Effekten diskutiert¹⁰², da Autophagie von Zellen auch in Stresssituationen genutzt wird, um ein längeres Überleben zu sichern¹⁰³. Dies kann mit einer Tumprogression und der Ausbildung von Resistenzen gegenüber antitumoralen Therapien assoziiert sein⁴⁶. Zugleich wird der Autophagie eine Tumorsuppressorfunktion zugeschrieben, welche gezielt in der Behandlung von Tumorerkrankungen adressiert werden könnte^{104,105}. So wird vermutet, dass das Rb-Protein diese Tumorsuppression ausübt, indem es den Transkriptionsfaktor E2F herunterregulieren und auf diese Weise eine Autophagieinduktion bewirken könnte¹⁰⁶. Da sich viele Therapien und andere äußere Einflüsse auf die Autophagozytose der Tumorzellen auswirken¹⁰² und diese sich wiederum bspw. auf das TME¹⁰⁷, sollte das Verständnis für diese Veränderungen ausgebaut werden. Dadurch könnten zukünftig individuellere Therapiekonzepte für Patient:innen etabliert werden¹⁰². Anhand der mikroskopischen Aufnahmen ist im Falle der Zelllinie HNSCC16 P1 M1, wie auch für andere Entitäten beschrieben

wurde^{108,109}, eine Therapie-assoziierte Induktion der Autophagie durch die Behandlung mit Cisplatin und Abemaciclib in Mono- und verschiedenen Kombinationstherapien zu erkennen. Zusätzlich lassen sich morphologische Zellveränderungen feststellen, insbesondere das deutliche Anschwellen der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei der Zelllinie HNSCC48 P0 M1, während die HNSCC46 P0 M2 nur sehr geringe Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen erkennen ließ. In weiteren Studien sollte die Rolle der Autophagie in der antitumoralen Therapie weiter untersucht werden, um die erhobenen Ergebnisse besser einordnen zu können, als es im Rahmen der aktuellen Diskussion möglich ist.

In einem weiteren Schritt wurde die Induktion einer Seneszenz unter den bereits zuvor untersuchten Therapien betrachtet. Als zelluläre Seneszenz wird ein hochstabiler Zellzyklusarrest bezeichnet, welcher als Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren ausgelöst werden kann und zu einer Inhibition der Proliferation durch Begrenzung der Replikation geschädigter und gealterter DNA führt⁴⁸. Auf diese Weise werden die Zellen in Stresssituationen vor unnötiger Schädigung bewahrt¹¹⁰. Zugleich wird Seneszenz als Barriere zur Verhinderung der Tumorgenese betrachtet¹¹⁰. Es ist bereits bekannt, dass verschiedene zielgerichtete Therapien^{110,111} das Potential der Seneszenz-Induktion bergen, darunter auch die CDK-Inhibitoren¹¹⁰. Hierbei wird insbesondere Palbociclib als proseneszenter Wirkstoff in der Behandlung verschiedener Entitäten betrachtet^{112,113}, doch könnte Abemaciclib teilweise sogar potenter auf die Induktion der Seneszenz wirken²⁹. Der gezielte Einsatz der potentiell antitumoralen Wirkung von Seneszenz wird bereits diskutiert. Der Ansatz der sogenannten Proseneszenz-Therapie für Tumorerkrankungen unterscheidet sich dabei von der Chemotherapie-induzierten Seneszenz darin, dass sie ausschließlich Tumorzellen adressiert¹¹⁴. Wir untersuchten exemplarisch die Zelllinien HNSCC16 P1 M1 und HNSCC46 P0 M2 auf ihr Seneszenzpotential. Es zeigte sich, dass nur einzelne Zellen seneszent wurden. Die deutlichsten Ergebnisse wurden bei Behandlung der Zelllinie HNSCC46 P0 M2 unter Abemaciclib-haltigen Mono- und Kombinationstherapien beobachtet. Insbesondere unter dualer CDK-Inhibition traten vermehrt Zellen in Seneszenz über. Hier zeigt sich erneut die Individualität der HNSCCs. Gleichzeitig besteht ein Bedarf an Folgearbeiten, um ein Verständnis für diese zu generieren. So ist bekannt, dass p53-mutierte Zellen offenbar sehr resistent gegen die Induktion von Seneszenz sind, was v.a. auf die Hemmung der Immun-Checkpoint-Funktion von p53 zurückgeführt wird, welche eine Reaktion auf Seneszenz-induzierte Stresssignale darstellt¹¹⁵. Es wurde histologisch jedoch sowohl für den Fall HNSCC16 als auch für HNSCC46 ein nicht-mutationstypisches p53-Expressionsmuster identifiziert, sodass hier kein Erklärungsansatz für die Seneszenz-Resistenz der Zelllinie HNSCC16 P1 M1 gefunden werden kann.

Die von uns gewonnenen Ergebnisse bestätigen die bereits genannten Vorerkenntnisse in Bezug auf die Seneszenz-Induktion durch Abemaciclib. Es sind allerdings weiterführende Untersuchungen nötig, ob eine Proseneszenz-Therapie als neue Säule im Rahmen einer HNSCC-Behandlung genutzt werden kann.

5.4 ETABLIERUNG EINES ZELLINIEN-ABGELEITETEN XENOGRAFTMODELLS

In abschließenden *in vivo* Analysen wurden neben dem tumorigenen Potential auch das Ansprechen auf ausgewählte Therapeutika erfasst. Hinsichtlich der Engraftmentrate nach subkutaner Applikation der HNSCC-Zellen in die Flanken von NSG Mäusen konnten Unterschiede detektiert werden. Zwei der drei Zelllinien zeigten ein rasches Engraftment bereits nach wenigen Tagen, wohingegen es bei der HNSCC46 P0 M2 mehrere Wochen dauerte, bis es zur Tumorbildung *in vivo* kam. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in der geringeren PDT dieser Zelllinie *in vitro* im Vergleich zu den beiden anderen liegen, wobei diese deutlich geringer ausgeprägt war als der Unterschied in der Engraftmentgeschwindigkeit. Ähnliche Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien einer Entität wurde bspw. bereits für das Ovarialkarzinom beschrieben¹¹⁶. Es wird auch berichtet, dass einige Zelllinien an verschiedenen anatomischen Lokalisationen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Tumorigenität aufweisen können¹¹⁶. Es ist denkbar, dass dies auch auf HNSCC-Zelllinien zutrifft, die Untersuchung einer solchen Annahme war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dennoch konnte an zwei von drei Zelllinien gezeigt werden, dass sie für eine Anwendung in 3D-Modellen geeignet sind, wodurch natürlichere Interaktionen zwischen TME, Transporteigenschaften, Sauerstoff und Nährstoffversorgung sowie Proliferationsgradienten demonstriert werden. Weiterführende Untersuchungen werden hier für ein tieferes Verständnis hinsichtlich der tumoralen Eigenschaften benötigt.

In einem nächsten Schritt wurde die Zelllinie HNSCC16 P1 M1 exemplarisch für die Verwendung von *in vivo* Therapieversuchen mit Dinaciclib und Cisplatin genutzt. Es konnte in dieser Untersuchung kein Erfolg der *in vivo* Monotherapien festgestellt, sondern lediglich unter der Kombinationsapplikation der Wirkstoffe ein etwas verlangsamtes Tumorwachstum nachgewiesen werden. In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe wurden die Zelllinien UT-SCC-14 und UT-SCC-15 ebenfalls auf ihr *in vivo* Ansprechen auf Cisplatin und/oder Dinaciclib untersucht, wobei das gleiche Therapieschema verwendet wurde. Dabei wurden NMRI Foxn1^{nu} Mäuse verwendet. Es zeigte sich ein heterogenes Bild: Während bei der Zelllinie UT-SCC-15 das mediane Überleben unter der Gabe von Dinaciclib in Mono- oder Kombinationstherapie signifikant verlängert wurde (63 Tage vs. 42 Tage), zeigte die Linie UT-SCC-14

nur ein sehr geringes Ansprechen⁴². Bei anderen Tumorentitäten konnten hingegen vielversprechendere Ergebnisse erzielt werden. So wurden athymischen weiblichen Nacktmäusen subkutan anaplastische Schilddrüsenkarzinomzellen injiziert und nach dem Engraftment täglich 40 mg/kg KG bzw. 50 mg/kg KG Dinaciclib über je 12 Tage intraperitoneal verabreicht. Für beide Dosen zeigte sich ein signifikant retardiertes Tumorwachstum, welches bis zum letzten Therapietag anhielt¹¹⁷.

Auch in Bezug auf das Überleben der Tiere unter Therapie konnte in unseren Untersuchungen kein Vorteil erzielt werden. Einzig die Gabe von Dinaciclib in Monotherapie führte zu einem etwas verlängerten Gesamtüberleben. Allerdings sind diese Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig, da die Tumoren insbesondere unter der Kombinationstherapie von Dinaciclib und Cisplatin vermehrt ulzerierten, was als absolutes Abbruchkriterium definiert war, sodass die Tiere nicht an der Grunderkrankung, sondern an Therapie-assoziierten Komplikationen verstarben. Tumorulzerationen in ektopen Tumormodellen treten häufig Therapie-assoziiert auf¹¹⁸, stellen u.a. aufgrund der potentiellen Infektionsgefahr jedoch ein Abbruchkriterium dar. Dennoch bieten andere Studien Grund zur Annahme, dass Dinaciclib als Wirkstoff *in vivo* geeignet sein könnte. So zeigte sich in der vorgenannten Studie ein verlängertes Überleben der Therapietiere, die Tumoren der Zelllinien UT-SCC-15 hatten, gegenüber denen mit der Zelllinie UT-SCC-14. Jedoch mussten auch hier aufgrund von Tumorulzerationen vermehrt Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen werden⁴².

5.4.1 VOR- UND NACHTEILE DES VERWENDETEN MAUSMODELLS

Seit Ende des 19. Jahrhunderts werden Mäuse als Versuchstiere in der biologischen Basisforschung eingesetzt¹¹⁹. Sie eignen sich besonders gut aufgrund ihrer kurzen Generationszeit und hohen Reproduktionsrate¹¹⁹. Zudem sind sie klein und in ihrer Haltung verhältnismäßig anspruchslos¹¹⁹. Weiterhin finden sie breite Verwendung in der humanbiologischen und -medizinischen Forschung, da ihr Genom zu einem Großteil mit dem menschlichen übereinstimmt (ca. 85 % der kodierenden Genabschnitte)¹¹⁹. Dieses Genom kann wiederum bei Bedarf manipuliert werden, um spezifische Eigenschaften zu forcieren oder zu unterdrücken. All diese Aspekte machen Mäuse zu idealen Versuchstieren¹¹⁹.

Zugleich sollten Versuchsergebnisse, die durch die Verwendung von Tierversuchen gewonnen wurden, stets kritisch hinterfragt und betrachtet werden, da sie in ihrer Aussagekraft aufgrund der Unterschiede zwischen Tier und Mensch limitiert sind¹¹⁹. So unterscheiden sich Maus und Mensch bereits durch ihre Größe und ihr Gewicht, was sich auf zahlreiche biochemische und biologische Prozesse im Körper auswirkt. Diese Parameter (bspw. Der Grundumsatz) wirken sich wiederum auf physiologische und anatomische Aspekte der jeweiligen Spezies aus. Weiterhin unterscheiden sich Menschen und Mäuse in ihrer Lebenserwartung, dem Zeitpunkt der Geschlechtsreife oder der Reproduktionsrate.

Die *in vivo* Versuche erfolgten an NSG Mäusen, welche sich durch ein komplexes Defizit des Immunsystems auszeichnen. Ihnen fehlen T-, B-, funktionelle NK-Zellen sowie die Allele der gemeinsamen Gamma-Kette des IL2-Rezeptors. Dadurch kommt es zu einer fehlenden Zytokin-Signalübertragung über mehrere Rezeptoren¹²⁰. Somit bieten sie zwar ein ideales Modell für eine möglichst hohe Engraftmentrate von Tumoren, zugleich können sie durch eine ausbleibende Immunantwort nicht das natürliche Milieu für die Tumoren imitieren. Aufgrund des Immundefizits leben NSG Mäuse in der spezifisch Pathogen-freien Tierhaltung. Das ihnen zur Verfügung gestellte Futter und Wasser, Einstreu und Nestmaterial wird zuvor durch Autoklavieren, Bestrahlung und Filtration sterilisiert. Auf diese Weise werden die Tiere vor Infektionen mit Keimen aus der Umwelt geschützt. Zugleich sind Patient:innen diesen Keimen ausgesetzt. Ebenso spielen Einflüsse, wie bspw. das Mikrobiom des Darms und der Mukosa eine Rolle in Bezug auf den Metabolismus, die Effektivität und Toxizität von Medikamenten^{119,121,122}. Dieses wird beeinflusst durch die Ernährung, Infektionen und Lebensstil und befindet sich dauerhaft im Wandel. Die unveränderte, keimfreie Nahrung der Mäuse führt als Konsequenz zu einem grundlegend anderen Mikrobiom als bei Menschen, bei welchen wiederum ein hohes Maß an intra- und interpersoneller Variabilität herrscht¹²³.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das verwendete Mausmodell nur bedingt ein Therapieansprechen im menschlichen Körper prognostizieren kann – insbesondere im Hinblick auf die Relevanz der Interaktion von Tumor- und Immunsystem. Zugleich konnte gezeigt werden, dass das expandierte PDX-Gewebe im molekularen und genetischen Profil dem primären Tumorgewebe entspricht. Das Modell ist demnach sehr gut für diese Gewebeexpansion geeignet, wodurch vermehrt Gewebeproben für präklinische Fragestellungen zur Verfügung stehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses (HNSCC) sind hochgradig heterogen, sowohl inter- wie auch intratumoral. Sie werden in der Regel multimodal therapiert, einschließlich chirurgischer Intervention, Strahlen- und Chemotherapie, durch ihre oftmals erst späte Diagnose und unzureichendes Therapieansprechen ist die Prognose für betroffene Patient:innen jedoch weiterhin oftmals ungünstig. Deshalb werden zum einen effektivere, gezieltere Therapien benötigt. Gleichzeitig muss aber auch ein vertieftes Verständnis für die Heterogenität dieser Tumorentität geschaffen werden. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit drei neue HNSCC-Zelllinien etabliert, charakterisiert und in weiterführenden Versuchen auf verschiedene molekulare und zelluläre Mechanismen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit klassischen Zytostatika und Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKi), als vielversprechende zielgerichtete Behandlungsoptionen im Sinne einer personalisierten Tumorthherapie, behandelt. Für die Etablierung der Zelllinien konnte dabei auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, inklusive einer neu aufgebauten HNSCC-Biobank zurückgegriffen werden. Basierend auf den *in vitro* gewonnenen Daten wurde schließlich ein *in vivo* NSG Mausmodell herangezogen. Die so in dieser Arbeit kombinierte Verwendung eines PDX-Modells, PDX-abgeleiteter Zelllinien und Zelllinien-abgeleiteter Xenografts stellt eine gute Grundlage dar, um die Komplexität der HNSCCs abzubilden, indem die Vorteile der verschiedenen präklinischen Modelle genutzt und etwaige Nachteile kompensiert werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass die Substanzklasse der CDKi als potentielle antitumorale und immunmodulatorische Therapeutika für HNSCCs in Frage kommen. In initialen Untersuchungen zur Chemoresponsivität der Zelllinien wurde ein Ansprechen auf CDKis und Zytostatika gezeigt. Hier stellte sich eine bessere Responsivität auf globalwirksame CDKis gegenüber den selektiven CDK4/6 Inhibitoren dar. In den folgenden Kombinationsversuchen mit Zytostatika und CDKis wurden für zwei der drei Zelllinien synergistische Effekte und damit eine erhöhte Sensitivität gegenüber der CDK-Inhibition detektiert. Als besonders effektiv stellten sich die Kombinationen Abemaciclib/THZ1 und Abemaciclib/Cisplatin heraus. Hervorzuheben ist dabei, dass es hier offenbar zu einer Aufhebung der zuvor in Monotherapie festgestellten Resistenz gegen Abemaciclib in Monotherapie bei einer der Zelllinien kam.

Sowohl in Mono- wie auch in verschiedenen Kombinationstherapien konnten Effekte nachgewiesen werden, welche neben Veränderungen des Phänotyps auch die Zytotoxizität in Form von Apoptose/Nekrose und Autophagie betreffen. Hier ist in künftigen Arbeiten eine Kombination mit einem anti-PD1 bzw. PD-L1 Antikörper denkbar, um die PD1/PD-L1-Interaktion aufzuheben. Besonders ist hier die Hochregulation von MHC I und PD-L1 durch Abemaciclib in Mono- und Kombinationstherapie zu nennen, vermutlich resultierend aus der Inhibition der

CDK4. Abemaciclib könnte somit eine Therapieoption für Patient:innen darstellen, die nicht auf eine Behandlung mit anti-PD1 Antikörpern ansprechen.

In einem weiteren Versuch wurde das *in vitro* Zelllinien-Modell auf ein murines *in vivo* Xenograftmodell übertragen. Hier wurde ein zelllinienspezifisches tumorigenes Potential nachgewiesen, welches sich in Anlehnung an die jeweilige *in vitro* Wachstumskinetik nachvollziehen lässt. Es war im abschließenden *in vivo* Therapieversuch erkennbar, dass die zuvor gewonnenen *in vitro* Daten hier nur eine bedingte Aussagekraft zeigten. Hierfür ist die Kombination der vorgenannten präklinischen Modelle essentiell.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die neu etablierten Tumormodelle bei der Auswahl von Arzneimittel(kombinationen) hilfreich sind. Durch sie können intrinsische und erworbene Resistenzmechanismen erkannt werden. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit *CDK4*-Zuwächse als neuer *Surrogat*-Marker für das Ansprechen auf Abemaciclib identifiziert, welche eine ideale Basis für weiterführende translationale Ansätze darstellt.

VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: PROZENTUALER ANTEIL DER HÄUFIGSTEN TUMORLOKALISATIONEN AN ALLEN KREBSNEUERKRANKUNGEN IN DEUTSCHLAND 2016 (OHNE NICHT-MELANOTISCHEN HAUTKREBS) ³	1
ABBILDUNG 2: ÜBERSICHT ZELLZYKLUS UND CDKS. ERSTELLT MIT <i>BIORENDER.COM</i>	6
ABBILDUNG 3: DER ZELLZYKLUS MIT CDKS UND IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN CDKIS SOWIE DEREN MOLEKULARE ANGRIFFSPUNKTE. ERSTELLT MIT <i>BIORENDER.COM</i>	8
ABBILDUNG 4: ÜBERSICHT DER TUMORAUFBEREITUNG FÜR DIE AUFNAHME IN DIE BIOBANK. ERSTELLT MIT <i>BIORENDER.COM</i>	22
ABBILDUNG 5: METHODIK PROLIFERATIONSINDEX. ERSTELLT MIT <i>BIORENDER.COM</i>	27
ABBILDUNG 6: METHODIK PHÄNOTYPISIERUNG UND APOPTOSE-NEKROSE-ASSAY. ERSTELLT MIT <i>BIORENDER.COM</i>	32
ABBILDUNG 7: LICHTMIKROSKOPISCHE FOTOGRAFIEEN DER ZELLINIEN. JEWEILS IN FRÜHER UND SPÄTERER PASSAGE. VERGRÖßERUNG: 100 X.	37
ABBILDUNG 8: REPRÄSENTATIVE MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER TUMORFÄLLE. TUMORFÄLLE <i>HNSCC16</i> , <i>HNSCC46</i> UND <i>HNSCC48</i> IN HE-, KI67-, PD-L1-, P16- UND P53-FÄRBUNG..	38
ABBILDUNG 9: FINGERPRINT-PCR DES PRIMÄR-, PDX-GEWEBES UND DER ZELLINIEN. (A) <i>HNSCC16</i> (B) <i>HNSCC46</i> (C) <i>HNSCC48</i> . ZUR BESTÄTIGUNG MIT DER PATIENTENIDENTITÄT. BENUTZTE LOCI: <i>D5S818</i> , <i>D13S317</i> , <i>D7S820</i> , <i>D16S539</i> , <i>vWA</i> , <i>THO1</i> , <i>TPOX</i> , <i>CSF1PO</i> UND <i>AMELOGENIN X</i> UND <i>Y</i> . <i>HEX</i> (GRÜN), <i>FAM</i> (BLAU), <i>TAMRA</i> (ROT).	39
ABBILDUNG 10: CYTO-FISH FÜR <i>CDKN2A</i> UND <i>CDK4</i> . CYTOSPINS VON <i>HNSCC</i> -ZELLINIEN WURDEN MIT DER <i>SPEC CDK4/CEN 12 DUAL COLOR PROBE</i> ODER <i>SPEC CDKN2A/CEN9 DUAL COLOR PROBE</i> ANGEFÄRBT, UM DIE GENSPEZIFISCHE AMPLIFIKATION VON <i>CDKN2A</i> UND <i>CDK4</i> ZU ÜBERPRÜFEN. DIE ROTEN PUNKTE ZEIGEN DIE ZENTROMERE UND DIE GRÜNEN PUNKTE DAS SPEZIFISCHE GEN AN. DIE AUSLESUNG ERFOLGTE MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP <i>OLYMPUS BX53</i> . ORIGINALVERGRÖßERUNG: 1000 X.	40
ABBILDUNG 11: PROLIFERATIONSINDEX. DAS PROLIFERATIONSVERHÄLTNIS DER ZELLINIEN WURDE ÜBER FÜNF TAGE BEOBACHTET UND LICHTMIKROSKOPISCH DOKUMENTIERT. ORIGINALVERGRÖßERUNG: 100 X. DARGESTELLT SIND REPRÄSENTATIVE BILDER ZUM JEWEILIGEN DOKUMENTATIONSZEITPUNKT. UNTER DER ABBILDUNG IST DIE ERMITTELTE POPULATION DOUBLING TIME (PDT) ± SD ANGEZEIGT, RESULTIEREND AUS N=3 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN.	41
ABBILDUNG 12: MIGRATION. DAS MIGRATIONSPOTENTIAL WURDE MITTELS WOUND HEALING-ASSAY UNTERSUCHT. DIE ZUGEFÜGTE WUNDE WURDE TÄGLICH LICHTMIKROSKOPISCH BEOBACHTET, BIS DIE WUNDE GESCHLOSSEN WAR. ORIGINALVERGRÖßERUNG: 100 X.	42

ABBILDUNG 13: INVASION. DAS INVASIONSPOTENTIAL WURDE ANHAND EINER MODIFIZIERTEN BOYDEN-CHAMBER-ASSAYS ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 72 H ERFASST. DIE ANZAHL INVADIERENDER ZELLEN WURDE MITTELS WST-1 ASSAY SPEKTROMETRISCH ERFASST (ABSORPTION: 450 NM). ALS KONTROLLE WURDEN UT-SCC-15 ZELLEN (HNSCC, NODALES REZIDIV) EINGESETZT, DEREN INVASIONSPOTENTIAL IN VORHERIGEN UNTERSUCHUNGEN BESTÄTIGT WURDE. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD, N = 3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE, 1WAY ANOVA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ VS. INVASION DER UT-SCC-15.....	43
ABBILDUNG 14: FACS-BASIERTE PHÄNOTYPISIERUNG UND IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG. FACS-BASIERTE PHÄNOTYPISIERUNG FÜR MHC I, MHC II, PD1 UND PD-L1 (OBEN) UND IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON PD1 (UNTEN) ZUR BESTÄTIGUNG VON PD1 AUF DER OBERFLÄCHE VON HNSCC46 P0 M2. DIE ANALYSE ERFOLGTE MIT DEM ZEISS ELYRA 7 CONFOCAL LASER MICROSCOPE (ZEISS). ORIGINALVERGRÖßERUNG: 400 X. DARGESTELLT SIND REPRÄSENTATIVE AUFNAHMEN VON N = 3 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN.	44
ABBILDUNG 15: BASALE ABUNDANZ VERSCHIEDENER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE. QUANTITATIVE ABUNDANZ DER MOLEKÜLE MHC I, PD-L1 UND PD1 DER ZELLINIEN HNSCC16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 UND HNSCC48 P0 M1 IN FRÜHEN PASSAGEN. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD, N = 2-4 UNABHÄNGIGE VERSUCHE.....	44
ABBILDUNG 16: DOSISREIHEN DER ZELLINIEN HNSCC16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 UND HNSCC48 P0 M1. ES WURDE DIE BIOMASSE DER ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN DOSEN DER WIRKSTOFFE CISPLATIN, 5-FU, CETUXIMAB SOWIE DER CDKIS PALBOCICLIB, ABEMACICLIB, DINACICLIB UND THZ1 UNTERSUCHT. ANGEGEBEN IST DER MITTELWERT + SD AUS N = 3 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN. KRUSKAL-WALLIS UND DUNN'S MULTIPLE COMPARISON BZW. U-TEST. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ VS. KONTROLLE.	46
ABBILDUNG 17: HEATMAP DER BERECHNETEN BLISS-INDIZES AUSGEWÄHLTER THERAPIEKOMBINATIONEN. ERSTELLT MIT.....	49
ABBILDUNG 18: PHÄNOTYPISIERUNG NACH THERAPIE. DARSTELLUNG VON MHC I UND PD-L1-POSITIVEN ZELLEN IM VERHÄLTNIS ZUR KONTROLLE. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD AUS N=3 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN. KRUSKAL-WALLIS. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ VS. KONTROLLE.	50
ABBILDUNG 19: APOPTOSE-NEKROSE-ASSAY. FRÜH APOPTOTISCHE ZELLEN SIND DEFINIERT ALS POSITIV FÜR Yo-PRO1, SPÄT APOPTOTISCHE ZELLEN ALS POSITIV FÜR YoPRO1 UND PI UND NEKROTISCHE ZELLEN ALS PI-POSITIV. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD AUS N=4 UNABHÄNGIGEN VERSUCHEN. KRUSKAL-WALLIS VS. KONTROLLE.	52
ABBILDUNG 20: REPRÄSENTATIVE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER HNSCC ZELLEN ZUM NACHWEIS VON AUTOPHAGIE. DIE AUFNAHMEN WURDEN ERSTELLT AM ZEISS ELYRA 7 CONFOCAL LASER MICROSCOPE (ZEISS). ORIGINALVERGRÖßERUNG: 400 X.	53

ABBILDUNG 21: REPRÄSENTATIVE LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER HNSCC ZELLEN ZUM NACHWEIS VON SENESZENZ. <i>SENESZENZINDUKTION DER ZELLINIEN HNSCC16 P1 M1 UND HNSCC46 P0 M2 DURCH VERSCHIEDENE MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIEN. ORIGINALVERGRÖßERUNG: 100 X.</i>	54
ABBILDUNG 22: ENGRAFTMENT DER ZELLINIEN HNSCC 16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 UND HNSCC48 P0 M1 <i>IN VIVO</i> IN NSG MÄUSEN. DARGESTELLT IST DAS TUMORVOLUMEN IN MM ² IM ZEITVERLAUF. ANGEGEBEN SIND DER MITTELWERT + SD, N = 4 - 7 TIERE/INDIVIDUELLEM XENOGRAFT......	55
ABBILDUNG 23: HNSCC48 P0 M1 TUMORWACHSTUMSKURVE UNTER MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIEN MIT CISPLATIN UND DINACICLIB <i>IN VIVO</i> . DARGESTELLT IST DAS TUMORVOLUMEN IN RELATION ZUM THERAPIEBEGINN [=1] ZEITVERLAUF. MITTELWERT + SD, N = 7 TIERE/GRUPPE......	56
ABBILDUNG 24: KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE VON NSG MÄUSEN UNTER MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE MIT CISPLATIN UND DINACICLIB. N = 7 TIERE/GRUPPE.	57

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DEREN KOMBINATIONSANSÄTZE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG......	31
TABELLE 2: METHODIK FINGERPRINT PCR......	34
TABELLE 3: KLINISCHE DATEN DER STUDIENFÄLLE UND DAZUGEHÖRIGEN ZELLINIEN HNSCC16 P1 M1, HNSCC46 P0 M2 UND HNSCC48 P0 M1. SPÄTER: POSTOPERATIV. RCT: RADIOCHEMOTHERAPIE.	36
TABELLE 4: IC ₅₀ FÜR DIE JEWEILIGEN TESTSUBSTANZEN......	47
TABELLE 5: IN FOLGEVERSUCHEN VERWENDETE DOSIS FÜR DIE JEWEILIGEN TESTSUBSTANZEN.	48

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Stenzinger A, Kriegsmann M, Kraywinkel K, Weichert W. Pathologie der malignen kopf-hals-tumoren. Epidemiologie und histologische subtypen. *Onkologe*. 2014;20(2):116-129. doi:10.1007/s00761-013-2584-z
 2. McDermott JD, Bowles DW. Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies. *Curr Treat Options Oncol*. 2019;20(5). doi:10.1007/s11864-019-0650-5
 3. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2015 / 2016. *Robert Koch Inst*.
-

- 2019;(12. Ausgabe):160.
4. Jansen L, Buttmann-Schweiger N, Listl S, et al. Differences in incidence and survival of oral cavity and pharyngeal cancers between Germany and the United States depend on the HPV-association of the cancer site. *Oral Oncol.* 2018;76(November 2017):8-15. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.11.015
 5. Onkologie L. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. Published online 2021:1-156.
 6. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
 7. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012 3115. 2011;31(15):1869-1883. doi:10.1038/onc.2011.384
 8. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019;88(April):102925. doi:10.1016/j.bioorg.2019.102925
 9. Zhao M, Wang T, Hui Z. Aspirin overcomes cisplatin resistance in lung cancer by inhibiting cancer cell stemness. *Thorac Cancer.* 2020;11(11):3117. doi:10.1111/1759-7714.13619
 10. Modur V, Robbins KT, Rao K. HPV and CSC in HNSCC cisplatin resistance. *Front Biosci - Elit.* 2015;7E(1):66-76. doi:10.2741/E717
 11. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330-338. doi:10.1038/nrc1074
 12. Wigmore PM, Mustafa S, El-Beltagy M, Lyons L, Umka J, Bennett G. Effects of 5-FU. *Adv Exp Med Biol.* 2010;678:157-164. doi:10.1007/978-1-4419-6306-2_20
 13. Papanastasopoulos P, Stebbing J. Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: Lessons from clinical practice. *Anticancer Res.* 2014;34(4):1531-1536.
 14. Fornasier G, Francescon S, Baldo P. An Update of Efficacy and Safety of Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer: A Narrative Review. *Adv Ther.* 2018;35(10):1497-1509. doi:10.1007/s12325-018-0791-0
 15. Hanck-Silva G, Fatori Trevizan LN, Petrilli R, de Lima FT, Eloy JO, Chorilli M. A Critical Review of Properties and Analytical/Bioanalytical Methods for Characterization of Cetuximab. *Crit Rev Anal Chem.* 2020;50(2):125-135. doi:10.1080/10408347.2019.1581984
 16. Kwok G, Yau TCC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccines Immunother.* 2016;12(11):2777-2789. doi:10.1080/21645515.2016.1199310
 17. Wienecke A, Kraywinkel K. Epidemiology of head and neck cancer in Germany. *Onkologe.* 2019;25(3):190-200. doi:10.1007/s00761-019-0534-0
 18. Poon RYC. Cell cycle control: A system of interlinking oscillators. *Methods Mol Biol.* 2016;1342:3-19. doi:10.1007/978-1-4939-2957-3_1
-

19. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003;36(3):165-175. doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00267.x
 20. Schafer KA. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol.* 1998;35(6):461-478. doi:10.1177/030098589803500601
 21. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):153-166. doi:10.1038/nrc2602
 22. Poratti M, Marzaro G. Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *Eur J Med Chem.* 2019;172:143-153. doi:10.1016/j.ejmech.2019.03.064
 23. Lolli G, Johnson LN. CAK-Cyclin-Dependent Activating Kinase: A key kinase in cell cycle control and a target for Drugs? *Cell Cycle.* 2005;4(4):565-570. doi:10.4161/cc.4.4.1607
 24. Wood DJ, Endicott JA. Structural insights into the functional diversity of the CDK–cyclin family. *Open Biol.* 2018;8(9). doi:10.1098/rsob.180112
 25. Krajewska M, Dries R, Grassetti A V., et al. CDK12 loss in cancer cells affects DNA damage response genes through premature cleavage and polyadenylation. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-09703-y
 26. Wang F, Zhao W, Gao Y, et al. CDK5-mediated phosphorylation and stabilization of TPX2 promotes hepatocellular tumorigenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):1-15. doi:10.1186/s13046-019-1297-6
 27. Riess C, Irmscher N, Salewski I, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors in head and neck cancer and glioblastoma—backbone or add-on in immune-oncology? *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(1):153-171. doi:10.1007/s10555-020-09940-4
 28. Belaidi L, Baba-Hamed N, Savinelli F, Raymond E. Posterior Reversible Encephalopathy Occurring During Treatment With Palbociclib. *Cureus.* 2021;13(September 2020). doi:10.7759/cureus.16604
 29. Tamura K. Differences of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, palbociclib and abemaciclib, in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2019;49(11):993-998. doi:10.1093/jjco/hyz151
 30. Mita MM, Mita AC, Moseley JL, et al. Phase 1 safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib administered every three weeks in patients with advanced malignancies. *Br J Cancer.* 2017;117(9):1258-1268. doi:10.1038/bjc.2017.288
 31. Parry D, Guzi T, Shanahan F, et al. Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(8):2344-2353. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0324
 32. Li B-B, Wang B, Zhu C-M, et al. Cyclin-dependent kinase 7 inhibitor THZ1 in cancer
-

- therapy. *Chronic Dis Transl Med*. 2019;5(3):155-169. doi:10.1016/j.cdtm.2019.08.006
33. Larochelle S, Merrick KA, Terret ME, et al. Requirements for Cdk7 in the Assembly of Cdk1/Cyclin B and Activation of Cdk2 Revealed by Chemical Genetics in Human Cells. *Mol Cell*. 2007;25(6):839-850. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.003
34. Lum DH, Matsen C, Welm AL, Welm BE. Human Primary Tumorgraft Models: Comparisons with Traditional Oncology Pre-Clinical Models and The Clinical Relevance and Utility of Primary Tumorgrafts in Basic and Translational Oncology Research. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012;CHAPTER(SUPPL.59):Unit14.22. doi:10.1002/0471141755.PH1422S59
35. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):1-17. doi:10.3390/IJMS21176225
36. Williams SA, Anderson WC, Santaguida MT, Dylla SJ. Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century. *Lab Invest*. 2013;93(9):970-982. doi:10.1038/labinvest.2013.92
37. Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells*. 2019;8(1). doi:10.3390/CELLS8010074
38. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(6):338-350. doi:10.1038/nrclinonc.2012.61
39. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther*. 2003;2(4 Suppl 1). doi:10.4161/cbt.213
40. Jung J, Seol HS, Chang S. The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. *Cancer Res Treat*. 2018;50(1):1. doi:10.4143/CRT.2017.307
41. Zhao W, Sachsenmeier K, Zhang L, Sult E, Hollingsworth RE, Yang H. A new bliss independence model to analyze drug combination data. *J Biomol Screen*. 2014;19(5):817-821. doi:10.1177/1087057114521867
42. Schoenwaelder N, Salewski I, Engel N, et al. The individual effects of cyclin-dependent kinase inhibitors on head and neck cancer cells—a systematic analysis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(10). doi:10.3390/cancers13102396
43. Schoenwaelder N, Krause M, Freitag T, et al. Preclinical Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Models for Combined Targeted Therapy Approaches. *Cancers (Basel)*. 2022;14(10):2484. doi:10.3390/CANCERS14102484
-

44. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.1. doi:10.1002/CPIM.40
 45. Strüder D, Momper T, Irmscher N, et al. Establishment and characterization of patient-derived head and neck cancer models from surgical specimens and endoscopic biopsies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):1-13. doi:10.1186/s13046-021-02047-w
 46. Traganos F, Darzynkiewicz Z. Lysosomal Proton Pump Activity: Supravital Cell Staining with Acridine Orange Differentiates Leukocyte Subpopulations. *Methods Cell Biol*. 1994;41(C):185-194. doi:10.1016/S0091-679X(08)61717-3
 47. Uggeri J, Gatti R, Belletti S, et al. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochem Cell Biol*. 2000;122(5):499-505. doi:10.1007/s00418-004-0712-y
 48. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1238-1246. doi:10.1172/JCI95148
 49. Grünwald V, Chirovsky D, Cheung WY, et al. Global treatment patterns and outcomes among patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Results of the GLANCE H&N study. *Oral Oncol*. 2020;102:104526. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2019.104526
 50. European Medicines Agency. New treatment for breast cancer. 2016;44(September):2-3. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2016/09/WC500212906.pdf
 51. European Medicines Agency (EMA). Verzenios (Abemaciclib). [https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/verzenios/verzenios_\(last_achieved_10/2021\)](https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/verzenios/verzenios_(last_achieved_10/2021)). 2018;1(July):420258. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/mylotarg-epar-summary-public_en.pdf
 52. Sledge GW, Toi M, Neven P, et al. MONARCH 2: Abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2-advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *J Clin Oncol*. 2017;35(25):2875-2884. doi:10.1200/JCO.2017.73.7585
 53. Turner NC, Ro J, André F, et al. Palbociclib in Hormone-Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(3):209-219. doi:10.1056/NEJMOA1505270/SUPPL_FILE/NEJMOA1505270_DISCLOSURES.PDF
 54. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1738-1748. doi:10.1056/NEJMOA1609709/SUPPL_FILE/NEJMOA1609709_DISCLOSURES.PDF
 55. Tinhofer I, Braunholz D, Klinghammer K. Preclinical models of head and neck squamous cell carcinoma for a basic understanding of cancer biology and its
-

- translation into efficient therapies. *Cancers Head Neck*. 2020;5(1).
doi:10.1186/S41199-020-00056-4
56. Oppel F, Shao S, Schürmann M, Goon P, Albers AE, Sudhoff H. An Effective Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma In Vitro Model. *Cells*. 2019;8(6):555.
doi:10.3390/CELLS8060555
57. Shin DM, Charuruks N, Lippman SM, et al. p53 Protein Accumulation and Genomic Instability in Head and Neck Multistep Tumorigenesis 1. Published online 2001.
58. Ngambenjawong C, Gustafson HH, Pun SH. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;114:206.
doi:10.1016/J.ADDR.2017.04.010
59. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/FIMMU.2020.583084
60. Kim TH, Kang MS, Mandakhbayar N, El-Fiqi A, Kim HW. Anti-inflammatory actions of folate-functionalized bioactive ion-releasing nanoparticles imply drug-free nanotherapy of inflamed tissues. *Biomaterials*. 2019;207:23-38.
doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.03.034
61. Chen SMY, Krinsky AL, Woolaver RA, Wang X, Chen Z, Wang JH. Tumor Immune Microenvironment in Head and Neck Cancers. *Mol Carcinog*. 2020;59(7):766.
doi:10.1002/MC.23162
62. Watermann C, Pasternack H, Idel C, et al. Recurrent HNSCC harbor an immunosuppressive tumor immune microenvironment suggesting successful tumor immune evasion. *Clin Cancer Res*. 2021;27(2):632-644. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-0197/77165/AM/RECURRENT-HNSCC-HARBOR-AN-IMMUNOSUPPRESSIVE-TUMOR
63. Vaubel RA, Tian S, Remonde D, et al. Genomic and phenotypic characterization of a broad panel of patient derived xenografts reflects the diversity of glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2020;26(5):1094. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0909
64. Rivera M, Fichtner I, Wulf-Goldenberg A, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models of colorectal carcinoma (CRC) as a platform for chemosensitivity and biomarker analysis in personalized medicine. *Neoplasia*. 2021;23(1):21-35.
doi:10.1016/J.NEO.2020.11.005
65. Bos MK, Nasserinejad K, Jansen MPHM, et al. Comparison of variant allele frequency and number of mutant molecules as units of measurement for circulating tumor DNA. *Mol Oncol*. 2021;15(1):57. doi:10.1002/1878-0261.12827
66. Götte K, Tremmel SC, Popp S, et al. Intratumoral Genomic Heterogeneity in Advanced Head and Neck Cancer Detected by Comparative Genomic Hybridization. *Adv Otorhinolaryngol*. 2005;62:38-48. doi:10.1159/000082462
-

67. Tremmel SC, Götte K, Popp S, et al. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;144(2):165-174. doi:10.1016/S0165-4608(03)00011-6
 68. Morris LGT, Chandramohan R, West L, et al. The Molecular Landscape of Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancers: Insights From a Precision Oncology Sequencing Platform. *JAMA Oncol.* 2017;3(2):244. doi:10.1001/JAMAONCOL.2016.1790
 69. Lee MY, Allen CT. Mechanisms of resistance to T cell-based immunotherapy in head and neck cancer. *Head Neck.* 2020;42(9):2722-2733. doi:10.1002/HED.26158
 70. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883. doi:10.1056/NEJMOA1113205
 71. Jie W, Bai J, Yan J, Chi Y, Li B Bin. Multi-Site Tumour Sampling Improves the Detection of Intra-Tumour Heterogeneity in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Front Med.* 2021;8:670305. doi:10.3389/FMED.2021.670305/FULL
 72. Lopez JI, Cortes JM. A divide-and-conquer strategy in tumor sampling enhances detection of intratumor heterogeneity in routine pathology: A modeling approach in clear cell renal cell carcinoma. *F1000Research.* 2016;5:385. doi:10.12688/F1000RESEARCH.8196.2
 73. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 2017 183. 2017;18(3):153-167. doi:10.1038/nri.2017.108
 74. Wang X, Yang X, Zhang C, et al. Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(12):6640-6650. doi:10.1073/PNAS.1921445117/-/DCSUPPLEMENTAL
 75. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science.* 2011;333(6046):1154. doi:10.1126/SCIENCE.1206923
 76. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2019;394(10212):1915-1928. doi:10.1016/S0140-6736(19)32591-7
 77. Wagner S, Beger NT, Matschos S, et al. Tumour-derived cell lines and their potential for therapy prediction in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(18). doi:10.3390/CANCERS13184717/S1
 78. Hall SJ, Thompson TC. Spontaneous but not experimental metastatic activities differentiate primary tumor-derived vs metastasis-derived mouse prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis.* 1997;15(6):630-638. doi:10.1023/A:1018499515883
-

79. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Established models and rationale for selection. *Head Neck*. 2007;29(2):163-188. doi:10.1002/hed.20478
80. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(3):386-396. doi:10.1016/J.MAYOCP.2015.12.017
81. Bernier J, Domette C, Ozsahin M, et al. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. <https://doi.org/101056/NEJMoa032641>. 2004;350(19):1945-1952. doi:10.1056/NEJMOA032641
82. Hino H, Iriyama N, Kokuba H, et al. Abemaciclib induces atypical cell death in cancer cells characterized by formation of cytoplasmic vacuoles derived from lysosomes. *Cancer Sci*. 2020;111(6):2132. doi:10.1111/CAS.14419
83. Riess C, Koczan D, Schneider B, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors exert distinct effects on patient-derived 2D and 3D glioblastoma cell culture models. *Cell Death Discov*. 2021;7(1):54. doi:10.1038/S41420-021-00423-1
84. Arora M, Bogenberger JM, Abdelrahman AM, et al. Synergistic combination of cytotoxic chemotherapy and cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in biliary tract cancers. *Hepatology*. 2022;75(1):43-58. doi:10.1002/HEP.32102
85. Billard-Sandu C, Tao YG, Sablin MP, Dumitrescu G, Billard D, Deutsch E. CDK4/6 inhibitors in P16/HPV16-negative squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2020;277(5):1273-1280. doi:10.1007/s00405-020-05891-2
86. Karamboulas C, Bruce JP, Hope AJ, et al. Patient-Derived Xenografts for Prognostication and Personalized Treatment for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cell Rep*. 2018;25(5):1318-1331.e4. doi:10.1016/J.CELREP.2018.10.004
87. Gomez KE, Wu FL, Keysar SB, et al. Cancer cell CD44 mediates macrophage/monocyte-driven regulation of head and neck cancer stem cells. *Cancer Res*. 2020;80(19):4185. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-1079
88. Tai TS, Lin PM, Wu CF, et al. CDK4/6 Inhibitor LEE011 Is a Potential Radiation-sensitizer in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: An In Vitro Study. *Anticancer Res*. 2019;39(2):713-720. doi:10.21873/ANTICANRES.13167
89. Guerini AE, Pedretti S, Salah E, et al. A single-center retrospective safety analysis of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors concurrent with radiation therapy in metastatic breast cancer patients. *Sci Rep*. 2020;10(1). doi:10.1038/S41598-020-70430-2
90. Patnaik A, Yap TA, Chung HC, et al. Safety and clinical activity of a new anti-PD-L1 antibody as monotherapy or combined with targeted therapy in advanced solid tumors:

- The PACT phase Ia/Ib trial. *Clin Cancer Res.* 2021;27(5):1267-1277.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2821/78570/AM/SAFETY-AND-CLINICAL-ACTIVITY-OF-A-NEW-ANTI-PD-L1
91. Pujol JL, Vansteenkiste J, Paz-Ares Rodríguez L, et al. Abemaciclib in Combination With Pembrolizumab for Stage IV KRAS-Mutant or Squamous NSCLC: A Phase 1b Study. *JTO Clin Res Reports.* 2021;2(11). doi:10.1016/J.JTOCRR.2021.100234
 92. Liu Z, Zhao Y, Fang J, Cui R, Xiao Y, Xu Q. SHP2 negatively regulates HLA-ABC and PD-L1 expression via STAT1 phosphorylation in prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(32):53518. doi:10.18632/ONCOTARGET.18591
 93. Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nat* 2015 5177536. 2015;517(7536):576-582. doi:10.1038/nature14129
 94. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science.* 2011;333(6046):1157.
doi:10.1126/SCIENCE.1208130
 95. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1856.
doi:10.1056/NEJMOA1602252
 96. Moskovitz J, Moy J, Ferris RL. Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Oncol Rep.* 2018;20(2). doi:10.1007/S11912-018-0654-5
 97. Corona SP, Generali D. Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2- advanced breast cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:321.
doi:10.2147/DDDT.S137783
 98. Hasina R, Whipple ME, Martin LE, Kuo WP, Ohno-Machado L, Lingen MW. Angiogenic Heterogeneity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Biologic and Therapeutic Implications. *Lab Invest.* 2008;88(4):342. doi:10.1038/LABINVEST.2008.6
 99. Heppner GH, Miller BE. Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev.* 1983;2(1):5-23. doi:10.1007/BF00046903
 100. Komata T, Kanzawa T, Takeuchi H, et al. Antitumour effect of cyclin-dependent kinase inhibitors (p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1) on malignant glioma cells. *Br J Cancer.* 2003;88(8):1277. doi:10.1038/SJ.BJC.6600862
 101. Liang J, Shao SH, Xu ZX, et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 2007 92. 2007;9(2):218-224. doi:10.1038/ncb1537
 102. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting Autophagy in Cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(9):528. doi:10.1038/NRC.2017.53
 103. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev*
-

- Cancer*. 2007;7(12):961. doi:10.1038/NRC2254
104. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(9):1533. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0047
105. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*. 2015;125(1):42. doi:10.1172/JCI73941
106. Jiang H, Martin V, Gomez-Manzano C, et al. The RB-E2F1 Pathway Regulates Autophagy. *Cancer Res*. 2010;70(20):7882. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1604
107. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer*. 2020;19(1). doi:10.1186/S12943-020-1138-4
108. Shi S, Tan P, Yan B, et al. ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2016;35(5):2606. doi:10.3892/OR.2016.4680
109. Iriyama N, Hino H, Moriya S, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, abemaciclib, exerts dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects and induces autophagy in multiple myeloma cells. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1376741>. 2017;59(6):1439-1450. doi:10.1080/10428194.2017.1376741
110. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1047-1078. doi:10.1152/PHYSREV.00020.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0011928990006.JPEG
111. Revandkar A, Perciatio ML, Toso A, et al. Inhibition of Notch pathway arrests PTEN-deficient advanced prostate cancer by triggering p27-driven cellular senescence. *Nat Commun* 2016 71. 2016;7(1):1-12. doi:10.1038/ncomms13719
112. Bi H, Shang J, Zou X, Xu J, Han Y. Palbociclib induces cell senescence and apoptosis of gastric cancer cells by inhibiting the Notch pathway. *Oncol Lett*. 2021;22(2). doi:10.3892/OL.2021.12864
113. Jost T, Heinzerling L, Fietkau R, Hecht M, Distel L V. Palbociclib Induces Senescence in Melanoma and Breast Cancer Cells and Leads to Additive Growth Arrest in Combination With Irradiation. *Front Oncol*. 2021;11. doi:10.3389/FONC.2021.740002/FULL
114. Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2011 117. 2011;11(7):503-511. doi:10.1038/nrc3057
115. Laine A, Westermarck J. Molecular Pathways: Harnessing E2F1 Regulation for Prosenescence Therapy in p53-Defective Cancer Cells. *Clin Cancer Res*. 2014;20(14):3644-3650. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1942
116. Hernandez L, Kim MK, Lyle LT, et al. Characterization of ovarian cancer cell lines as
-

- in vivo models for preclinical studies. *Gynecol Oncol*. 2016;142(2):332. doi:10.1016/J.YGYNO.2016.05.028
117. Lin SF, Lin J Der, Hsueh C, Chou TC, Wong RJ. A cyclin-dependent kinase inhibitor, dinaciclib in preclinical treatment models of thyroid cancer. *PLoS One*. 2017;12(2). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0172315
118. Ho KS, Poon PC, Owen SC, Shoichet MS. Blood vessel hyperpermeability and pathophysiology in human tumour xenograft models of breast cancer: a comparison of ectopic and orthotopic tumours. *BMC Cancer*. 2012;12:579. doi:10.1186/1471-2407-12-579
119. Uhl EW, Warner NJ. Mouse Models as Predictors of Human Responses: Evolutionary Medicine. *Curr Pathobiol Rep*. 2015;3(3):219. doi:10.1007/S40139-015-0086-Y
120. Maletzki C, Bock S, Fruh P, et al. NSG mice as hosts for oncological precision medicine. *Lab Investig* 2019 1001. 2019;100(1):27-37. doi:10.1038/s41374-019-0298-6
121. Gagnière J, Raisch J, Veziant J, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(2):501. doi:10.3748/WJG.V22.I2.501
122. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(11):800. doi:10.1038/NRC3610
123. Cresci GA, Bawden E. The Gut Microbiome: What we do and don't know. *Nutr Clin Pract*. 2015;30(6):734. doi:10.1177/0884533615609899

X. ANHANG

10.1 ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung
5-FU	5-Fluoruracil
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
CAK	<i>cyclin-dependent activating kinase</i>
Calcein AM	Calcein Acetoxymethylester
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
CDKi	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor protein</i> , Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor
CPS	<i>combined positive score</i> des PD-L1
CTX	Chemotherapie
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
DYPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
E2F	Transkriptionsfaktor
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FDA	<i>food and drug administration</i>
FdUMP	Fluordesoxyuridinmonophosphat

FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
G0-/G1-/G2-Phase	<i>gap</i> -Phasen der Mitose
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde, <i>Society of Laboratory Animal Science</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches
HPV	Humanes Papillomavirus
IC ₂₀	<i>inhibitory concentration causing 20 %</i> , 20 %ige inhibitorische Konzentration
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration causing 50 %</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
KG	Körpergewicht
KV-Färbung	Kristallviolett-färbung
M-Phase	Mitose
MAT1	<i>ménage à trois</i> Protein 1
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSG Mäuse	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1} Wjl (NSG) Mäuse
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion

PD1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1/2	<i>programmed cell death protein 1/2 ligand</i> , PD1/2-Ligand
PDT	<i>population doubling time</i> , Verdopplungszeit
PDX	<i>patient-derived xenograft</i> , Patient:innen-abgeleitetes Xenograft
PE	Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin/Cyanine7
PI	Propiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositid-3-Kinasen
PP-Röhrchen	Polypropylen-Röhrchen
Rb	Retinoblastom-Protein
RbL	Retinoblastom-Protein-Ligand
RCT	Radiochemotherapie
S-Phase	Synthesephase der Mitose
SSC	<i>Side scatter</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TME	Tumormikromilieu
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
q1Wx4	Injektion einmal pro Woche, vier Dosen gesamt
q3Wx6	Injektion dreimal pro Woche, sechs Dosen gesamt
VAF	<i>variant allele frequency</i> , Allelfrequenz
xGal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Y _a	prozentuale Inhibition des Tumorwachstums für a

$Y_{ab,O}$	beobachtete kombinierte prozentuale Inhibition
$Y_{ab,P}$	vorhersagbare kombinierte prozentuale Inhibition, wenn die Substanzen A und B unabhängig wirken
Y_b	prozentuale Inhibition des Tumorwachstums für b

10.2 THESEN

1. Kopf-Hals-Tumoren sind maligne Veränderungen, die sich durch ein hohes Maß an intra- und intertumoraler Heterogenität auszeichnen. Über 90 % dieser Tumoren sind Plattenepithelkarzinome und werden auch als *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC) bezeichnet.
2. HNSCC werden aktuell standardmäßig durch chirurgische Interventionen, Bestrahlung und Chemotherapie behandelt, zielgerichtete Therapien gewinnen zunehmend an Bedeutung.
3. Als Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CDKis) werden Wirkstoffe bezeichnet, die zielgerichtet die Wirkung Cyclin-abhängiger Kinasen hemmen, so in den Zellzyklus eingreifen und die zelluläre Proliferation inhibieren. Verschiedene global- und selektiv-wirksame CDKis sind Gegenstand präklinischer und klinischer Studien.
4. Global-wirksame CDKis zeigen eine höhere zytostatische Wirkung, als selektiv-wirksame CDKis.
5. Die kombinierte Therapie aus zytostatisch-wirkenden Substanzen und CDKis kann zu einem gesteigerten Therapieerfolg führen.
6. Es ist möglich primäres Patient:innengewebe im NSG Mausmodell zu expandieren, wobei das molekulare und genetische Profil erhalten bleibt. Aus diesem PDX-Gewebe können Zelllinien etabliert werden.
7. HNSCC-Zelllinien unterscheiden sich in ihrer Proliferationskinetik, Migrations- und Invasionspotential, ebenso wie in Hinblick auf das spezifische Tumormikromilieu und den Phänotyp.
8. Die untersuchten Therapieschemata zeigten eine unterschiedliche Wirksamkeit, wobei sich insbesondere Kombinationen aus Cisplatin, Abemaciclib und THZ1 als zytostatisch erwiesen.
9. Unter diesen Therapien konnte u.a. eine gesteigerte MHC I-Abundanz, aber auch eine Induktion der Nekrose und Apoptose festgestellt werden. Der immunogene Zelltod und Seneszenz spielten untergeordnete Rollen.
10. Das NSG Mausmodell ist geeignet für *in vivo* Untersuchungen bezüglich der Wachstumskinetik etablierter Zelllinien.
11. Hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft des verwendeten NSG Mausmodell lässt sich schlussfolgern, dass eine kombinierte Behandlung mit Dinaciclib und Cisplatin vielversprechend ist.

10.3 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name, Vorname	Krause, Mareike
Anschrift	Kronshagener Weg 33, 24116 Kiel
Geburtsdatum und -ort:	09.01.1998, Demmin
Telefonnummer:	+49160 9700 2794
E-Mail-Adresse:	mareike.k.9@gmail.com

Berufslaufbahn

Seit 04/2024	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel Ärztin in Weiterbildung, Fachabteilung für Neurologie
--------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Akademische Laufbahn

01/2024	Erhalt der Approbation als Ärztin
2020 - 2024	Dissertation „Charakterisierung Patienten-abgeleiteter Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren und präklinische Medikamententestung“ unter PD Dr. Claudia Maletzki
2016 - 2023	Studium der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Rostock
07/2016	Abitur an der Europaschule Gymnasium Teterow

Engagement

Seit 2024	Lehreteam Neurologie am UKSH Kiel
2023 - 2024	<i>External Affairs Assistant</i> im <i>Standing Committee on Medical Education</i> der <i>International Federation of Medical Students' Associations</i> (IFMSA)
2021 - 2022	Bundeskoordinatorin für Medizinische Ausbildung der Bundesvertretung der Medizinstudierenden in Deutschland e.V. (bvmd)
2020 - 2022	Lokalkoordinatorin für Medizinische Ausbildung der bvmd für die Lokalvertretung Rostock
2018 - 2022	Mitglied des Fakultätsrates der Universitätsmedizin Rostock
2016 - 2023	Mitglied des Fachschaftsrates Medizin & Gesundheit Rostock (Vorsitz, Medizinische Ausbildung, Habilitationskommission)
2018 - 2021	Mitglied des Konzils der Universität Rostock

Sprachkenntnisse

Deutsch	C2 (Muttersprache)
Englisch	C1.2 (Unicert III Zertifikat 2022)
Französisch	B1
Spanisch	Grundlagen
Deutsche Gebärdensprache	Grundlagen

10.4 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. C. Junghanß, Direktor der Medizinischen Klinik III – Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin, danke ich für die Aufnahme in sein Forschungsteam.

Mein größter Dank geht an PD Dr. rer. nat. C. Maletzki für die unvergleichbare Betreuung während der letzten zwei Jahre. Ich bedanke mich für alle fachlichen Kompetenzen, die ich durch den Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit erlangen durfte, für viele wunderbare Gespräche und ein immer offenes Ohr. Sie bestärkte mich in manch professionellem und privatem Vorhaben und verlor auch dann nicht die Zuversicht und das Vertrauen in mich und meine Arbeit, wenn ein Versuch misslang. Von Anfang an fühlte ich mich von ihr und in ihrer Arbeitsgruppe sehr herzlich willkommen und wertgeschätzt. Ich werde definitiv viel aus dieser Zusammenarbeit für meine weitere Laufbahn mitnehmen.

Genauso gilt mein Dank Frau M. Sc. N. Schönwälder für die vielseitige Einarbeitung in die Laborarbeit, das geduldige Beantworten jeder Frage (selbst, wenn diese manchmal sicher nicht die klügsten waren), für die enge Zusammenarbeit, viele lustige Mittagsrunden, aufmunternde Worte und mehr. Dank ihr habe ich viele Fehler vermeiden können und gelernt, dass es meist gar nicht so schlimm ist, wenn man doch mal einen macht.

Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. med. A. Zimpfer aus dem Institut für Pathologie für die Begleitung dieses Projekts und die Unterstützung bei meiner Arbeit, ebenso wie für all die gemeinsamen Stunden am Mikroskop mit vielen interessanten Gesprächen.

Herrn Dr. med. D. Strüder danke ich für die Kooperation, die Unterstützung bei der Auswertung von Patient:innendaten und manch eingeschobener gemeinsamer Arbeitssession am Wochenende.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. med. B. Vollmar für die Möglichkeit am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie arbeiten zu dürfen, sowie Frau Ilona Klamfuß für die Aufzucht der Mäuse.

Mein Dank geht an Herrn Dr. phil. nat. B. Schneider vom Institut für Pathologie für die Unterstützung bei bzw. Durchführung mehrerer Versuche, die diese Arbeit vervollständigt haben.

Bei Theresa Momper bedanke ich mich von ganzem Herzen für die Einführung in die Arbeitsgruppe. Ohne sie wäre ich vermutlich nicht auf diese gestoßen. Außerdem danke ich ihr für unsere langjährige Freundschaft, viele gegenseitige Motivationseinheiten und jede Überraschung, die sie mir in den letzten Jahren gemacht hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an Frau M. Sc. I. Salewski, Julia Henne, Leonie Engster und Annika Kayser für die gesamte gemeinsame Zeit, im Labor und außerhalb davon. Ich bin sehr dankbar dafür, dass ihr mir immer geholfen habt Dinge zu finden, repetitive Arbeiten unterhaltsam zu machen oder für jedes Gespräch über Gott und die Welt offen wart.

Und da das Beste bekanntlich zum Schluss kommt: Mein allergrößtes Dankeschön geht an meine Freund:innen und meine Familie. Ihr habt mich durch die letzten sechs Jahre Studium

hindurch begleitet, unterstützt und manchmal auch einfach nur ertragen. Ihr habt mich bei all meinen (mehr oder weniger) schlaun Vorhaben unterstützt, euch meine Sorgen und Probleme angehört und mich im nächsten Moment wieder zum Lachen gebracht. Es ist absolut nicht selbstverständlich, wie viel Liebe und Loyalität ihr mir immer wieder zeigt. Mutti, Inken, Klaus, Opa, Tammy, Nina, Hannah, meine liebste Oliven-Bande Miele, Kathi, Klytti und sicher nicht zuletzt meine gesamte FSR- und bvmd-Bubble: Danke, danke, danke! Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.

XI. 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.