

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,
Kopf- und Halschirurgie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktorin: Prof. Dr. med. N. Rotter)

**Evaluation der Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren an
Plattenepithelkarzinomen der Kopf-/Halsregion unter Verwendung
der 3D-Zellkultur**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Jonas Heid

aus
Heidelberg
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referentin: Prof. Dr. med. Anne Lammert

„Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift;
allein die Dosis macht,
dass ein Ding kein Gift ist.“

Paracelsus (1493–1541)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Heid, J, Affolter, A, Jakob, Y, Kern, J, Rotter, N, Tenschert, E, Lammert, A:
3D cell culture alters signal transduction and drug response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology letters*, 23: 177, 2022.

Lammert, A, Affolter, A, Gvaramia, D, Heid, J, Jungbauer, F, Scherl, C, Tenschert, E, Rotter, N, Willett, N, Kern, J:
[The tumor stem cell niche of head and neck - point of intersection with therapeutic potential?]. *Laryngorhinootologie*, 100: 23-29, 2021.

Postervortrag:

Lammert, A, Affolter, A, Heid, J, Jakob, Y, Jungbauer, F, Ludwig, S, Rotter, N, Scherl, C, Tenschert, E, Kern, J:
Tyrosinkinaseinhibitoren in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region – doch eine therapeutische Chance?, 2021.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	5
1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region.....	5
1.1.1 Epidemiologie	5
1.1.2 Ätiologie.....	6
1.1.3 Pathogenese	7
1.1.4 Klassifikation.....	9
1.1.5 Diagnostik.....	12
1.1.6 Therapie	13
1.2 ErbB-Rezeptor-Familie	14
1.3 Tyrosinkinaseinhibitoren	16
1.4 3D-Zellkultur.....	17
1.4.1 Allgemeines zur 3D-Zellkultur	17
1.4.2 Die 3D-Kokultur	18
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1 Materialien und Geräte.....	20
2.2 Zelllinien	23
2.3 Zellkultur	24
2.4 3D-Zellkultur.....	25

2.5	alamarBlue Assay™	25
2.6	CellTiter-Glo 3D Assay®	26
2.7	LIVE/DEAD™-Färbung	26
2.8	Sytox-Green™-/ATP-Red™-Färbung	27
2.9	CFSE-Färbung	28
2.10	Western Blot	28
2.10.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.10.2	Elektrophorese	28
2.10.3	Blotting	29
2.10.4	Detektion	29
2.11	Auswertung und Statistik	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Ansprechverhalten von HNSCC-Zelllinien in 2D-Zellkultur	31
3.2	Ansprechverhalten von HNSCC-Zelllinien in 3D-Monokultur	35
3.3	Ansprechverhalten von CAF	38
3.4	Verteilungsmuster in der 3D-Kokultur	40
3.5	Ansprechverhalten von HNSCC-Zelllinien in 3D-Kokultur	43
3.6	Rezeptorphosphorylierung unter 2D- und 3D-Zellkultur	44
4	DISKUSSION	48
4.1	Ansprechverhalten von HNSCC auf TKI in 2D-Kultur	48
4.2	Ansprechverhalten von HNSCC auf TKI unter 3D-Kultur	50
4.3	Veränderte Expressionsmuster in 3D-Kultur	52

4.4	Bedeutung von CAF für die 3D-Kultur	55
4.5	Entwicklung einer 3D-Kokultur	57
4.6	Ansprechverhalten in 3D-Kokultur	59
4.7	Die Tumorstammzellnische	61
4.8	Resistenzmechanismen gegenüber TKI	63
4.9	Optimierung der 3D-Kultur	64
4.10	Neue Methoden in der 3D-Kultur	66
4.11	Limitationen der 3D-Kultur	69
4.12	Schlussfolgerung und Ausblick	70
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	LEBENS LAUF	84
8	DANKSAGUNG	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	<i>Mikroliter</i>
5-FU	<i>5-Fluoruracil</i>
ADCC	<i>antikörperabhängigen zellvermittelte Zytotoxizität</i>
AKT	<i>Proteinkinase B</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
bspw.	<i>beispielsweise</i>
CAF	<i>cancer associated fibroblasts</i>
CDK	<i>Cyclinabhängige Kinase</i>
CFSE	<i>Carboxyfluoresceinsuccinimidylester</i>
CML	<i>Chronisch Myeloische Leukämie</i>
CO ₂	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
DMEM	<i>Dulbecos Modified Eagles Medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DPBS	<i>Dulbecos Phosphate Buffer Saline</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EGF	<i>Epidermaler Wachstumsfaktor</i>
EGFR	<i>Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor</i>
EMA	<i>Europäische-Arzneimittel-Agentur</i>

EMEM.....	<i>Eagle Minimum Essentials Medium, Eagle's Minimal Essential Medium</i>
EMT.....	<i>Epithelial-Mesenchymale-Transition</i>
ERK.....	<i>Extrazellulär regulierte Kinase</i>
Fa.....	<i>Firma</i>
FACS.....	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAT 1.....	<i>FAT atypische Catherin 1</i>
FCS.....	<i>fetal calf serum, fetales Kälberserum</i>
GAPDH.....	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphat Dehydrogenase</i>
h.....	<i>Stunden</i>
HBEGF.....	<i>Heparinbindende-EGF-ähnlicher-Wachstumsfaktor</i>
Her.....	<i>human epidermal growht factor receptor</i>
HER3.....	<i>Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 3</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia induced factor-1 alpha</i>
HNSCC.....	<i>head and neck squamous cell carcinoma (Karzinom der Kopf-/Halsregion)</i>
HPV.....	<i>Humane Papillomaviren</i>
IMRT.....	<i>Intensitätsmodulierte Strahlentherapie</i>
ml.....	<i>Milliliter</i>
MRT.....	<i>Magnet-Resonanz-Tomographie</i>
NaCl.....	<i>Natriumchlorid</i>
NHDF.....	<i>normale humane dermale Fibroblasten</i>
NOTCH 1.....	<i>Notch Rezeptor 1</i>
NSCLC.....	<i>non small cell lung cancer (Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom)</i>

pAKT.....	<i>Phosphorylierte Proteinkinase B</i>
PD-1	<i>Programmed-Death-Protein-1</i>
pEGFR.....	<i>Phosphorylierter epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor</i>
pERK	<i>Phosphorylierte Extrazellulär regulierte Kinase</i>
PET.....	<i>Positronen-Emissions-Tomografie</i>
pHER3.....	<i>epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 3</i>
PI3K.....	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PIK3CA.....	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PSF.....	<i>Penicillin/Streptomycin/Fungizone</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
TBS-T	<i>Tris-gepufferte Kochsalzlösung</i>
TGF-alpha	<i>Transformierender Wachstumsfaktor alpha</i>
TKI.....	<i>Tyrosinkinaseinhibitoren</i>
TME.....	<i>Tumor Mikroenvironment</i>
TP53.....	<i>Tumor Protein 53</i>
UD-SCC-1	<i>Universität Düsseldorf Squamous Cell Carcinoma 1</i>
ULA	<i>Ultra Low Attachment</i>
UM-SCC 11B.....	<i>University of Michigan Squamous Cell Carcinoma 11B</i>
UM-SCC 22B.....	<i>University of Michigan Squamous Cell Carcinoma 22B</i>
UM-SCC 74A.....	<i>University of Michigan Squamous Cell Carcinoma 74A</i>
Wnt	<i>Wingless/Integrated</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von jährlich ca. 16.300 Fällen bilden Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (engl. head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) in Deutschland die sechstgrößte Gruppe unter den malignen Erkrankungen.¹ Hierunter fallen Plattenepithelkarzinome des Kehlkopfes, des Rachens und der Mundhöhle. Mit einem Anteil von ca. 90% stellen sie den Großteil aller malignen Neoplasien im Kopf-Hals-Bereich dar. Aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Lage und dadurch entstehender Differenzen wird unter anderem in den Daten des Robert Koch-Institut zwischen Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens sowie Larynxkarzinomen unterschieden. Auch die Deutsche Krebsgesellschaft gibt für beide Krankheitsbilder gesonderte Leitlinien aus. Da jedoch die meisten Studien die verschiedenen Lokalisationen aufgrund der ähnlichen Ätiologie und übereinstimmender Therapieverfahren unter dem Begriff des HNSCC zusammenfassen, werden die einzelnen Tumorentitäten in der folgenden Abschrift weitestgehend gemeinsam betrachtet.

Trotz intensiver Forschung und Fortschritten in modernen Therapiekonzepten, wie bspw. der Intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) oder der Nutzung von monoklonalen Antikörpern im Rahmen einer zielgerichteten Therapie, bleibt die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit HNSCC seit Jahrzehnten relativ konstant in einem Rahmen von ca. 50-60%. Männer erkranken mit 12.850 Fällen gegenüber 4.690 Fällen mehr als doppelt so häufig wie Frauen, wobei das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 63 Jahren und für Frauen bei 66 Jahren liegt. Auffällig ist hierbei, dass Frauen mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 59%, im Vergleich zu 48% bei den Männern, eine bessere Prognose haben. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Frauen seltener als Männer an durch Alkohol- und Tabakkonsum bedingten Tumoren und dafür häufiger an mit Humanen Papillomaviren (HPV) assoziierten Tumoren erkranken.² Die HPV-Assoziation stellt bisher einen der wenigen prognostisch günstigen Faktoren dar, weshalb sich hierauf einige Forschungsbemühungen stützen. Aufgrund der Unterschiede hinsichtlich des

Ansprechverhaltens gruppieren einige Autoren HPV-positive HNSCC in eine eigene Kategorie, was sich ebenso in gesonderten Staging-Kriterien für HPV-positive und HPV-negative Tumore äußert.³

Große Unterschiede bestehen zudem in der weltweiten Verteilung der Inzidenz. So sind bspw. der südostasiatische Raum, Brasilien und Frankreich als Hochinzidenzgebiete zu nennen. In einzelnen Hochrisikoregionen des südostasiatischen Raums machen Karzinome der Mundhöhle oder des Oropharynx ca. 25% der neudiagnostizierten Malignome bei Männern aus.

In Frankreich besteht europaweit die höchste Fallzahl mit einer Inzidenz von 32,2 pro 100.000 bei Männern und 4,7 pro 100.000 bei Frauen. Die Inzidenzrate in Deutschland ist in diesem Vergleich im europäischen Mittelfeld einzuordnen.^{4, 5} Aufgrund der Spezifizierung nach Karzinom-Untergruppen für Angaben in den Inzidenzstatistiken gestaltet sich die Betrachtung aller HNSCC-Fälle schwierig. Allerdings stellt die Untergruppe der Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome die fallzahlenmäßig größte Untergruppe des HNSCC dar.⁶

1.1.2 Ätiologie

Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines HNSCC sind Tabak- und Alkoholkonsum. Schätzungsweise 90% der Erkrankungen stehen im Zusammenhang mit dem Gebrauch zumindest einer der beiden Noxen.^{7, 8} Einzeln betrachtet erhöht Rauchen das Erkrankungsrisiko ca. um den Faktor 20 und exzessiver Alkoholkonsum ca. um den Faktor 6. Dabei korrelieren Menge und Dauer des Konsums ebenfalls mit dem Risikopotential. Das Vorhandensein beider Faktoren wirkt sich synergistisch auf das Gesamterkrankungsrisiko aus. In einer Fallkontrollstudie von Talamini et al. ergab sich eine Odds Ratio von 177 für Personen mit intensivem Konsum von Tabak und Alkohol.⁹

HPV-Infektionen kommt insbesondere bei Pharynxkarzinomen, weniger hingegen bei Larynxkarzinomen, eine wesentliche Rolle zu. So lässt sich HPV-Desoxyribonukleinsäure (DNA) in 45,8% aller Oropharynxkarzinome nachweisen, wobei vor allem die Hochrisikotypen 16 und 18 von Relevanz sind.¹⁰ Für das kanzerogene Potential von HPV verantwortlich sind die viralen Onkogene E6 und E7, die zu einer Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p53 und Retinoblastom-Protein führen.¹¹ Aufgrund des Übertragungsweges von HPV-Infektionen ist somit sexuelles

Risikoverhalten als weitere Entstehungsursache zu nennen, auch wenn in Anbetracht der hohen Durchseuchungsrate ein monofaktorielles Entstehen eines HNSCC aufgrund von HPV sehr selten ist. Die seit Juni 2018 geltende Empfehlung, auch Jungen im Alter zwischen 9 und 14 Jahren gegen HPV zu impfen, ist deshalb auch hinsichtlich einer HNSCC-Prävention sinnvoll.¹²

Die Hauptrisikofaktoren scheinen sich, trotz der weltweiten Varianz bei den Inzidenzzahlen, nicht zu unterscheiden. Je nach Region sind zusätzliche Risikofaktoren und Verhaltensmuster vorzufinden. Hier ist bspw. das in westlichen Breiten wenig verbreitete, aber im südostasiatischen Raum gängige Kauen von Betelnüssen zu nennen. Dahingegen ist in Thailand die Prävalenz von HPV-Infektionen im Vergleich zu westlichen Ländern eher gering.^{13, 14}

Diese Varianz ist daher vermutlich auf das weltweit unterschiedlich ausgeprägte Risikoverhalten, aber auch genetische Veranlagungen zurückzuführen. Allerdings sind bezüglich der Prognose nur wenige epigenetische Veränderungen bei noch gesunden Personen bekannt. Patienten mit Fanconi-Anämie haben bspw. ein 500-700fach erhöhtes Risiko, an einem HNSCC zu erkranken. Derartige genetische Risikokonstellationen sind jedoch, in Relation zur Gesamtzahl der HNSCC-Patienten, eher selten.¹⁵

Ebenso können berufsbedingte Noxen die Entstehung eines HNSCC begünstigen. Hierbei sind unter anderem Exposition gegenüber Asbest, schwefelhaltigen Aerosolen sowie Steinkohle und Teerprodukten zu nennen.^{16, 17}

Ultraviolette Strahlung begünstigt vor allem im Bereich der Lippen die Entstehung eines HNSCC. Des Weiteren werden auch eine einseitige Ernährung, heiße Getränke oder schlechte Mundhygiene als Risikofaktoren diskutiert.

Generell bietet die Schleimhaut im Mund- und Rachenbereich als Eintrittspforte für Nahrung und Atemluft eine große Angriffsfläche für exogene Noxen, weshalb eine derartige Aufzählung nie als vollständig betrachtet werden kann.

1.1.3 Pathogenese

Genauso heterogen wie die auslösenden Umweltfaktoren stellt sich auch die molekulare Genese des HNSCC dar. In Analogie zur Adenom-Karzinom-Sequenz beim Kolonkarzinom geht das HNSCC meist aus Vorläuferläsionen hervor. Initial bilden sich Epithelhyperplasien, die sich über die Zwischenstadien einer Dysplasie

und des Carcinoma in situ zu einem invasiven Karzinom hin entwickeln. Es wird davon ausgegangen, dass es durch den Einfluss von Noxen zu multiplen DNA-Schäden kommt, wodurch eine große Variabilität an Mutationen, Amplifikationen und Deletionen einen Ursprung für die Entwicklung des HNSCC darstellen können.¹⁸

Allerdings hat sich keine der bekannten singulären Mutationen oder Mutationskonstellationen bisher als klinisch effizienter Biomarker erwiesen. Eine in den meisten Fällen vorhandene multifaktorielle Genese mit großer Varianz zwischen den einzelnen Erkrankungsfällen ist aktuell die plausibelste Erklärung hierfür. Im folgenden Abschnitt wird deshalb auf ausgewählte bekannte molekulare Mechanismen eingegangen, die an der HNSCC-Entstehung beteiligt sind.

Mit 72% treten Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 am häufigsten auf. Dieses Gen hemmt im Normalfall über Induktion von p21 die Cyclinabhängige Kinase 1 (CDK 1), so dass der Zellzyklus gestoppt und gleichzeitig die Apoptose gefördert wird. Cyclinabhängige Kinasen bilden das Zentrum der Zellzykluskontrolle. So setzt auch das Protein p16 mit seiner Inhibition der CDK 4 und CDK 6 hier an. Als Surrogatmarker entspricht p16-Überexpression einer HPV-Assoziation.¹⁹

Eine bedeutende Rolle bei der Embryogenese, der Zellproliferation und der Differenzierung von Zellen kommt dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu. In Zellen mit inaktiviertem Wnt/ β -Catenin-Signalweg wird β -Catenin als zentraler Transkriptionsfaktor kontinuierlich abgebaut. Mutationen der vorgeschalteten Regulatoren, wie der Notch Rezeptor 1 (NOTCH 1) und das FAT atypische Catherin 1 (FAT 1), können jedoch zu einer verstärkten Anhäufung von β -Catenin führen.²⁰ In diesem Zusammenhang trägt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wesentlich zur Tumor Progression bei.²¹ Mit einer Frequenz von 23% für FAT 1 und 18% für NOTCH 1 kommen diese Mutationen beim HNSCC relativ häufig vor, während direkte Mutationen von β -Catenin selten sind.²² Darüber hinaus ist β -Catenin struktureller Bestandteil von E-Cadherin-Verbindungen und damit an Zell-Zell-Verbindungen und der Zellpolarität beteiligt. Ein Verlust dieser Zell-Zellverbindung und das damit einhergehende Metastasierungspotential, durch sich aus dem Verbund lösende Tumorzellen, ist kennzeichnend für Malignome, ebenso wie die häufig einhergehende Fähigkeit zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Im Gegensatz dazu scheinen Mutationen im epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) mit einer Häufigkeit von 4% eine eher untergeordnete Rolle beim HNSCC zu spielen. Die Mutation von PIK3CA, die das dem EGFR nachgeschaltete Protein

Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) kodiert, stellt eines der wenigen Onkogene dar, die regelmäßig beim HNSCC verändert sind. Die übrigen bekannten Mutationen betreffen vorwiegend Tumorsuppressorgene.²³

Auffällig ist, dass der EGFR dennoch in ca. 90% der Kopf-Hals-Tumore überexprimiert ist. Damit ist das HNSCC, noch vor anderen Malignomen, bei denen eine Anti-EGFR-Therapie zum Einsatz kommt, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), dem Mammakarzinom oder dem Kolonkarzinom, die Tumorentität mit der höchsten Rate an EGFR-Überexpressionen. Als einer der am besten erforschten Wachstumsrezeptoren beeinflusst der EGFR das Wachstumsverhalten zahlreicher Tumore, wobei eine Überexpression zumeist mit einer schlechten Prognose korreliert.²⁴

1.1.4 Klassifikation

Wie bei den meisten malignen Erkrankungen, erfolgt auch die Einteilung des HNSCC nach der TNM-Klassifikation, über die Aussagen zur Prognose des Patienten getroffen werden können. Da im Kopf-/Halsbereich komplexe anatomische Beziehungen bestehen, gibt es unterschiedliche Klassifikationen für die jeweiligen Lokalisationen. So ist bspw. im Bereich der Lippe und der Mundhöhle zusätzlich die Invasionstiefe von Relevanz. Auch der HPV-Status wirkt sich zum Teil auf die TNM-Kategorien aus. Die nachfolgende Tabelle 1 ist daher nicht vollständig, dient aber der Übersicht und soll die wesentlichen Klassifikationskriterien zusammenfassen:

Tabelle 1: Übersicht TNM-Klassifikation, eigene Darstellung, Daten nach²⁵

	Nasopharynx	Oropharynx und Hypopharynx	Larynx
T	Tumorgröße		
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar		
T0	Kein Primärtumor vorhanden		
Tis	Carcinoma in situ		
T1	Begrenzt auf Nasopharynx	Tumorgröße ≤ 2cm	Begrenzung auf einen Unterbezirk (Supraglottis, Glottis, Subglottis)
T2	Ausbreitung in Parapharyngealraum	Tumorgröße 2-4cm	Ausbreitung auf 2 Unterbezirke
T3	Infiltration von Schädelbasis oder Nasennebenhöhlen	Tumorgröße >4cm	Begrenzung auf Bereich des Larynx mit Fixierung der Stimmlippe
T4	Infiltration von Nachbarstrukturen, wie Hirnnerven, Hypopharynx, Parotis oder Orbita	<u>T4a:</u> Infiltration von Trachea, Schilddrüse, Oesophagus oder äußerer Zungenmuskulatur	
		<u>T4b:</u> Infiltration von Mediastinum, Carotis oder prävertebraler Faszie	
N	Lymphknotenmetastasen		
Nx	Regionale LK-Metastasen könne nicht beurteilt werden		
N0	Keine regionalen LK-Metastasen		
N1	Einzelne LK-Metastase ≤ 3cm		
N2a	Einzelne ipsilaterale LK-Metastase 3-6cm		
N2b	Multiple ipsilaterale LK-Metastasen <6cm		
N2c	Bi- oder kontralaterale LK-Metastasen <6cm		
N3a	LK-Metastase >6cm ohne extranodale Ausbreitung		
N3b	LK-Metastase >6cm mit extranodaler Ausbreitung		
M	Metastasen		
M0	Kein Nachweis von Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen vorhanden		

Anhand dieser Kriterien erfolgt ein Staging des Tumors, das bei der Therapieplanung als Entscheidungshilfe dient. Da, wie bereits erwähnt, insbesondere im Oropharynxbereich der HPV-Status für die Prognose mitentscheidend ist, gibt es hier gesonderte Einteilungen für p16-positive und p16-negative Tumore. Die Klassifikation der übrigen Lokalisationen deckt sich größtenteils mit der für HPV-negative Oropharynxkarzinome (siehe Tab. 2).

Tab 2: Staging von p16-negativen Oropharynxkarzinomen, eigene Darstellung, Daten nach²⁵

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVb	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
IVc	Jedes T	Jedes N	M1

Für p16-positive Karzinome gilt die nachfolgende Tabelle 3. Anhand der Staging-Kriterien ist eine bessere Prognose für p16-positive Karzinome und ein besseres Ansprechen auf das Chemotherapie-Regiment ersichtlich. So ist bei p16-negativen Tumoren ein N1-Status automatisch mit einer Eingruppierung mindestens in Stadium III verknüpft. Dahingegen kann bei p16-positiven Tumoren mit N1-Status noch ein Stadium I vorliegen:

Tab 3: Staging von p16-positiven Oropharynxkarzinomen, eigene Darstellung, Daten nach²⁵

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0, N1	M0
II	T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
III	T1, T2, T3	N3	M0
	T4	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

1.1.5 Diagnostik

Eine Empfehlung für breit angelegte Screening-Untersuchungen auf maligne Tumoren im Kopf-Hals-Bereich gibt es derzeit nicht. So liegt selbst bei Hochrisikogruppen kein Wirksamkeitsnachweis vor, bspw. für Laryngoskopien mit dem Ziel einer Früherkennung von Pharynx- oder Larynxkarzinomen. Die regelmäßige zahn- und hausärztliche Kontrolle des Mundraums auf verdächtige Schleimhautveränderungen hat hingegen auch für die Prävention von Tumoren der Mundhöhle einen großen Stellenwert.

Diese dient ebenfalls der Erkennung von Vorläuferläsionen, wie z. B. einer Leukoplakie, die einer Präkanzerose entspricht und als Carcinoma in situ klassifiziert wird. Sie stellt sich als weißes nicht abwischbares Enanthem dar und besteht aus keratotisch umgewandeltem Schleimhautgewebe. Besteht bereits ein ausgebildetes Plattenepithelkarzinom, so sind die Gründe für das Aufsuchen eines Arztes mannigfaltig. Symptome können z. B. Zahnlockerungen, Schluck- und Sprechbehinderungen, Fremdkörpergefühl, Blutungen oder Schmerzen im Kopf- und Nackenbereich, Foetor ex ore oder auch Taubheitsgefühle sein. Aufgrund der frühzeitigen Metastasierung in die nachgeschalteten Lymphknoten fallen einige Patienten auch erstmalig durch eine zervikale Lymphknotenschwellung auf. Im Bereich des Larynx kann es durch Malignome zu einer Heiserkeit der Stimme kommen. Aus diesem Grund fallen insbesondere glottische Larynxkarzinome frühzeitiger auf, weshalb diese zumeist eine bessere Prognose haben als sub- oder supraglottische Karzinome.

Werden verdächtige Symptome erkannt, dann muss eine HNO-fachärztliche Untersuchung des Mundraumes sowie eine endoskopische Untersuchung des Pharynx und Larynx erfolgen. Die meisten Tumore im Kopf-Hals-Bereich werden bereits im Rahmen einer derartigen Untersuchung entdeckt.

Zur prätherapeutischen Einschätzung der Tumorausdehnung werden Computertomographie (CT) oder Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) verwendet. Die beiden Verfahren sind dabei als gleichwertig anzusehen, da eine kontroverse Studienlage zu Vor- und Nachteilen der beiden Verfahren besteht. So ist das MRT besser geeignet zur Beurteilung der perineuralen, perivaskulären oder intramuskulären Ausdehnung, wohingegen das CT eine bessere Auflösung von Kortikalisarrosionen bietet. Die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) soll lediglich bei unklarem Rezidiv-Verdacht, nicht jedoch zur Primärtumordiagnostik eingesetzt werden. Zudem ist vor Therapiebeginn ein Tumornachweis per Biopsie zu erbringen. Die gründliche Untersuchung des gesamten Kopf-Hals-Bereichs ist auch aufgrund der Häufung von Zweitkarzinomen von hohem Stellenwert, denn je nach Stadium besteht in 4-33% bereits zum Diagnosezeitpunkt ein synchroner Zweittumor.²⁶ Diese treten neben der Kopf-Hals-Region gehäuft im Bereich des Oesophagus oder der Lunge auf. Deshalb wird vor allem in den fortgeschrittenen Stadien 3 und 4 empfohlen, ein zusätzliches CT des Thorax durchzuführen.

1.1.6 Therapie

Die Therapieplanung wird für jeden Patienten individuell durch den Beschluss des Tumorboards gefasst. Dieses besteht im Falle des HNSCC aus mindestens je einem Vertreter der Fachdisziplinen Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie sowie Radiologie.

Frühe Tumorstadien können mittels alleiniger Operation oder Strahlentherapie behandelt werden, wobei zugleich eine gute Prognose besteht. Meist besteht jedoch schon zum Diagnosezeitpunkt ein fortgeschritteneres Tumorstadium. Deshalb basiert das Standardtherapieverfahren für das HNSCC, wenn möglich, auf einer chirurgischen R0-Resektion sowie einer elektiven Neck Dissection, bei einem möglichen Befall von nachgeschalteten Lymphknoten im Bereich des Halses. In fortgeschrittenen Tumorstadium erfolgen anschließend Radiatio und Chemotherapie. Hierbei haben sich als zytotoxische Chemotherapeutika vorwiegend platinhaltige

Substanzen, wie Cisplatin und Carboplatin, als erste Wahl etabliert. Darüber hinaus kommen 5-Fluoruracil (5-FU), Taxane und Methotrexat zum Einsatz, wobei letzteres wegen des gehäuften Auftretens einer Mukositis, insbesondere in Kombination mit Bestrahlungen, heutzutage weniger Verwendung findet.^{27, 28}

Seit 2004 ist der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab für die Therapie des HNSCC von der Europäischen-Arzneimittel-Agentur (EMA) zugelassen. Vermorken et al. konnten für eine Kombination aus platinbasierter Chemotherapie und Cetuximab bei metastasierten oder rezidivierendem HNSCC ein um 2,7 Monate längeres Gesamtüberleben feststellen.²⁹ In der Primärtherapie des HNSCC blieben allerdings die Ansprechraten hinter den Erwartungen zurück, weshalb der Stellenwert der EGFR-Therapie beim HNSCC ein weiterhin viel diskutiertes und untersuchtes Studiengebiet geblieben ist.^{30, 31}

Neu in der Behandlung des HNSCC ist die Immuntherapie mit den Programmed-Death-Protein-1 (PD-1)-Antikörpern Nivolumab und Pembrolizumab. Bei Patienten mit metastasiertem oder rezidivierendem HSNCC konnte unter Nivolumab-Therapie eine Steigerung der 1-Jahres-Überlebensrate von 16,6% auf 36% festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit Pembrolizumab erreicht werden. Infolgedessen wurde Nivolumab im Jahr 2017, und anschließend im Jahr 2018 auch Pembrolizumab, für die Therapie des HNSCC von der EMA zugelassen.^{32, 33}

1.2 ErbB-Rezeptor-Familie

Wachstumsfaktoren fungieren als interzelluläre Signalmoleküle und dienen so einem kontrollierten Zellwachstum. Die Übertragung erfolgt entweder autokrin oder parakrin über Rezeptoren, wie dem EGFR. Dabei handelt es sich um eine der am längsten bekannten Rezeptortyrosinkinasen, die zusammen mit den Rezeptoren HER2, HER3 und HER4 zur Familie der ErbB-Rezeptoren gehört.³⁴ Eine Amplifikation der angeschlossenen intrazellulären Signalwege begünstigt allerdings maligne Zelleigenschaften, wie eine höhere Proliferationsrate sowie Migration, Invasion, Apoptose-Inhibition und Angiogenese. Dies kann z. B. durch verstärkte Rezeptorexpression, erhöhte Sensitivität der Rezeptoren oder verstärkte Liganden-Sezernierung erfolgen. Es wird davon ausgegangen, dass bei über 90% der HNSCC eine Überexpression des EGFR vorhanden ist, weshalb dieser das Ziel zahlreicher neuer Therapieansätze ist.³⁵

Der EGFR lässt sich in drei Untereinheiten gliedern: eine Liganden-bindende extrazelluläre Domäne, eine hydrophobe Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne.³⁶

Aktuell gibt es sieben bekannte Liganden für den EGFR. Dabei handelt es sich um den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den transformierenden Wachstumsfaktor alpha (TGF-alpha), Amphiregulin, Epigen, Betacellulin, Epiregulin und den heparinbindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HBEGF). Die drei zuletzt genannten sind dabei ebenso Liganden des HER4. An HER3 und HER4 binden darüber hinaus verschiedene Neureguline. Allerdings ist kein Ligand für HER2 bekannt, wodurch dieser Rezeptor womöglich auf eine Heterodimerisierung mit den anderen Rezeptoren angewiesen ist.³⁷

Eine Bindung von Liganden an die extrazelluläre Domäne führt zu einer Homodimerisierung des EGFR bzw. Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren der ErbB-Familie. Eine Dimerisierung aktiviert durch Strukturveränderung die Tyrosinkinasedomäne, die nun Tyrosinreste des Rezeptors phosphoryliert und eine Hochregulierung der an den Rezeptor angeschlossenen Signalkaskaden zur Folge hat. In der nachfolgenden Abbildung 1 sind die Hauptsignalwege des EGFR schematisch dargestellt:

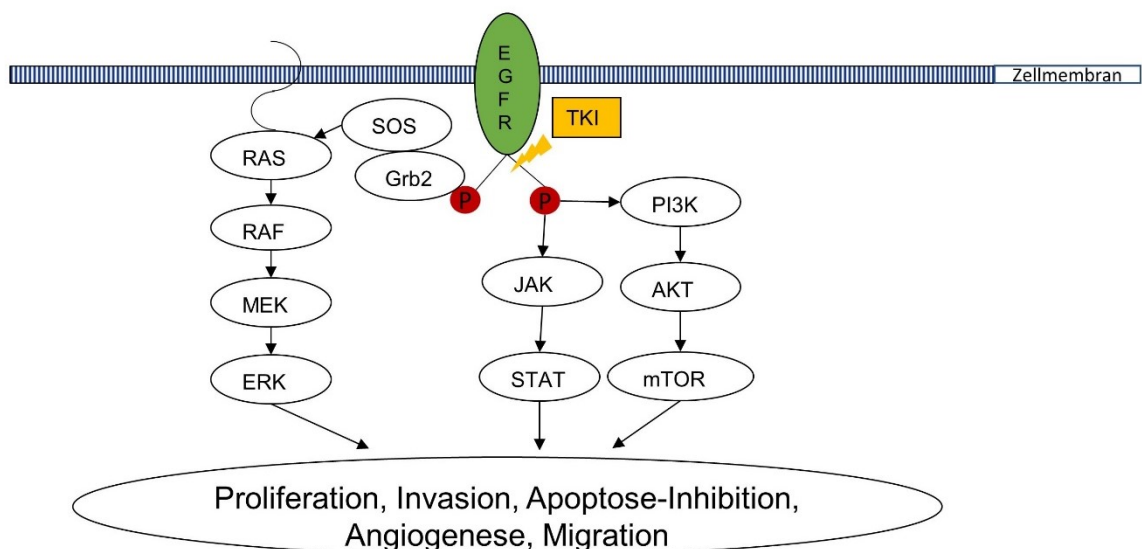


Abbildung 1: Wirkweise der Tyrosinkinaseinhibitoren. Eigene Darstellung. Daten nach: Sola, AM, Johnson, DE, Grandis, JR: *Investigational multitargeted kinase inhibitors in development for head and neck neoplasms. Expert Opin Investig Drugs*, 28: 351-363, 2019.

1.3 Tyrosinkinaseinhibitoren

Bei den Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) handelt es sich um kleine Moleküle, die reversibel oder irreversibel die Adenosintriphosphat (ATP)-Bindetasche der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors blockieren und somit eine Autophosphorylierung verhindern. Das Wirkspektrum kann dabei je nach gewünschtem Einsatz stark variieren und erstreckt sich von Stoffen, die spezifisch nur eine Kinase blockieren, bis hin zu Stoffen, die mehrere Rezeptoren gleichzeitig inhibieren.

Der prominenteste und bisher erfolgreichste Vertreter dieser Wirkstoffklasse ist Imatinib. Dieser ist seit 2001 für die Behandlung der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) zugelassen und wird als Erstlinientherapie verwendet. Dabei blockiert Imatinib spezifisch die Bcr-Abl-Tyrosinkinase, die in 90% der Fälle pathognomonisch für die CML ist und zu einer unkontrollierten Vermehrung der weißen Blutkörperchen führt. Bcr-Abl wird auf dem sogenannten Philadelphia-Chromosom kodiert, das durch Translokation der Chromosomen 9 und 22 entsteht.³⁸

Dieser Erfolg hat auch zu gestiegenem Interesse für den Einsatz bei soliden Tumoren geführt.³⁹ Erlotinib als Beispiel für einen EGFR-selektiven TKI der ersten Generation bindet reversibel an den Rezeptor und wird beispielsweise beim NSCLC eingesetzt. Lapatinib hingegen ist spezifisch für den EGFR und HER2 und findet bisher vorwiegend Verwendung bei der Behandlung des Mamma-Karzinoms. TKI der zweiten Generation, wie z.B. Afatinib, binden irreversibel an den EGFR. Darüber hinaus inhibiert Afatinib die Rezeptoren HER2, HER3 und HER4, wodurch deren kompensatorische Hochregulierung ausgeschlossen werden soll. Es wird diskutiert, ob diese alternative Hochregulierung Resistenzen gegen Anti-EGFR-Therapeutika mitverursacht.

In der HNSCC-Therapie kommt bisher nur der EGFR-Antikörper Cetuximab zum Einsatz. Da es sich hierbei allerdings um einen monoklonalen Antikörper handelt, sind die Therapiekosten sehr hoch. Darüber hinaus ist der Erfolg mit einer Ansprechrate von 13% und einem Gesamtüberlebensvorteil von 2,7 Monaten als eher moderat einzustufen.^{29, 40}

Tyrosinkinaseinhibitoren wiesen in klinischen Studien bisher keinen ausreichenden Benefit für HNSCC-Patienten auf, um eine Verwendung in der Therapie zu rechtfertigen.⁴¹ Ein Grund hierfür stellt möglicherweise die weniger ausgeprägte Mutationsrate des EGFR bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu NSCLC-Patienten dar. Sie korreliert beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (engl. non small cell lung cancer, NSCLC) mit einer besseren Ansprechrate auf TKIs.⁴² Dennoch gibt es einen nicht unerheblichen Anteil von Patienten, die auch ohne EGFR-Mutation auf eine TKI-Gabe ansprechen, weshalb Mutationen nicht der einzige Grund für den Therapieerfolg von TKIs beim NSCLC sein können.⁴³ In verschiedenen Studien konnten bisher Ansprechraten von 5-15% für die TKI-Therapie beim HNSCC verzeichnet werden. Zu einem der wenigen bekannten Parameter, die mit einem besseren Ansprechen assoziiert sind, gehört das Entwickeln eines Hautausschlags unter Therapie.⁴⁴ Zuverlässige molekulare Marker, die bereits vor Therapiebeginn auf einen Erfolg hindeuten, existieren aktuell noch nicht. So konnten bisher weder die EGFR-Expressionsstärke noch Mutationen hierfür herangezogen werden. In Anbetracht dessen besteht weiterer Bedarf an Forschung hinsichtlich des Resistenzverhaltens gegenüber TKIs und der Identifikation von Biomarkern, die einen Therapieerfolg vorhersagen können.⁴⁵

1.4 3D-Zellkultur

1.4.1 Allgemeines zur 3D-Zellkultur

Die Voraussetzung für die Erforschung weiterer Biomarker ist die Evaluation geeigneter In-vitro-Modelle, um eine bessere Übertragbarkeit auf In-vivo Bedingungen gewährleisten zu können. Die herkömmliche 2D-Zellkultur ist ein etabliertes und leicht anzuwendendes Verfahren, das bereits zu unzähligen Erkenntnissen in der Tumorbologie geführt hat. Dennoch fehlen wesentliche Strukturmerkmale, wie die extrazelluläre Matrix oder Zell-Zell-Interaktionen. Bisherige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die 3D-Zellkultur das In-vivo-Verhalten von Tumorzellen besser repräsentiert als die 2D-Kultur.⁴⁶

Die 3D-Zellkultur dient dabei zunächst dazu, die Lücke zwischen herkömmlicher 2D-Kultur und In-vivo-Modellen zu schließen. Aufgrund der Verwendung von ausschließlich humanem Zellmaterial könnte sie jedoch zukünftig Tiermodellen sogar überlegen sein.

Häufige aktuell verwendete Methoden sind die Sphäroid-Kultur oder die Einbettung in eine Matrix. Bei der Sphäroid-Kultur wird z. B. durch Plattenbeschichtungen vermieden, dass Zellen adhärent wachsen, wodurch diese dazu angeregt werden, sich selbst in einer 3D-Struktur zu organisieren.⁴⁷

Zahlreiche Forschungsprojekte sind bereits der Kultivierung von Sphäroiden aus Tumorproben von Patienten gewidmet. Hierbei besteht das Ziel darin, eine Methode zu finden, um das Primärmaterial verlässlich als Sphäroid-Kultur weiter zu züchten. Sollten sich diese Modelle als repräsentativ für den Tumor des Patienten erweisen, so könnten im Optimalfall in Zukunft an In-vitro-Duplikaten Resistenztestungen vorgenommen und Aussagen über erfolgversprechende Therapieoptionen für den Patienten getroffen werden.

1.4.2 Die 3D-Kokultur

Eine weitere Entwicklung zur besseren Darstellung der In-vivo-Gegebenheiten im HNSCC stellt die Kokultur von Tumorzellen mit Fibroblasten dar. Da tumorassoziierte Fibroblasten (engl. cancer associated fibroblasts, CAF) für Resistenzentwicklungen in Tumoren mitverantwortlich gemacht werden, erscheint es sinnvoll, diesen Teil der Tumorarchitektur in präklinischen Modellen mitzuberücksichtigen.⁴⁸ Hierdurch können im 3D-Modell Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen besser nachvollzogen werden. Neben Fibroblasten lässt sich die Kokultur, unter der Voraussetzung einer geeigneten Methodik, mit beliebig vielen weiteren Zelltypen durchführen. Hierfür kämen insbesondere weitere Zellen der Tumormikroumgebung, wie Endothelzellen, Immunzellen, oder dendritische Zellen, in Frage.⁴⁹

Eine einfache Form der Kokultur stellt die simultane 3D-Kultur mit Ultra-Low-Attachment (ULA)-Platten zu einem singulären Sphäroid dar. Diese setzt jedoch eine vorhandene Interaktionsbereitschaft der Zellen sowie die Fähigkeit zur Formierung von Sphäroiden voraus. Eine weitere Möglichkeit ist die Einpflanzung verschiedener Zelltypen in eine künstliche Extrazellulärmatrix, die z. B. aus Kollagen oder Gelatine besteht.⁵⁰ Neuere Ansätze, die sich noch weitestgehend in der Entwicklungsphase befinden, sind sogenannte Cancer-on-a-Chip-Modelle oder das 3D-Bioprinting.⁵¹ Diese werden abschließend im Diskussionsteil näher betrachtet.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Aufgrund der Möglichkeit, verschiedene Zellkulturmodelle herzustellen, stellt sich die Frage, inwieweit die Eigenschaften von Zellen durch neuere Kulturformen verändert werden können und worin die Vor- und Nachteile der jeweiligen Kulturform bestehen. Bezüglich des Ansprechverhaltens von TKI beim HNSCC gibt es noch keine vergleichenden Analysen zwischen 2D-Zellkultur und Sphäroid-Kultur. Deshalb besteht das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, aus Kopf-/Halskarzinomen stammende Zelllinien auf ihre Viabilität unter Therapie mit den TKI Lapatinib und Afatinib zu testen. Dies soll vergleichend in 2D-Zellkultur, 3D-Sphäroid-Kultur und 3D-Kokultur aus Karzinomzellen mit Fibroblasten stattfinden. Die Viabilitätsanalyse erfolgt dabei unter Verwendung geeigneter Assays und visueller Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie. Anschließend sollen die durch die TKI inhibierten Rezeptoren sowie deren nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden mittels Western-Blot-Analyse untersucht werden. Die vergleichende Testung von Gesamtrezeptorexpression und Phosphorylierung ist dabei ein expliziter Bestandteil. Mithilfe der vorliegenden Arbeit sollen neue Erkenntnisse bezüglich der Wirksamkeit von Lapatinib und Afatinib beim Kopf-/Halskarzinom gewonnen werden. Dies soll unter Einordnung in den Kontext neuer Zellkulturverfahren geschehen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien und Geräte

Chemikalien	Hersteller
Afatinib (BIBW 2992)	Selleck Chemicals, Houston, USA
alamarBlue™ Cell Proliferation Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
BioTracker ATP-Red Live Cell Dye	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calcein AM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
CellTiter-Glo™ 3D Cell Viability Assay	Promega Corporation, Fitchburg, USA
Cisplatin	Selleck Chemicals, Houston, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecos Eagles Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dulbecos Phosphate Buffer Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Eagle Minimum Essentials Medium (EMEM)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Ethanol 99,8% vergällt	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Ethidiumhomodimer-1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gibco™ Antibiotikum-Antimykotikum (PSF)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gibco™ Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Lapatinib	Selleck Chemicals, Houston, USA
L-Glutamin	Selleck Chemicals, Houston, USA
Sytox™ Grüner Nukleinsäurefarbstoff	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Trypanblau 0,4% Lösung in 0,85% NaCl	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz

Western Blot	Hersteller
10x TGS Buffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DC Protein Assay Reagents Package	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PORTEAN TGX Precast Gels	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-Protean™ Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMSF Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Primus 96 Thermal Cycler	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
ProSieve QuadColor Protein Marker	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
ProSieve™ QuadColor Protein Marker	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Ripa Buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Antikörper	Hersteller
EGFR	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
pEGFR (Tyr 1068)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
HER	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
pHER3/ErbB3 (Tyr 1289)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
AKT	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
pAkt (Ser 473)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
ERK	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
pERK (Thr 980)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
GAPDH	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Meerrettichperoxidase Anti Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich

Geräte & Software	Hersteller
Akku Jet Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
GraphPad Prism 8.0	GraphPad Software Inc., USA
HERAsafe™ Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Ibriht FL 1000	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
i-control 2.0	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
ImageJ 1.8	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
Infinite™ M Plex Mikroplatten Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
Mikroliterpipetten Typ Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Neubauer Zählkammer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Orbitalschüttler	Corning Inc., Corning, USA
Vortex	Bender & Hobein AG, München, Deutschland
Xplorer Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Zen pro	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge	M&S Laborgeräte GmbH, Wiesloch, Deutschland

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cellstar™ 6 Well Platten Transparent	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar™ 96 Well Platten Transparent	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar™ Culture Flask 250 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar™ Polypropylen Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Corning™ 96 Well Platten, weiß, flacher Boden	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Nunclon Sphera™ 96 Well Platten, ULA, Transparent	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland

2.2 Zelllinien

Die Zelllinien UM-SCC 11B (11B), UM-SCC 22B (22B) und UM-SCC 74A (74A) wurden von Dr. Carey (Universität Michigan, Ann Arbor, MI, USA) und die Zelllinie UD-SCC-1 von Prof. Wagenmann (Universität Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Alle eingesetzten Karzinomzelllinien stammen von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-/Halsregion ab. Die Ursprungsregionen waren Kehlkopf (11B), Hypopharynx (22B), Zunge (74) und Oropharynx (UD01). Vor der Verwendung der Zellen wurde eine Short-Tandem-Repeat-Analyse durchgeführt, um die Authentizität der Zelllinien zu verifizieren.

Für die Kokultur und Versuche mit Fibroblasten wurden Karzinom-assoziierte Fibroblasten (engl. cancer associated fibroblasts, CAF) verwendet. Diese wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe aus dem Probenmaterial eines Karzinompatienten isoliert. Dieses Material trug laborintern die laufende Nummer 137. Wegen des Isolierungsprozesses und der nicht erfolgten Testung der Zellen kann nicht garantiert werden, dass es sich um reine Fibroblasten handelt. Somit müsste korrekterweise von Stromazellen die Rede sein. Da aber aufgrund der Zellverteilung und des Proliferationsverhaltens von einem sehr überwiegenden Anteil an Fibroblasten

auszugehen ist, werden die Zellen in dieser Arbeit lediglich als CAF bezeichnet. Des Weiteren wurden vergleichend normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) in die Viabilitätstestung miteinbezogen. Die NHDF wurden aus juveniler Vorhaut isoliert (Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland).

Tabelle 4: Charakteristika der verwendeten Zelllinien 11B, 22B und 74A

	11B	22B	74A
Ursprung	Larynxkarzinom	Hypopharynxkarzinom (Lymphknotenmetastase)	Oropharynxkarzinom
Geschlecht	Männlich	Weiblich	Männlich
Alter	64 Jahre	59 Jahre	51 Jahre

Tabelle 5: Charakteristika der verwendeten Zelllinien UD01, NHDF und CAF

	UD01	NHDF	CAF
Ursprung	Oropharynxkarzinom	Juvenile Vorhaut	Nasennebenhöhlenkarzinom (Halslymphknotenmetastase)
Geschlecht	Männlich	Männlich	Männlich
Alter	64 Jahre	unbekannt	60 Jahre

2.3 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank adhärent kultiviert. Als Nährmedium diente Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (engl. fetal calf serum, FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin/Fungizone-Lösung (PSF) für die Linie UMSCC11B sowie Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), versetzt mit 10% FCS, 1% PSF und 1% L-Glutamin für die Linie UD01, die CAF und die NHDF.

Sobald die Zellen zu ca. 80% konfluent waren, wurden sie entweder passagiert oder gezählt und für Versuche ausgesät. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt.

Innerhalb von zwei bis vier Minuten Inkubation unter stetiger mikroskopischer Kontrolle lösten sich die Zellen vom Flaschenboden und die enzymatische Spaltung wurde mit 10 ml Kulturmedium abgestoppt. Nach anschließender Zentrifugation für fünf Minuten bei 1.600 U/min konnte das Zellpellet mit 5 ml frischem Medium resuspendiert werden. Von dieser Lösung wurden 20 µl entnommen, mit 20 µl Trypanblau versetzt und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden Lösungen mit der jeweils gewünschten Konzentration neu ausgesät.

2.4 3D-Zellkultur

Für die 3D-Zellkultur wurden nach der Zellzählung je 50.000 Zellen in 200µl Medium pro Well in Ultra-Low-Attachment 96-Well-Platten ausgesät. Diese wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Dabei wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Je nach Versuchsaufbau wurden die Sphäroide in Mono- oder Kokultur aus Karzinomzellen und/oder Fibroblasten gezüchtet. Für die Versuche in der Kokultur betrug dabei das Verhältnis 60:40, wobei 20.000 Fibroblasten auf 30.000 Tumorzellen oder 4.000 Fibroblasten auf 6.000 Tumorzellen kamen. Diese Relation wurde aufgrund von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gewählt, die ergaben, dass damit die besten Chancen auf ein möglichst homogenes Verteilungsmuster innerhalb des Sphäroids bestehen. Aufgrund der Fähigkeit, auch nach längerer Inkubation ein singuläres und lebendiges Sphäroid ausbilden zu können, wurden die Zelllinien 11B und 22B für die nähere Untersuchung in der 3D-Zellkultur ausgewählt.

2.5 alamarBlue Assay™

Mithilfe des alamarBlue Assay™ können Viabilitätsunterschiede zwischen Zellkulturen durch Absorptionsmessung detektiert werden. Hierzu wurden pro Well 10.000 Zellen in 100 µl Nährmedium auf 96-Well-Platten ausgesät und zum Anwachsen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abpipettiert und gegen TKI-Lösungen ausgetauscht. Die Konzentrationen wurden hierbei gestaffelt von 0,1 µM bis 50 µM sowie eine Kontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt. Dies erfolgte jeweils in mindestens zweifacher

Ausführung. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank konnten 10 µl alamarBlue™-Lösung hinzugegeben werden. Dessen Absorption wurde drei Stunden später mit einem Mikroplatten-Reader bei 570 nm Wellenlänge detektiert und gegenüber dem Referenzwert bei 600 nm ausgewertet. Die gemessenen Absorptionswerte korrelieren direkt mit der Viabilität der Zellen, so dass durch Bildung des Quotienten aus den Absorptionswerten des Wells und der zugehörigen Mediumkontrolle die Viabilität der einzelnen Reaktionsgefäße bestimmt werden konnte.

2.6 CellTiter-Glo 3D Assay®

Da die Zellen in der Sphäroid-Kultur wesentlich kompakter angeordnet sind, muss zur verlässlichen Auswertung eine Lyse des Sphäroids stattfinden, was eine Auswertung mittels Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) nicht möglich macht. Zur Quantifizierung der Viabilitätsunterschiede und Bestimmung der IC₅₀ Werte in der 3D-Zellkultur wurde daher das CellTiter-Glo 3D Assay® verwendet. Nach siebentägiger Inkubation wurde das Medium der Sphäroide ausgetauscht und mit Tyrosinkinaseinhibitoren versetzt. Der Viabilitätsanalyse in der 2D-Zellkultur entsprechend, wurden die Konzentrationen hierbei im Bereich von 0,1 µM bis 50 µM gestaffelt sowie eine DMSO-Kontrolle angesetzt. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Sphäroide inklusive 100µl Medium in weiße 96-Well-Platten transferiert, um die Auswertung mittels Lumineszenz zu optimieren. Anschließend wurden pro Well 100µl CellTiter-Glo 3D Reagent® hinzugegeben und die Platten für fünf Minuten bei 600 Umdrehungen pro Minute auf den Orbitalschüttler gestellt. Nach weiteren 25 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Auslesung der Lumineszenz mittels ‚Mikroplatten-Reader‘ stattfinden. Die Integrationszeit betrug 1000 ms pro Well.

2.7 LIVE/DEAD™-Färbung

Mithilfe der Lebend-/Tot-Färbung lassen sich sowohl in 2D- als auch in 3D-Zellkulturen lebende Zellen grün und tote Zellen rot anfärben. Somit kann die Viabilität qualitativ und durch Zählung auch quantitativ beurteilt werden. Für Versuchsreihen in 2D-Zellkultur wurden die Zellen analog zum alamarBlue Assay™ ausgesät und am nächsten Tag mit Afatinib-Lösung versetzt. Hierfür wurde ein

ähnliches Konzentrationsspektrum wie in den AlamarBlue™-Viabilitätstestungen gewählt und jeweils in mindestens doppelter Ausführung angesetzt. Ebenso erfolgte der Vergleich mit einer DMSO-Kontrolle.

Nach 48 Stunden Inkubation im Anschluss an die TKI-Zugabe wurde die Hälfte des Mediums abpipettiert und mit 100 µl LIVE/DEAD™-Färbelösung versetzt. Diese besteht aus 2 µM Calcein und 4 µM Ethidiumhomodimer, die in Phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline, PBS) gelöst sind. Nach 45 Minuten Inkubation im Brutschrank konnten die Platten mittels Fluoreszenzmikroskops analysiert und dokumentiert werden. Auf ein Waschen der Zellen wurde verzichtet, um möglichst wenig tote Zellen abzuziehen. Dies war möglich, da sowohl Calcein als auch Ethidiumhomodimer im Medium eine geringe Hintergrundfluoreszenz aufwiesen.

Zur Quantifizierung der Viabilität von Fibroblasten in 2D-Zellkultur wurden pro Well je drei repräsentative Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung erstellt. Anschließend wurde anhand dieser Bilder mithilfe von ImageJ die Anzahl aller lebenden und toten Zellen ermittelt und deren Verhältnis zueinander bestimmt.

2.8 Sytox-Green™-/ATP-Red™-Färbung

Zur visuellen Darstellung der lebenden und toten Zellen im Sphäroid wurde eine Doppelfärbung mit Sytox-Green™ und ATP-Red™ durchgeführt. Sytox-Green™ bindet an freie DNA und markiert somit Zellen mit defekter Zellmembran. ATP-Red™ hingegen dringt als membrangängiges Molekül in die Zellen ein und markiert, bei Anwesenheit von ATP in den Mitochondrien, lebende Zellen durch Fluoreszenz. Für die Färbung wurden die Zellen in der gewünschten Konzentration verdünnt, die für die Aussaat als Sphäroid-Kultur benötigt wurden. Anschließend wurden je 1 ml Zellsuspension mit 1 µl Sytox-Green™- und 1 µl ATP-Red™-Färbelösung versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Sphäroid-Kultur, wie in 2.4 beschrieben. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde die Beleuchtungszeit intensitätsadaptiert für die jeweilige Färbung eingestellt. Hierfür diente bei der ATP-Red™-Färbung die DMSO-Kontrollgruppe als avitale Kontrolle und bei der Sytox-Green™-Färbung die mit Ethanol-Lösung versetzten Sphäroide.

2.9 CFSE-Färbung

Um die Sphäroid-Bildung insbesondere in Kokultur mit Fibroblasten nachzuvollziehen, wurden die Tumorzellen vor dem Ansetzen der Sphäroide mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gelabelt. Hierzu wurden 10^6 Zellen in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben, vom Medium abzentrifugiert und in 1 ml PBS mit 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 2 μ l CFSE aufgelöst. Diese Lösung wurde zehn Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend in ein Flacon mit 5 ml Kulturmedium gegeben. Diese Mischung ruhte nochmals für fünf Minuten bei Raumtemperatur und wurde danach abzentrifugiert. Anschließend konnten die Sphäroide, wie nach in 2.4 beschrieben, kultiviert werden. Die Auswertung der Zellanordnung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop unter Anregung mit Grünlicht der Frequenz 555 nm.

2.10 Western Blot

2.10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um für jede Probe die gleiche Proteinmenge von 10 μ g verwenden zu können, wurde zunächst die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Dies erfolgte mittels DC Protein AssayTM. Hierzu wurden die Zellsuspensionen für 20 Minuten mit 250 μ l Ripa-Puffer auf Eis lysiert und anschließend bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Danach konnte der Überstand abpipettiert und pro Probe 5 μ l auf eine 96-Well-Platte überführt werden. Nach Zugabe von 25 μ l Protein Reagent A und 200 μ l Reagent B folgten 15 Minuten Inkubation und die Messung der Absorption bei 750 nm. Durch Einsetzen der Werte in die Gleichung der Proteinstandardkurve, ermittelt durch Proteinstandards aus Rinderserum, ergab sich die Proteinkonzentration der Zelllysate.

2.10.2 Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurden 10 μ g Protein mit 3,75 μ g Laemmli-Puffer versetzt, danach mit Wasser auf 15 μ l aufgefüllt und anschließend für zehn Minuten bei 95°C denaturiert. Im Anschluss

daran konnten die Proben auf die Slots des Trenngels aufgetragen und 80 Minuten lang bei 0,03 kV und 200 mA aufgetrennt werden.

2.10.3 Blotting

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine folgte die Übertragung auf die Trägermembran. Hierzu wurde eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) für zwei Minuten in Methanol aktiviert, das Whatman-Papier sowie die Schwämme in Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS-T) getränkt und gemäß Abbildung 2 zusammengesetzt.

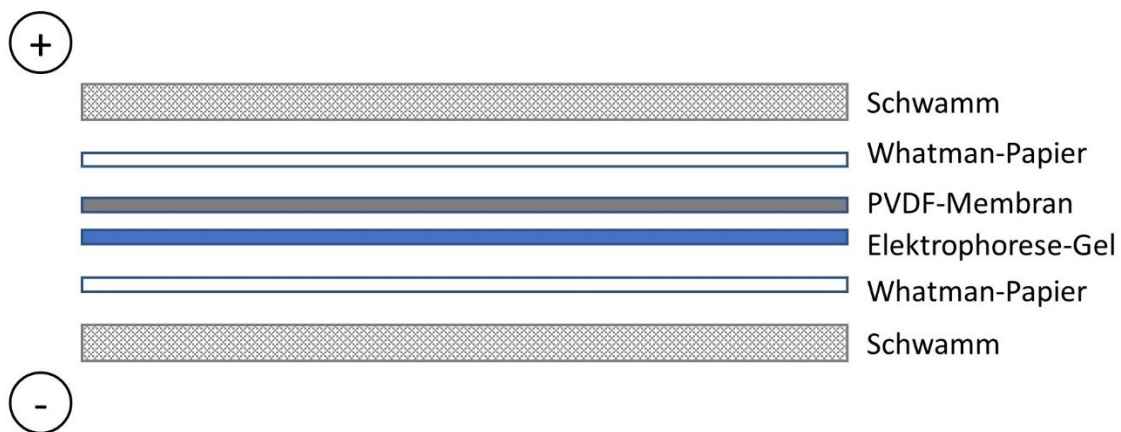


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Western Blot. Eigene Darstellung.

Die Übertragung erfolgte bei 0,1 kV für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit Blocking-Puffer (5% Magermilchpulver, in TBS-T gelöst) benetzt, um unspezifische Antikörper-Bindestellen zu blockieren.

2.10.4 Detektion

Zur Detektion des gewünschten Proteins wurde zunächst der Primärantikörper im Verhältnis 1:1000 mit Blocking-Puffer verdünnt und die Membran mit dieser Lösung für eine Stunde inkubiert. Der Primärantikörper bindet hierbei spezifisch an das Epitop des zu untersuchenden Proteins. Es wurden primäre Antikörper für EGFR, pEGFR, HER3, pHER3, AKT, pAKT, ERK, pERK und GAPDH verwendet.

Anschließend folgte ein Waschschrift mit TBS-T-Puffer und einstündiger Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der ebenfalls im Verhältnis 1:1000 mit Blocking-Puffer

verdünnt auf die Membran aufgetragen wurde. Dieser ist an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt und bindet als Rabbit-Antikörper an das Fc-Fragment von Primärantikörpern dieser Spezies. Vorteilhaft ist hierbei die Signalamplifikation und Kostenersparnis durch Verwendung des gleichen Antiköpers für mehrere Primärantikörper. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T-Puffer für jeweils fünf Minuten kann die Membran für zwei Minuten mit 1 ml Luminol-Lösung und 1 ml Peroxid-Lösung benetzt werden. Daraufhin wurde das Lumineszenz-Signal mit Hilfe eines Transluminator visualisiert.

2.11 Auswertung und Statistik

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal ($n=3$) mit Duplikaten wiederholt, wobei die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet wurden. Die IC_{50} -Dosen wurden aus den resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurven mittels Graph Pad Prism berechnet. Dabei wurde eine IC_{50} -Dosis $> 50 \mu\text{M}$ als Resistenz angesehen. Die Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurden mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht, gefolgt von einem Tukey Post-hoc-Test. Die Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels Student-t-Test analysiert. Hierbei wurde ein p-Wert von $p \leq 0,05$ als signifikant betrachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ansprechverhalten von HNSCC-Zelllinien in 2D-Zellkultur

Alle Zelllinien sprachen unter den in der 2D-Kultur verwendeten Dosen sehr gut auf die TKI-Therapie an. Bei der Behandlung mit 25 μM Lapatinib konnten in Zelllinie 11B und 22B, mittels alamarBlue AssayTM, nahezu keine lebenden Zellen nachgewiesen werden. Bei der Behandlung mit Afatinib waren bereits bei einer Konzentration von 10 μM kaum viable Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, vorhanden. Auch in den Zelllinien 74A und UD01 kam es nach 48 Stunden Inkubation mit 25 μM Lapatinib oder Afatinib zu einem ausgeprägten Viabilitätsverlust.

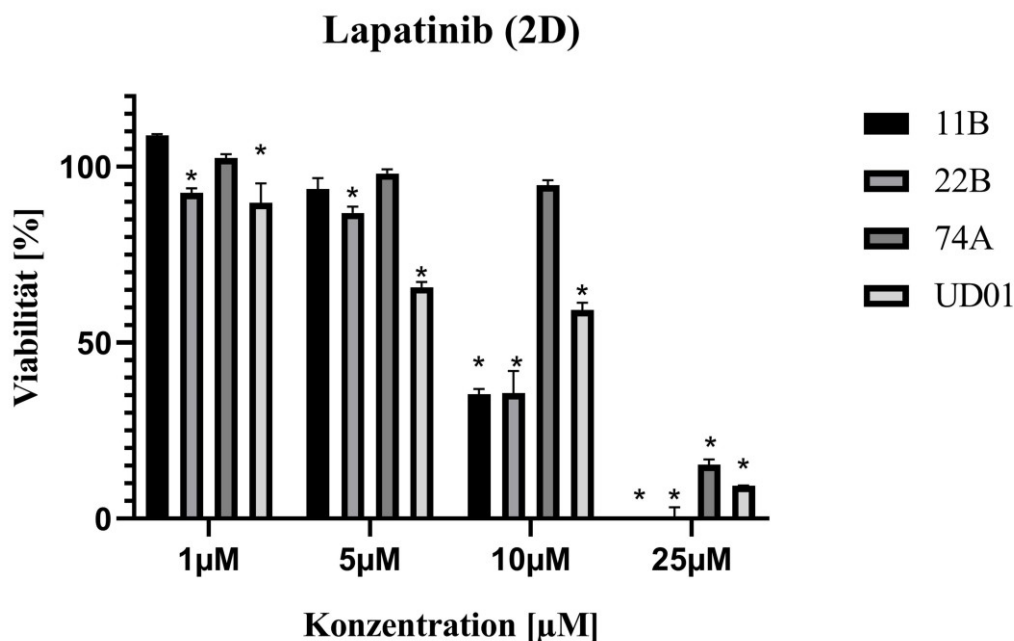


Abbildung 3: Viabilität der Tumorzelllinien 11B, 22B, 74B, UD01 nach Zugabe von Lapatinib für 48 h, Messung mittels alamarBlue AssayTM und Auswertung als Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle. Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (n=3). * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle.

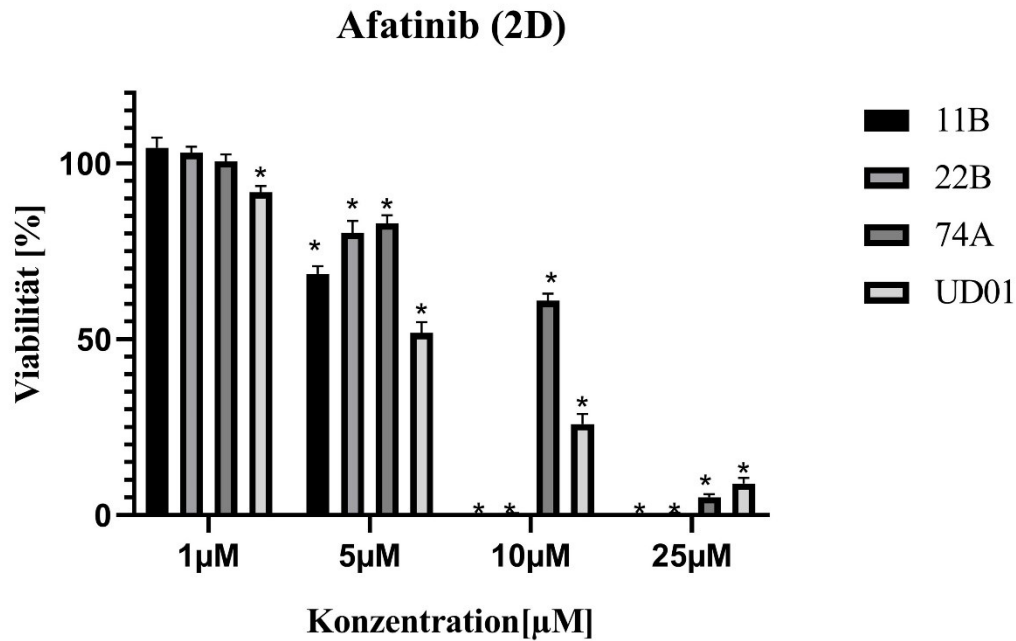


Abbildung 4: Viabilität der Tumorzelllinien 11B, 22B, 74B, UD01 nach Zugabe von Afatinib für 48 h, Messung mittels alamarBlue AssayTM und Auswertung als Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle. Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (n=3). *p≤0,05 gegenüber Kontrolle.

Es folgte die Kalkulation der IC₅₀-Werte der Linien 11B und 22B. Hierbei ergaben sich für die Linie 11B Werte von 8,843 µM (Lapatinib) und 5,191 µM (Afatinib). Für die Linie 22B wurden IC₅₀-Werte von 8,433 µM (Lapatinib) und 5,295 µM (Afatinib) bestimmt.

Zusätzlich wurden die Zellen mittels Calcein/Ethidiumhomodimer-Färbung markiert und nach der Behandlung mit TKI mikroskopiert und fotografiert. Dafür wurden Konzentrationen in der Nähe ihrer IC₅₀-Werte gewählt. (siehe Abb. 5 und 7)

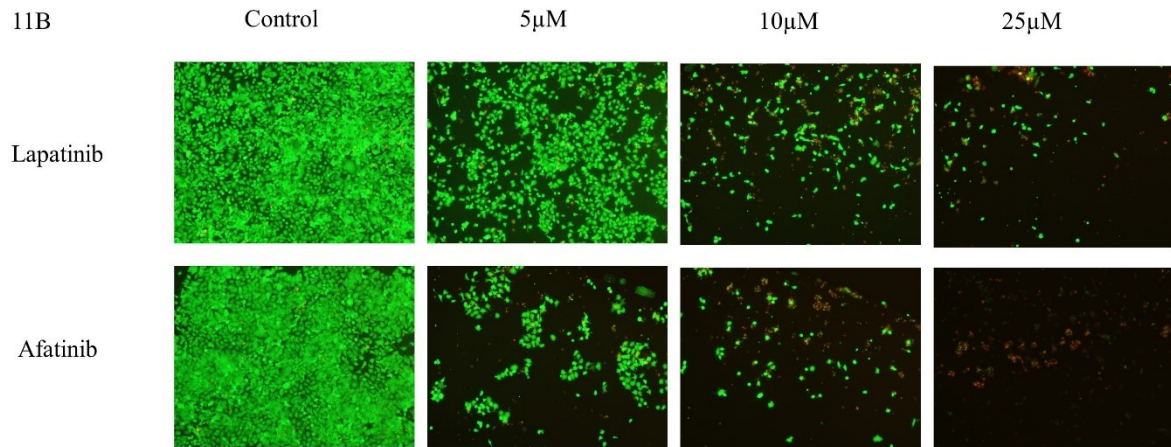


Abbildung 5: Fluoreszenz-Mikroskopie von 11B-Zellen in 2D-Kultur unter Färbung mit Calcein/Ethidiumhomodimer-1, nach Behandlung mit TKI für 48 h (100-fache Vergrößerung). Lebende Zellen sind in Grün, apoptotische/nekrotische Zellen in Rot dargestellt.

Mit steigender Konzentration nahmen Zelldichte und Lebensfähigkeit ab. Unter Behandlung mit 5 μ M Afatinib neigte insbesondere Linie 11B zur Ausbildung von Zellkolonien. Es war eine strikte Trennung von Regionen mit viablen Zellen und Regionen, die vorwiegend zellfrei erschienen oder lediglich apoptotische/nekrotische Zellen beinhalteten, mikroskopisch erkennbar. Generell ließ sich beobachten, dass zunächst die Zelldichte abzunehmen und erst bei höheren Konzentrationen der Anteil an apoptotischen/nekrotischen Zellen anzusteigen schien.

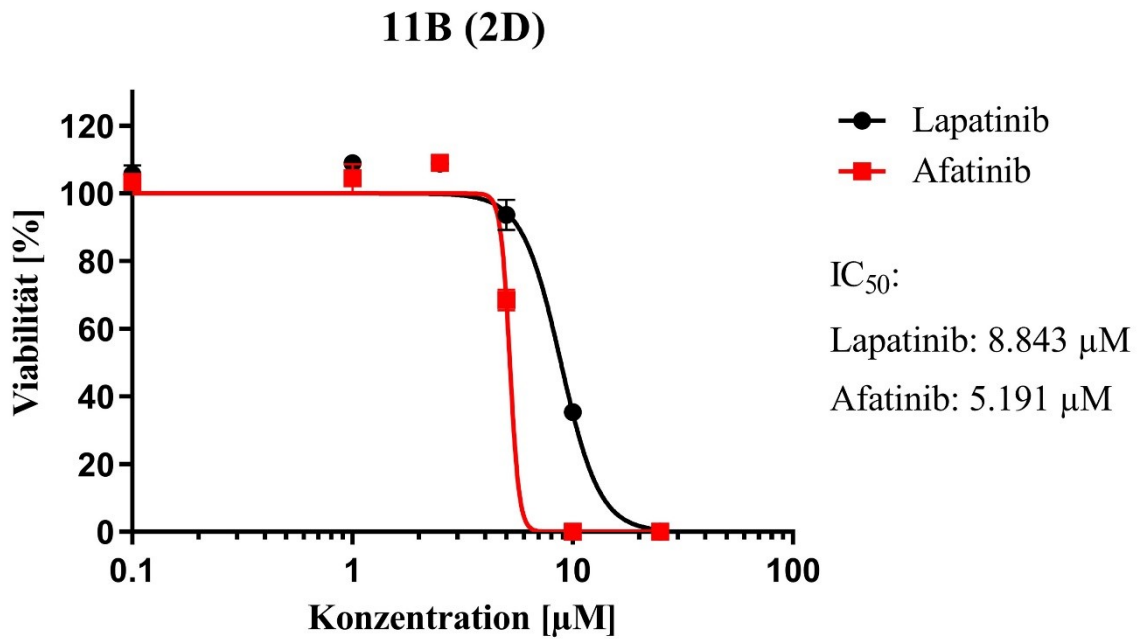


Abbildung 6: Viabilität der 11B-Zellen in 2D-Kultur nach Zugabe von TKI für 48 h. Testung mittels alamarBlue Assay™ und IC_{50} -Kalkulation mittels Kurvenanalyse durch GraphPad Prism. Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben ($n=3$).

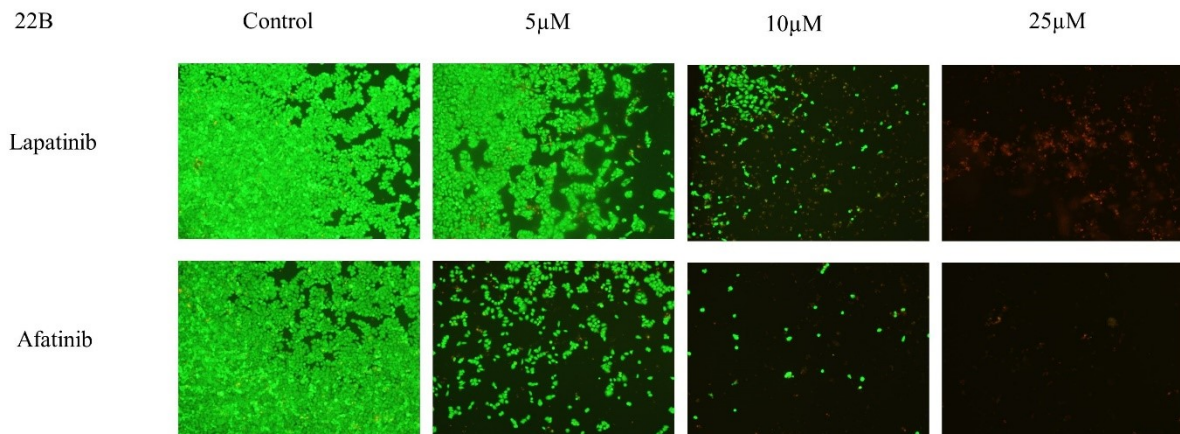


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie von 22B-Zellen in 2D-Kultur unter Färbung mit Calcein/Ethidiumhomodimer-1, nach Behandlung mit TKI für 48 h (100-fache Vergrößerung). Lebende Zellen sind in Grün, apoptotische/nekrotische Zellen in Rot dargestellt.

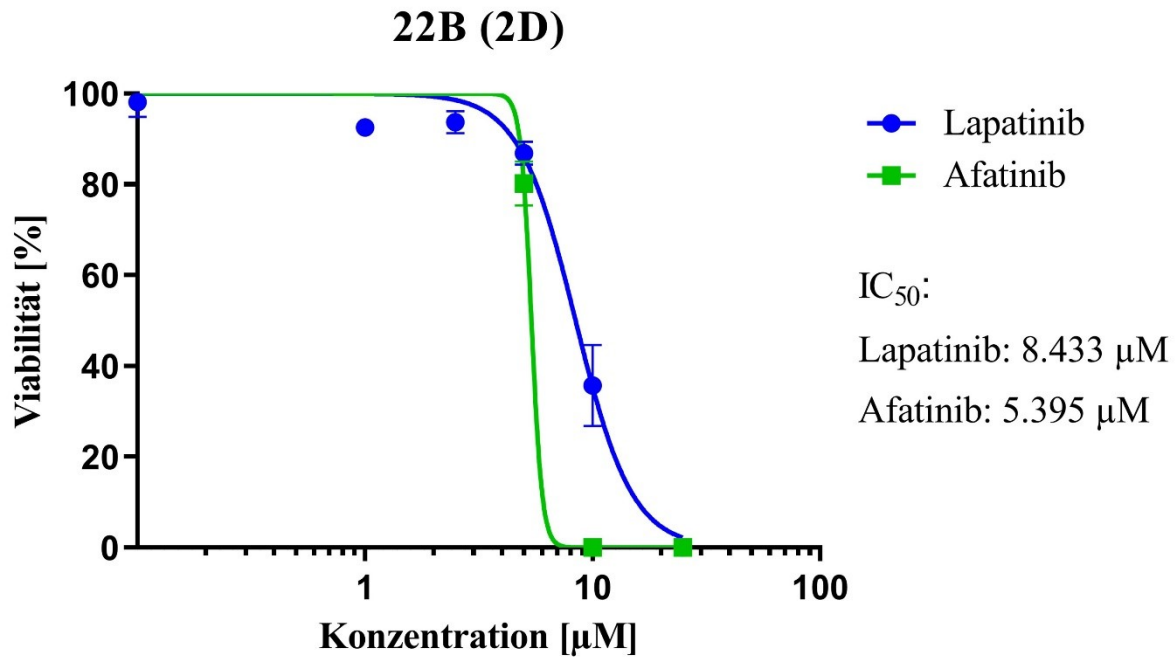


Abbildung 8: Viabilität der 22B-Zellen in 2D-Kultur nach Zugabe von TKI für 48 h. Testung mittels alamarBlue AssayTM und IC₅₀ Kalkulation mittels Kurvenanalyse durch GraphPad Prism. Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (n=3).

3.2 Ansprechverhalten von HNSCC-Zelllinien in 3D-Monokultur

In der 3D-Monokultur konnte eine starke Resistenz der Zelllinie 11B gegenüber Lapatinib festgestellt werden (IC₅₀ > 50 μM). Das Ansprechverhalten gegenüber Afatinib (IC₅₀ = 7,822 μM) war dem in der 2D-Zellkultur ähnlich. Die Zelllinie 22B zeigte in der 3D-Zellkultur weder eine Resistenz gegenüber Lapatinib (IC₅₀ = 9,666 μM) noch gegenüber Afatinib (IC₅₀ = 2,2362 μM).

Es folgte die mikroskopische Auswertung unter Sytox-GreenTM-/ATP-RedTM-Färbung.

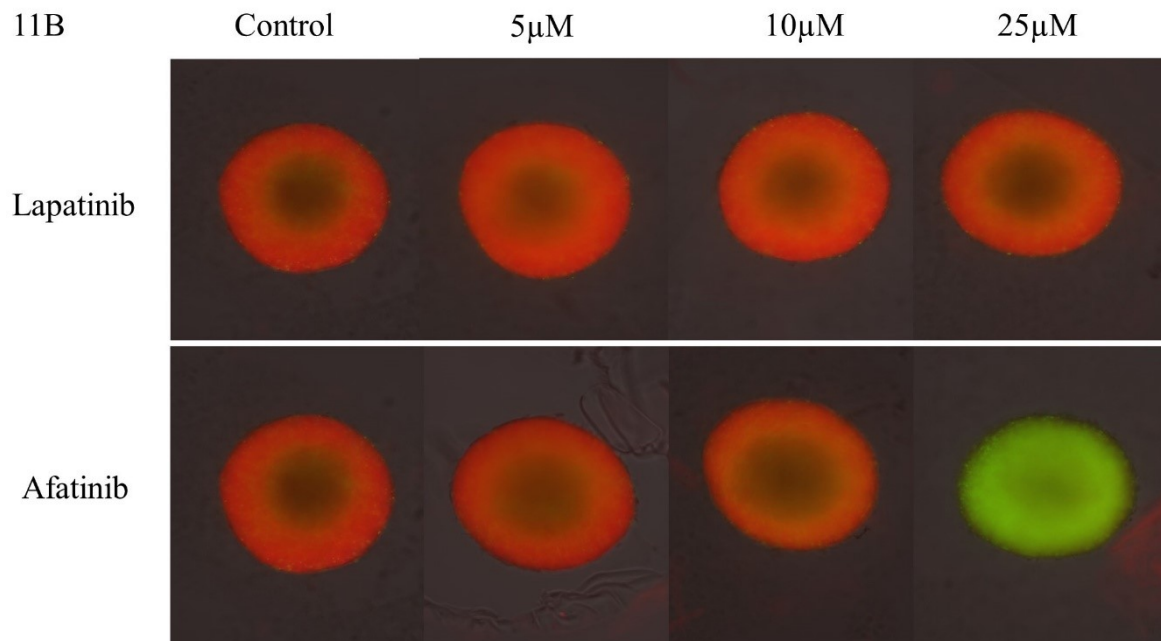


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie von 11B-Zellen in 3D-Monokultur unter Färbung mit Sytox-GreenTM/ATP-RedTM, nach Behandlung mit TKI für 48 h (100-fache Vergrößerung). Lebende Zellen sind in Rot, apoptotische/nekrotische Zellen in Grün dargestellt.

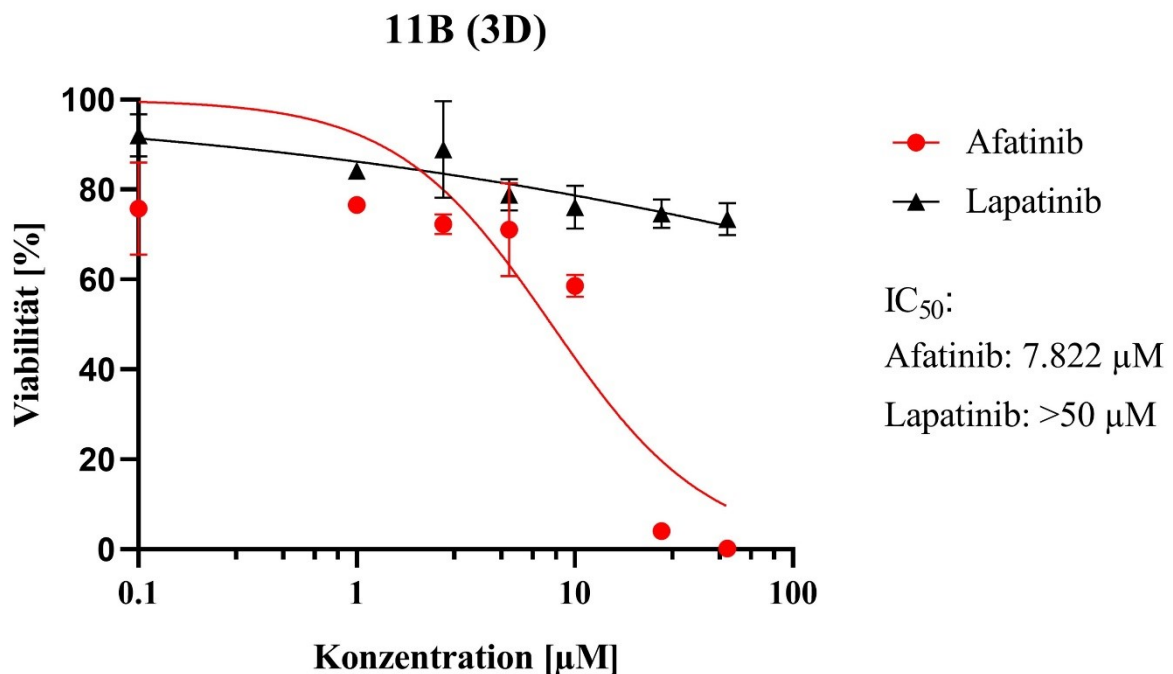


Abbildung 10: Viabilität der 11B-Zellen in 3D-Monokultur nach Zugabe von TKI für 48 h. Testung mittels CellTiter-Glo 3D Assay[®] und IC₅₀ Kalkulation mittels Kurvenanalyse durch GraphPad Prism. Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (n=3).

Unter der Behandlung der Zelllinie 11B mit Lapatinib waren in der mikroskopischen Auswertung der Sphäroide keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Konzentrationen erkennbar. Ein homogenes Verteilungsmuster viabler Zellen im Sphäroid konnte über alle Konzentrationen hinweg festgestellt werden. Unter der Maximaldosis von 50 μM Lapatinib betrug die Viabilität 73,47% gegenüber der Kontrolle. Unter der Therapie mit Afatinib war mikroskopisch insbesondere ab einer Konzentration von 25 μM Afatinib eine starke Durchsetzung des Sphäroids mit apoptotischen/nekrotischen Zellen erkennbar. Die Verteilung war hierbei sehr homogen. Es konnte keine Isolierung apoptotischer/nekrotischer Areale oder eine Konzentration auf äußere Abschnitte des Sphäroids festgestellt werden.

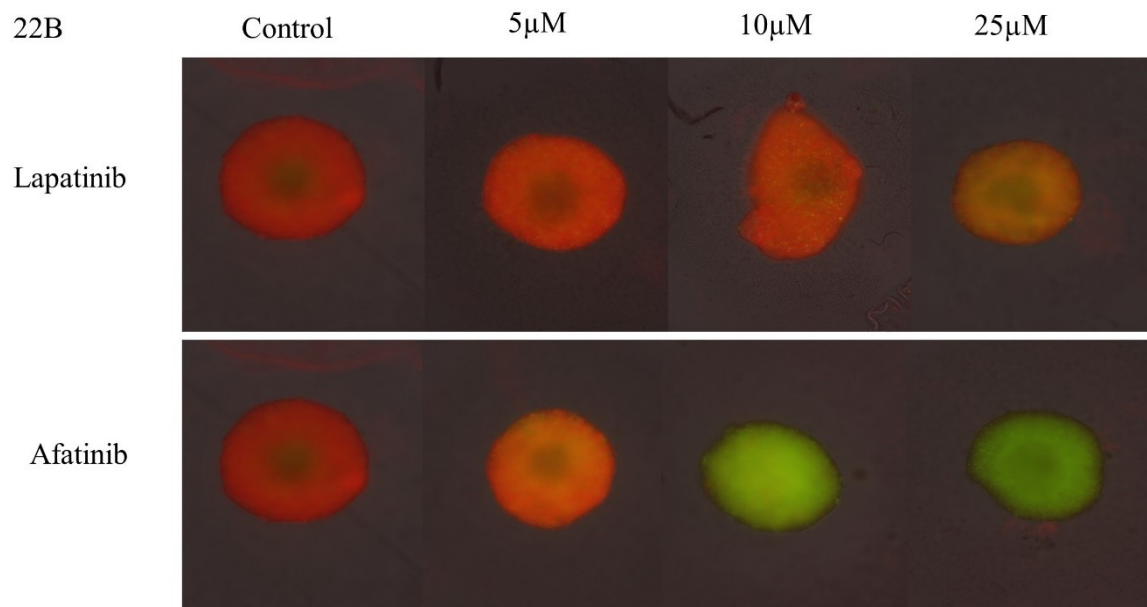


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopie von 22B-Zellen in 3D-Monokultur unter Färbung mit Sytox-GreenTM/ATP-RedTM, nach Behandlung mit TKI für 48 h (100-fache Vergrößerung). Lebende Zellen sind in Rot, apoptotische/nekrotische Zellen in Grün dargestellt.

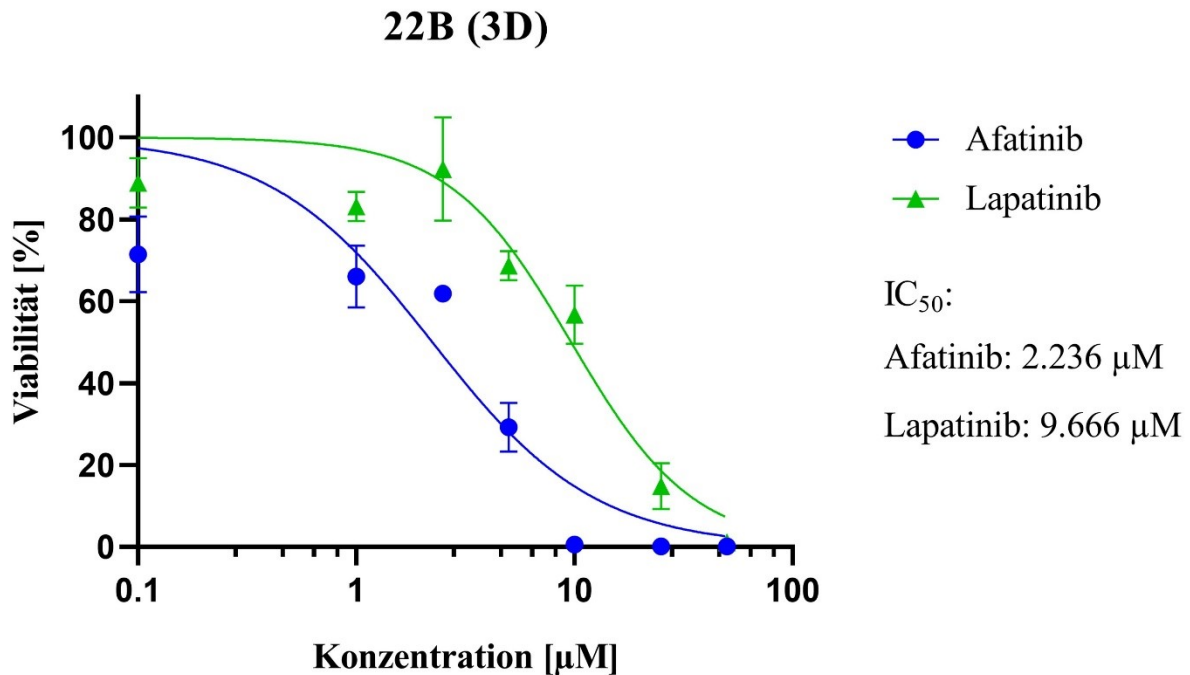


Abbildung 12: Viabilität der 22B-Zellen in 3D-Monokultur nach Zugabe von TKI für 48 h. Testung mittels CellTiter-Glo 3D Assay® und IC₅₀ Kalkulation mittels Kurvenanalyse durch GraphPad Prism. Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (n=3).

In der 3D-Monokultur bildeten die Zellen der Linie 22B weder gegenüber Afatinib noch gegenüber Lapatinib eine Resistenz aus. Es konnte jedoch ein verbessertes Ansprechen auf eine Behandlung mit Afatinib festgestellt werden, was mikroskopisch bestätigt wurde. So fällt bei der Betrachtung der mit Afatinib behandelten Sphäroide in höheren Konzentrationsbereichen von 10 µM und 25 µM eine stärkere Durchsetzung mit apoptotischen/nekrotischen Zellen auf. Ebenso wie bei Linie 11B, ließen sich keine speziellen Areale im Sphäroid abgrenzen, die stärker mit toten Zellen durchsetzt zu sein schienen.

3.3 Ansprechverhalten von CAF

Vor der Durchführung einer 3D-Kokultur sollte zunächst das Ansprechverhalten der Fibroblasten in 2D-Monokultur überprüft werden. Hierfür wurden Konzentrationen von 5 µM und 10 µM ausgewählt, da bei diesen bereits in der 2D-Monokultur der Tumorzelllinien signifikante Viabilitätsunterschiede festgestellt werden konnten. Das

alamarBlue Assay™ stellte sich als nicht geeignet zur Viabilitätstestung von 2D-Fibroblasten-Kulturen heraus. Deshalb erfolgte die optische Auszählung von lebenden und toten Zellen in je drei repräsentativen Bildausschnitten unter 200-facher Vergrößerung. Lebende und tote Zellen wurden mittels Calcein/Ethidiumhomodimer-Färbung markiert.

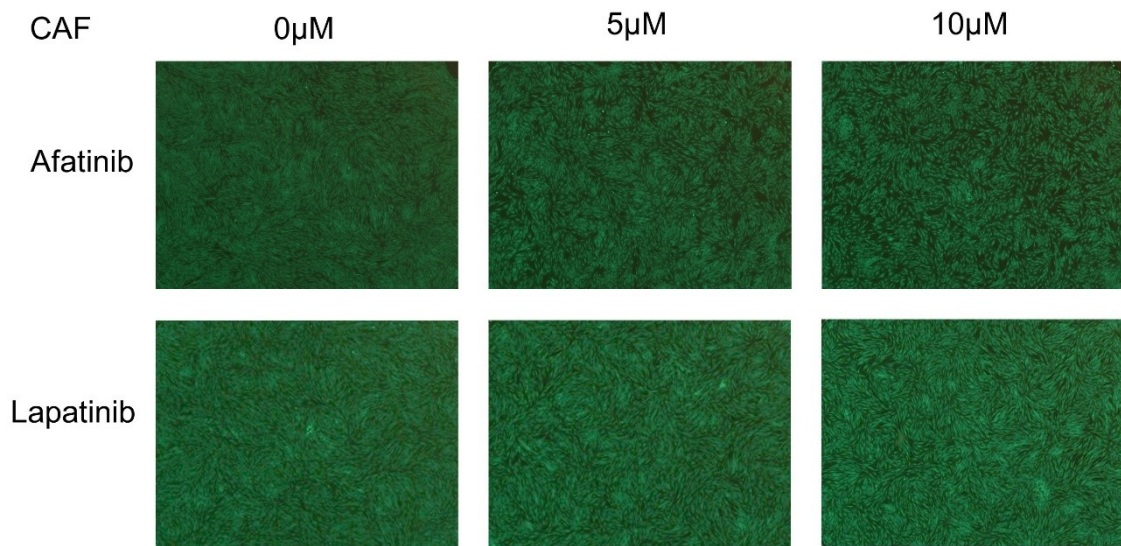


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopie von CAF in 2D-Kultur unter Färbung mit Calcein/Ethidiumhomodimer-1, nach Behandlung mit TKI für 48 h (100-fache Vergrößerung). Lebende Zellen sind in Grün, apoptotische/nekrotische Zellen in Rot dargestellt.

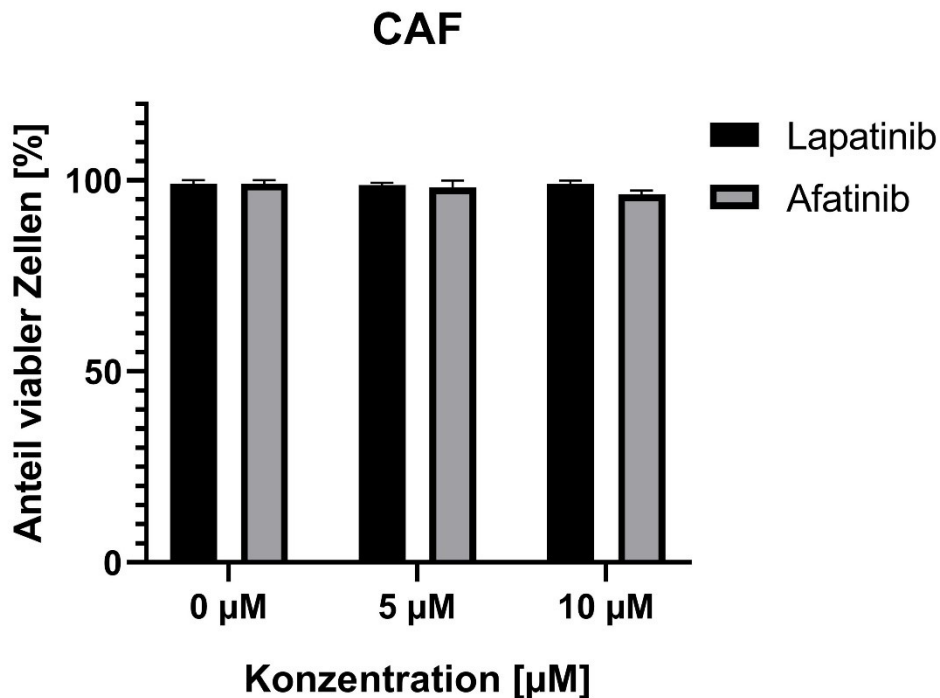


Abbildung 14: Viabilität der CAF in 2D-Kultur nach Zugabe von TKI für 48 h. Auswertung des Anteils lebender und apoptotischer/nekrotischer Zellen durch Zellzählung von je drei repräsentativen Bildausschnitten pro Ansatz unter Mikroskopie in 200-facher Vergrößerung. (n=3)

Es zeigten sich keine signifikanten Viabilitätsunterschiede zwischen den gewählten Konzentrationen, sondern der Anteil der lebenden Zellen blieb konstant hoch. Unter Behandlung mit 10 µM Afatinib konnten noch 96,33% bzw. unter Behandlung mit 10 µM Lapatinib 99,03% lebende Zellen ausgezählt werden. Die Dichte der mit Afatinib behandelten Zellen verminderte sich nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. So lag eine Reduktion der Zelldichte um 14,28% unter 5 µM Afatinib und um 17,42% unter 10 µM Afatinib vor. Auch unter Lapatinib verminderte sich die Zelldichte in einem nicht signifikanten Rahmen: um 6,57% unter 5 µM Lapatinib und um 12,85% unter 10 µM Lapatinib.

3.4 Verteilungsmuster in der 3D-Kokultur

In Vorversuchen zeigte sich, dass es beim Versuch der Kokultur von Tumorzellen und Fibroblasten häufig zu einer Trennung der beiden Zellformen kommt und sich kein homogenes Sphäroid ausbildet. Hierbei lagerten sich die Fibroblasten zumeist als zentraler Kern zusammen, während sich die Tumorzellen in einem Ring um die

Fibroblasten formierten. In einem neuen Ansatz wurde daher versucht, dies zu umgehen, indem zunächst die Tumorzellen für 24 Stunden kultiviert wurden und erst danach die mit CFSE markierten Fibroblasten hinzugefügt wurden. Dies erfolgte mit Gesamtzellzahlen von 50.000 und 10.000 Zellen, wobei 11B-Zellen und CAF je im Verhältnis 60:40 vorlagen.

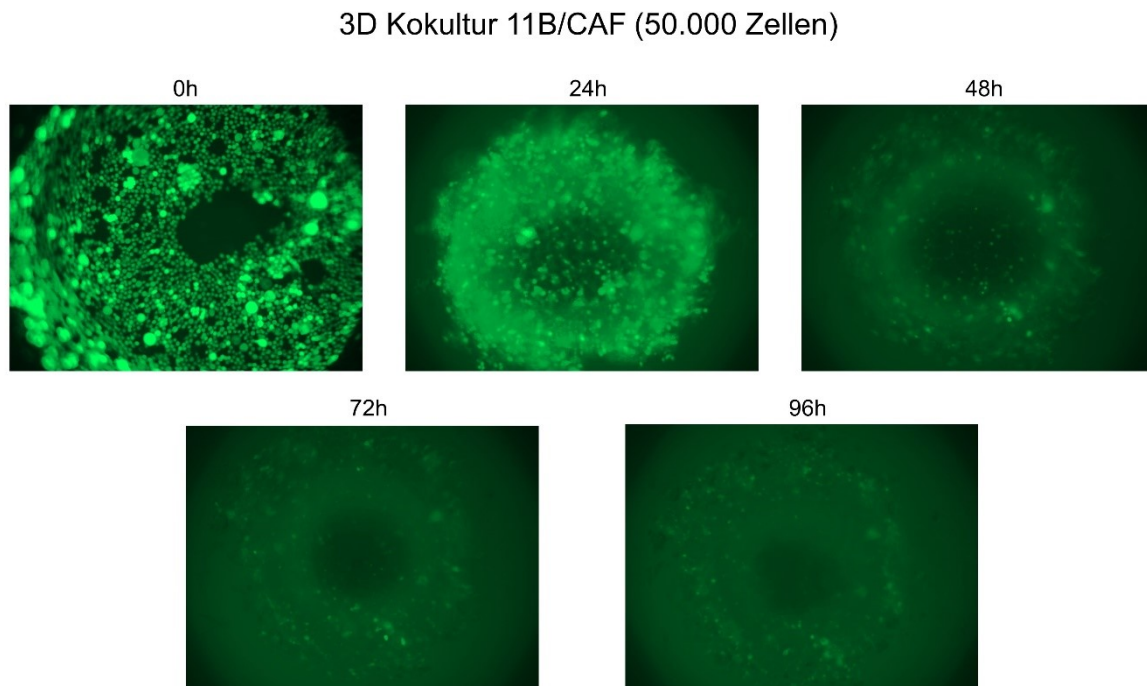


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopie von Tumorzellen der Linie 11B und CAF in 3D-Kokultur, im Verhältnis 30.000 Tumorzellen und 20.000 CAF. 11B ohne Färbung nicht sichtbar, CAF dargestellt in grün durch Färbung mittels CFSE. Zugabe der CAF nach 24 h Kultivierung der 11B Zellen. Bilder 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h nach CAF-Zugabe.

3D Kokultur 11B/CAF (10.000 Zellen)

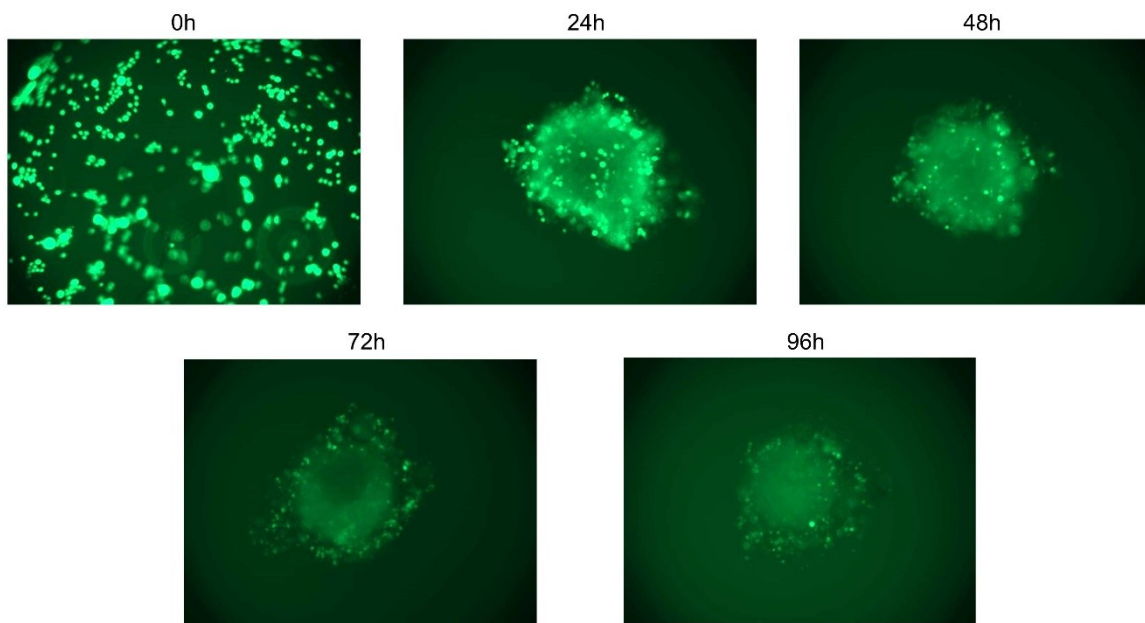


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopie von Tumorzellen der Linie 11B und CAF in 3D-Kokultur, im Verhältnis 6.000 Tumorzellen und 4.000 CAF. 11B ohne Färbung nicht sichtbar, CAF dargestellt in grün durch Färbung mittels CFSE. Zugabe der CAF nach 24 h Kultivierung der 11B Zellen. Bilder 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h nach CAF-Zugabe.

Es konnte beobachtet werden, dass es bei der Kultur mit 50.000 Zellen nach 96 Stunden zu keiner vollständigen Vermischung von Tumorzellen und Fibroblasten gekommen ist. Nach 24 Stunden verdichteten sich die Fibroblasten, lagerten sich immer näher um den Kern aus Tumorzellen an und schienen sich in gewissem Maße mit diesem zu vermengen. Es verbleibt jedoch ein dunkler Kern aus nicht markierten Tumorzellen.

Dahingegen scheint im Ansatz mit kleineren Sphäroiden mit 50.000 Zellen nach 96 Stunden keine Trennung von Fibroblasten und Tumorzellen mehr vorzuherrschen.

Die Bilder der jeweiligen Ansätze sind als repräsentative Beispiele für ein mögliches Migrationsverhalten der Fibroblasten unter 3D-Kokulturbedingungen zu verstehen. Zwischen den Ansätzen ließ sich eine gewisse Variabilität im Verhalten der Zellen feststellen. So vermischten sich die Zellen in manchen Ansätzen schneller, während sie in anderen zunächst getrennte Sphäroide bildeten, die sich erst nach längerer Kultivierung annäherten. Ein Ausbilden zweier komplett getrennter Sphäroide blieb innerhalb dieser Versuchsreihe aus.

3.5 Ansprechverhalten von HNSCC-Zelllinien in 3D-Kokultur

Nach der Beobachtung von Resistenzen gegenüber Lapatinib in der 3D-Monokultur sowie Fibroblasten in der 2D-Monokultur erfolgte die Viabilitätsanalyse der Kokultur aus 60% Tumorzellen und 40% CAF. Als Vergleich diente die 3D-Monokultur aus CAF sowie NHDF.

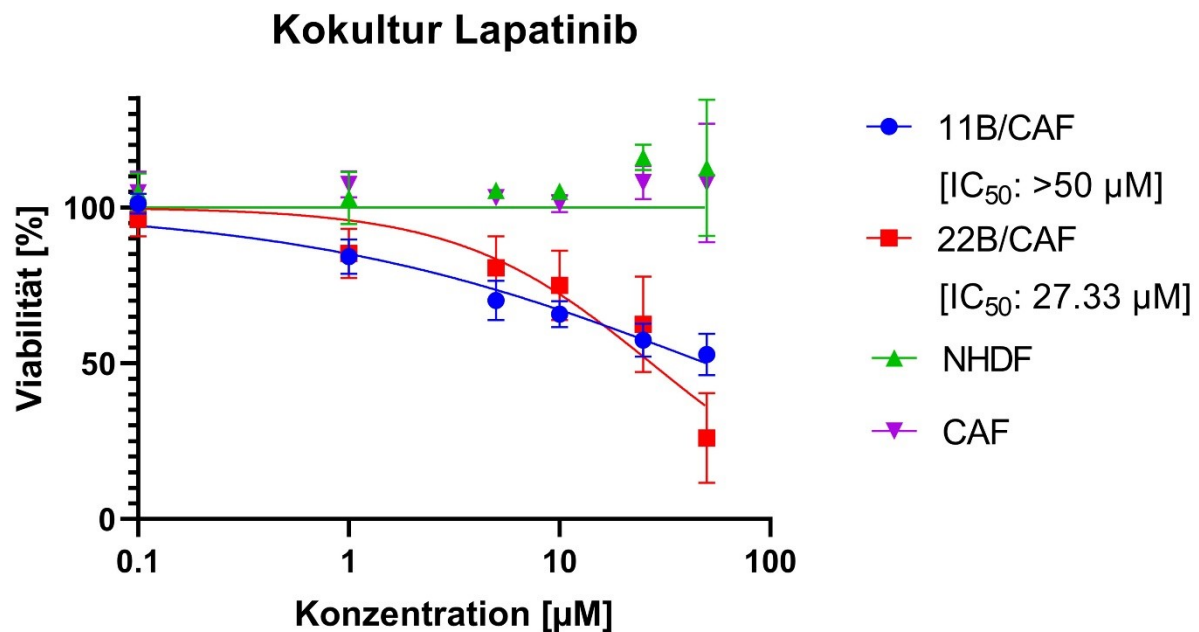


Abbildung 17: Viabilität der 11B- und 22B-Zellen in 3D-Kokultur mit CAF (30.000 Tumorzellen mit 20.000 CAF) sowie NHDF und CAF in 3D-Monokultur (50.000 Zellen). Zugabe von Lapatinib für 48 h. Testung mittels CellTiter-Glo 3D Assay® und IC_{50} Kalkulation mittels Kurvenanalyse durch GraphPad Prism. Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (n=3).

Weder die CAF noch die NHDF reagierten auf den Zusatz von Lapatinib im Konzentrationsbereich bis 50 µM mit einer signifikanten Abnahme der Viabilität. Auch die Kokultur aus 11B-Zellen und CAF blieb insofern gegen die Gabe von Lapatinib resistent, als dass eine $IC_{50} > 50$ µM kalkuliert werden konnte. Unter Zugabe von 50 µM Lapatinib sank die Viabilität auf 52,79% und somit signifikant stärker als in der 3D-Monokultur aus 11B-Zellen. Hier betrug die durchschnittliche Viabilität unter 50 µM noch 73,46%. Zellen der Kokultur aus 22B und CAF sprachen hingegen stärker auf die Gabe von Lapatinib an als Zellen der Kokultur aus 11B und CAF. Die IC_{50} hierfür betrug 27,33 µM. Unter maximaler Dosis von 50 µM betrug die Viabilität noch 26,08% und lag damit höher als in der 3D-Monokultur der Zelllinie 22B. Allerdings

lässt sich im Rahmen dieses Experiments nicht bestimmen, wie groß der Anteil der Tumorzellen an den verbliebenen lebenden Zellen im Sphäroid gewesen ist.

3.6 Rezeptorphosphorylierung unter 2D- und 3D-Zellkultur

Um zu differenzieren, auf welcher Ebene der Signalkaskade mögliche Ursachen für ein Resistenzverhalten gegenüber TKI liegen, erfolgte die Analyse mittels Western Blot, vergleichend in 2D- und 3D-Zellkultur.

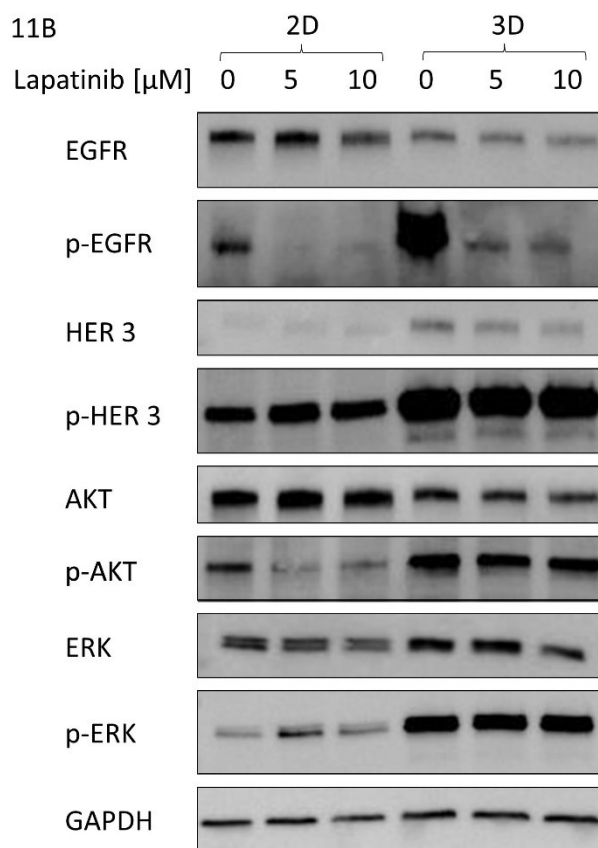


Abbildung 18: Western-Blot-Analyse von aus 11B-Zellen gewonnenen Zell-Lysaten in 2D- und 3D-Zellkultur, 48 h nach Zugabe von Lapatinib.

Die Expression des EGFR war bei beiden Zelllinien (11B und 22B) in ähnlicher Weise gegeben. Es konnte keine stärkere Expression unter 3D-Zellkultur festgestellt werden. Eine deutlich stärkere Phosphorylierung des EGFR und des HER3 besteht in der 3D-Zellkultur von 11B. Durch Zugabe von Lapatinib ließ sich zwar die Phosphorylierung des EGFR weitgehend inhibieren, aber nicht die des HER3. Ebenso bestand eine durch Lapatinib nicht inhibitionsfähige stärkere

Phosphorylierung von AKT und ERK. Bezüglich der Expression von AKT und ERK, ungeachtet des Phosphorylierungsgrads, lag kein wesentlicher Unterschied zwischen 2D- und 3D-Zellkultur vor.

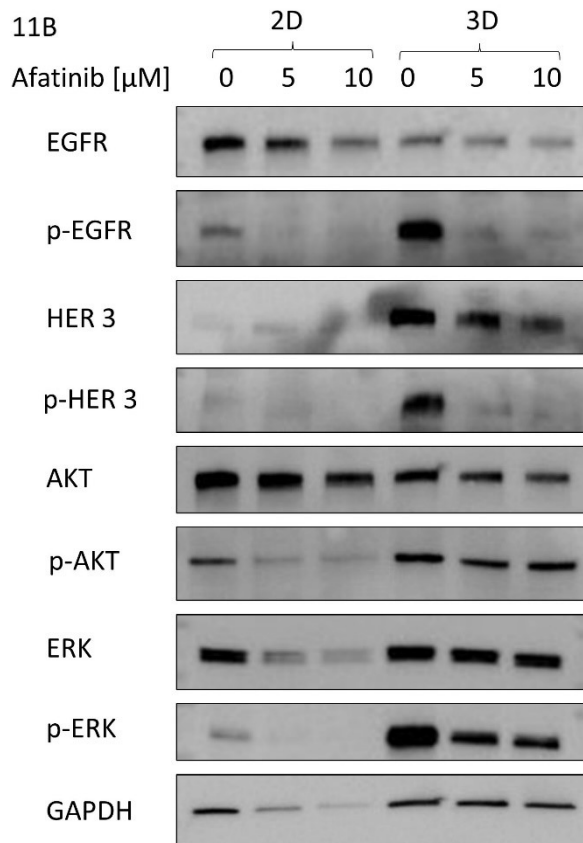


Abbildung 19: Western-Blot-Analyse von aus 11B-Zellen gewonnenen Zell-Lysaten in 2D- und 3D-Zellkultur, 48 h nach Zugabe von Afatinib.

Aufgrund der inkonsistenten Marker-Expression (GAPDH), trotz konsistenter Proteinmenge in der 2D-Zellkultur, lassen sich die mit Afatinib behandelten Zellen aus der 2D-Kultur nicht zuverlässig mit denen der 3D-Kultur vergleichen. Es ist jedoch festzustellen, dass innerhalb der 2D-Kultur eine weiterhin konstante Expressierung von AKT besteht. Alle sonstigen analysierten Proteine und Rezeptoren konnten unter Behandlung mit Afatinib nur noch schwach bis nicht mehr nachgewiesen werden. Auch innerhalb der 3D-Kultur ist erkennbar, dass sowohl die Phosphorylierung des EGFR als auch des HER3 unter Behandlung mit Afatinib nahezu vollständig supprimiert wurde. Die Expressierung und Phosphorylierung von AKT blieb hingegen konstant. Die Phosphorylierung von ERK schwächte sich unter Therapie mit Afatinib ab, wurde aber nicht vollständig supprimiert.

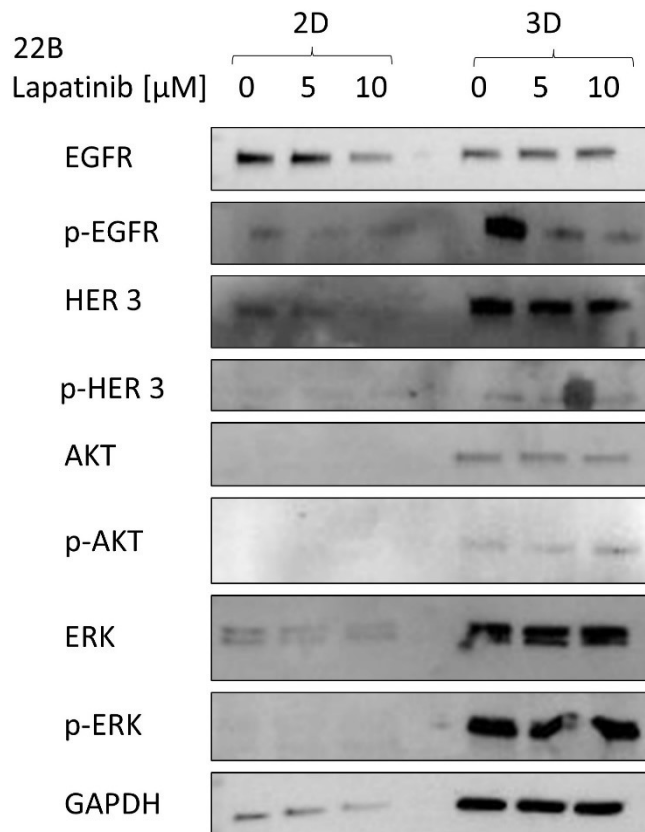


Abbildung 20: Western-Blot-Analyse von aus 22B-Zellen gewonnenen Zell-Lysaten in 2D- und 3D-Zellkultur, 48 h nach Zugabe von Lapatinib.

Bei der Auswertung der Western Blot aus 22B-Zellen in 2D-Kultur fällt die niedrige GAPDH-Expression noch stärker ins Gewicht als bei den 11B-Zellen. Somit kann auch hier kein Vergleich zwischen 2D- und 3D-Kultur vorgenommen werden. In der 3D-Kultur lässt sich erkennen, dass, ebenso wie bei den 11B-Zellen, auch bei den 22B-Zellen eine Suppression der EGFR-Phosphorylierung erfolgte. Eine Phosphorylierung des HER3 konnte auch in den unbehandelten Zellen kaum festgestellt werden. Ebenso bestand kaum Expression von AKT oder eine Phosphorylierung dessen. Die Expression und Phosphorylierung von ERK ist auch unter der Therapie mit Lapatinib als konstant hoch anzusehen.

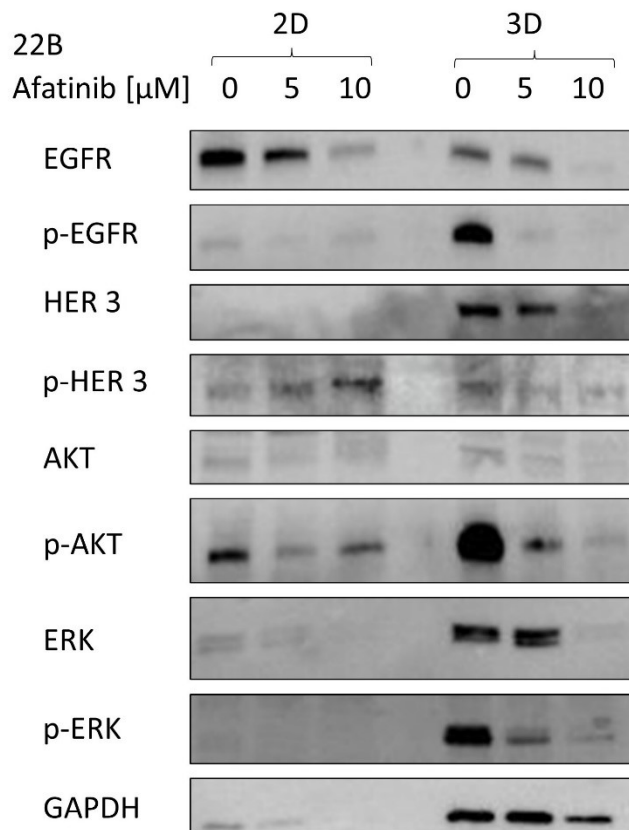


Abbildung 21: Western-Blot-Analyse von aus 22B-Zellen gewonnenen Zell-Lysaten in 2D- und 3D-Zellkultur, 48 h nach Zugabe von Afatinib.

Ähnlich wie zuvor unter der Therapie mit Lapatinib, muss bei der Betrachtung der 22B-Zellen in 2D-Kultur die niedrige GAPDH-Expression beachtet werden. In der 3D-Kultur konnte unter der Therapie mit 10 μM Afatinib eine starke Suppression aller Rezeptoren und deren Phosphorylierung festgestellt werden, bei noch bestehender GAPDH-Expression. Bereits bei der niedrigeren Dosis von 5 μM Afatinib sank die Phosphorylierung von EGFR sowie AKT und ERK bedeutsam ab, bei noch konstanter Rezeptor-/Protein-Expression.

4 DISKUSSION

4.1 Ansprechverhalten von HNSCC auf TKI in 2D-Kultur

Die Tatsache, dass die verwendeten Zelllinien in der 2D-Zellkultur auf die Therapie mit TKI mit einem Viabilitätsverlust reagierten, ist nachvollziehbar. Generell kann mit jeder Substanz eine Zytotoxizität erzeugt werden, wenn sie nur in hinreichender Konzentration verabreicht wird. So gelangte der Schweizer Mediziner Paracelsus bereits im 15. Jahrhundert zu der folgenden Erkenntnis: „Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist.“⁵²

Um dennoch neue Ergebnisse beim Vergleich der Therapieformen präsentieren zu können, ist es erforderlich, stets gleiche Kulturbedingungen zu erzeugen sowie sinnvolle Vergleichsgruppen zu besitzen. Die verwendeten TKI-Konzentrationen wurden durch Verdünnung aus einer Stammlösung mit DMSO hergestellt. Als Kontrollgruppe wurde daher stets ein Ansatz mit entsprechenden Konzentrationen von DMSO versetzt. Da ab einer DMSO-Konzentration im Bereich von 0,5-1% eine signifikante Zytotoxizität festgestellt werden konnte, wurde die maximale TKI-Gabe auf 50 μM festgesetzt.

Der Erwartungsbereich für eine Zytotoxizität der TKI bei HNSCC lag in einem sehr breiten Rahmen von ca. 100 nm bis hin zu 100 μM . Diese Schätzungen basierten auf bestehenden Arbeiten zur Wirksamkeit verschiedener TKI in 2D-Kultur. So führten Kondo et al. Viabilitätsmessungen mit Lapatinib für 16 verschiedene HNSCC-Zelllinien durch und ermittelten IC_{50} -Werte im Bereich von 13,6 bis 60,2 μM .⁵³ Für Afatinib wurden in einer Studie von Young et. al. anhand von zehn verschiedenen HNSCC-Zelllinien IC_{50} -Werte im Bereich von 0,01 bis 8 μM berechnet.⁵⁴ Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit waren daher weniger hinsichtlich der ermittelten IC_{50} -Werte überraschend, als vielmehr hinsichtlich der Konsistenz, mit der die verschiedenen Zelllinien auf die TKI-Gabe reagierten. So wiesen alle Zellen unter der Therapie mit 5 μM Afatinib einen signifikanten Viabilitätsverlust auf, wobei die Viabilität noch über 50% lag. Ab einer Zugabe von 25 μM Afatinib oder Lapatinib konnten in keiner Zelllinie in der 2D-Zellkultur noch relevante Viabilitätswerte gemessen oder mikroskopisch verifiziert werden. Auch das Abfallen der Viabilität bis auf Werte von Null in der Nähe der ermittelten IC_{50} -Werte ist nicht selbstverständlich. So wurde in einigen Studien ab einer gewissen Zytotoxizität eine Plateaubildung

festgestellt, die sich in Form einer bestehenden Restviabilität auch in höheren Konzentrationen zeigte. Somit kann unter Umständen eine IC_{50} -Dosis ermittelt werden, obwohl es im gewählten Konzentrationsbereich nicht zu einem kompletten Absterben der Zellen durch alleinige Gabe von TKI kommt.^{55, 56}

Insbesondere die Zelllinien 11B und 22B glichen sich in ihrem Verhalten gegenüber TKI sehr stark. Dies spiegelte sich in den ermittelten IC_{50} -Werten, die sowohl für Lapatinib (11B: 8,843 μ M, 22B: 8,433 μ M) als auch für Afatinib (11B: 5,191 μ M, 22B 5,395 μ M) sehr ähnlich waren. Einschränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass im Bereich von 5 bis 10 μ M keine weiteren Abstufungen der Konzentration erfolgten, obwohl hier der größte Viabilitätsverlust stattfand. Da es jedoch bei diesem Versuch vorwiegend darum ging, eine grobe Referenz für das Verhalten in 2D-Kultur zu gewinnen, ist die Genauigkeit der gemessenen Werte als Vergleich für weitere Versuche ausreichend.

Des Weiteren lohnt sich die genauere Betrachtung der festgestellten Koloniebildung unter der Therapie mit 5 μ M Afatinib. Diese wurde nicht durch ein spezifisches Assay nachgewiesen. Mikroskopisch ließ sich jedoch gut verfolgen, wie sich bei zunehmender Konzentration der dichte Zellverbund auflöste und sich die Zellen in kleineren Gruppierungen neu anordneten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Vermutung, dass Zellen auch in einfachen Kulturformen, wie der 2D-Zellkultur, miteinander kommunizieren und Zell-Zell Kontakte als Überlebensvorteil genutzt werden können. Dieser Thematik sind bereits einige Arbeiten gewidmet, aus denen hervorgeht, dass auch in einfachen Kulturformen Kommunikationsmechanismen bestehen, die der Zelle einen gewissen Wachstumsreiz, Überlebensvorteil oder auch Strahlenresistenz bieten können.^{57, 58} Da keine genauere Untersuchung der Zellen erfolgte, lassen sich keine Aussagen bezüglich der Fähigkeiten der verwendeten Zellen zur Koloniebildung sowie deren Auswirkungen treffen. Es kann jedoch festgehalten werden, dass bei der Testung von Medikamenten an Krebszellen nicht nur die Viabilität ausschlaggebend ist. Auch weitere Eigenschaften der Zelle, die zur Malignität der Zellen beitragen, müssen betrachtet werden. Gemäß der Thesen von Hannahan und Weinberg gehören hierzu, neben der Replikationsfähigkeit und der Fähigkeit, der Apoptose zu entgehen, auch die Invasionsfähigkeit, die Neoangiogenese, die Eigenständigkeit hinsichtlich der Expression von Wachstumssignalen sowie die Insensitivität gegenüber Anti-Wachstumssignalen.⁵⁹ Alle diese Eigenschaften lassen sich durch spezifische Methoden untersuchen.⁶⁰ In

der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus insbesondere auf die beiden letztgenannten Eigenschaften gelegt.

Anhand der Ergebnisse aus diesem ersten Versuch lassen sich bereits Ursachen erkennen, warum die 2D-Zellkultur kein optimales Verfahren für die Testung von Medikamentenresistenzen darstellt. So bietet diese zwar die Möglichkeit, zahlreiche unterschiedliche Medikamente an vielen verschiedenen Zellen schnell und kosteneffizient auszutesten, aber die daraus resultierenden Ergebnisse erlauben kaum Rückschlüsse auf die Wirkung der Medikamente unter In-vivo-Bedingungen. So stimmen die für Afatinib und Lapatinib ermittelten IC₅₀-Werte in ihrer Höhe in gewissem Maße mit denen überein, die in Studien für andere Karzinomtypen, wie dem NSCLC, ermittelt wurden.⁶¹ Es steht jedoch außer Frage, dass insbesondere für Afatinib beim NSCLC eine bessere Evidenzlage zur klinischen Wirksamkeit besteht als beim HNSCC.⁶²

Die Betrachtung von Zelllinien in 2D-Kultur als repräsentatives Beispiel zur Prognose der Wirksamkeit eines Medikaments gegenüber der verwendeten Karzinomform greift daher zu kurz und ist nicht zulässig.⁶³

4.2 Ansprechverhalten von HNSCC auf TKI unter 3D-Kultur

Die bedeutendste Feststellung bei der Betrachtung der Viabilitätswerte in der 3D-Kultur ist die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Lapatinib in der Zelllinie 11B. Zuvor wurde eine Resistenz als IC₅₀-Dosis über 50 µM definiert, da dies außerhalb der in den Versuchen verwendeten Dosen liegt. Diese Definition unterliegt keiner allgemeinen Gültigkeit. Es ist aber mitunter auch in anderen Studien mit Viabilitätstestung von Tumorzelllinien unter TKI üblich, diese ins Verhältnis zu den verwendeten Dosen zu setzen. Hierbei wurden teilweise bereits Dosen von 20 µM oder weniger als Resistenz definiert.^{64, 65} Dennoch ist nicht auszuschließen, sondern sogar wahrscheinlich, dass bei noch höheren Dosen ein Viabilitätsverlust von über 50% eintreten könnte. Die Tatsache, dass es zu einer Verschiebung der IC₅₀-Dosen kommt, war ebenso in gewissem Maße zu erwarten. So wurde schon in einigen Studien die Verschiebung von Viabilitätswerten beim Vergleich von 2D- und 3D-Zellkulturen untersucht. Melissaridou et al. testeten die beim HNSCC bereits etablierten Medikamente Cisplatin und Cetuximab an HNSCC-Zellen in 2D- und 3D-Zellkulturen. Auch sie gelangten zu der Erkenntnis, dass die Kulturform das

Resistenzverhalten der Zellen signifikant beeinflusst. In der 3D-Zellkultur sprechen manche Zellen auch besser auf eine Therapie an.⁶⁶ Zu dieser Thematik wurde bisher jedoch noch keine Studie mit HNSCC-Zelllinien und TKI durchgeführt. In der vorliegenden Studie wurde nicht nur eine Verschiebung der IC₅₀-Werte beobachtet, sondern auch eine Resistenzentwicklung gegenüber Lapatinib. Deutlich wird der Unterschied zwischen Afatinib und Lapatinib bei der mikroskopischen Betrachtung der Linie 11B in 3D-Kultur. Während der mit 25 µM Lapatinib behandelte Sphäroid in seiner Form und Fluoreszenz der Kontrollgruppe ähnelt, ist der mit 25 µM Afatinib behandelte Sphäroid nahezu avital. Zudem ist erkennbar, dass das Absterben der Zellen sehr homogen verteilt ist und auch bis in die inneren Schichten des Sphäroids hineinreicht. Geeignete Methoden, um genauere Aussagen diesbezüglich treffen zu können, sind die Konfokalmikroskopie oder immunhistochemische Färbungen des Sphäroids.^{67, 68} Bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie erscheinen stets mehrere Schichten des Sphäroids im Bild, wodurch die Aussagekraft bezüglich der Tiefenausdehnungen der apoptotischen oder nekrotischen Zellen eingeschränkt wird. Es handelt sich jedoch um eine kosten- und zeiteffiziente Methode zur Einschätzung der Verteilungsmuster viabler Zellen im Sphäroid. Darüber hinaus kann durch die Verwendung eines zelllyisierenden Viabilitätsassays, wie dem CellTiter-Glo 3D Assay®, sichergestellt werden, dass bei der Testung nicht nur äußere Randschichten des Sphäroids berücksichtigt werden.⁶⁹

Auch wenn es zu keiner Resistenzbildung der Linie 11B gegenüber Afatinib kam, so ist die IC₅₀-Dosis im Verhältnis zur 2D-Kultur leicht angestiegen. Insbesondere unter Behandlung mit 10 µM Afatinib waren die Zellen in der 3D-Kultur optisch und auch messbar viabler. Die möglichen Gründe für ein schlechteres Therapieansprechen in der 3D-Zellkultur sind mannigfaltig. Ein wesentlicher Aspekt ist die unterschiedliche Versorgung der Zellen im Sphäroid. So gelangen die Zellen im Inneren des Sphäroids deutlich schlechter an Nährstoffe und es kommt häufig zu der Ausbildung eines nekrotischen Kernes. Darüber hinaus neigen Zellen dazu, bei schlechter Nährstoffversorgung in einen Ruhezustand überzugehen, wodurch Energie und Nährstoffe eingespart werden können und die Mitoserate absinkt. Aufgrund der niedrigeren Mitoserate sind die Zellen jedoch auch weniger sensibel gegenüber zytotoxischen Medikamenten.^{70, 71} Diese Mechanismen lassen sich bereits durch recht einfache Formen der 3D-Kultur, wie der hier verwendeten 3D-Monokultur, in gewissem Maße repräsentieren.⁷²

Bei der Betrachtung der Viabilitätswerte der Zelllinie 22B in der 3D-Kultur fällt auf, dass sich diese kaum gegenüber jenen in der 2D-Kultur verändert haben. Wenn die IC_{50} -Dosis (Afatinib 3D: 2,236 μ M vs. 2D 5,395 μ M) als alleiniges Entscheidungskriterium angesehen würde, dann läge der Schluss nahe, dass die Zellen in der 3D-Kultur stärker auf die Gabe von Afatinib ansprechen. Hierbei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich diese Unterschiede im Rahmen der Messungengenauigkeit bewegen.

Mögliche weitere Gründe hierfür liegen entweder im Rahmen einer veränderten Signaltransduktion oder wiederum in den veränderten Kulturbedingungen. Ein plausibler Erklärungsansatz in Bezug auf letzteres wäre, dass die größere Anzahl bereits nekrotischer Zellen im Kern für ein azidotisches Milieu sorgt, was zu instabilen Zellkulturbedingungen führt. Zellen in weiter außen gelegenen Zonen des Sphäroids, die anfällig gegenüber der Medikation mit TKI sind, können hierdurch schneller apoptisch/nekrotisch werden.⁷³ Ob und inwieweit die Ausbildung eines nekrotischen Kerns für die 3D-Zellkultur von Vorteil ist, wird aktuell noch diskutiert. Diese Betrachtung verdeutlicht, dass auch in der Literatur kein einheitliches Verständnis bezüglich der Entwicklung von Resistenzen und dem Finden von optimalen Kulturbedingungen vorherrscht.⁷⁴ Welche Kulturform die In-vivo-Bedingungen am besten widerspiegelt, ist ebenfalls eine umstrittene Frage, auf die im weiteren Verlauf noch genauer eingegangen werden soll.

Insgesamt bieten die beiden sich stark voneinander unterscheidenden Reaktionen der Zelllinien in der 3D-Kultur, bei nahezu identischer Reaktion unter 2D-Kulturbedingungen, die optimale Grundlage für den Vergleich der Signaltransduktion in 2D- und 3D-Zellkultur.

4.3 Veränderte Expressionsmuster in 3D-Kultur

Vor der genaueren Analyse der Expressionsmuster anhand der Ergebnisse des Western Blot soll die Bedeutung der Unterscheidung zwischen Rezeptorexpression und Expression des phosphorylierten Rezeptors beleuchtet werden. Da TKI ausschließlich an der Kinasedomäne des Rezeptors wirken, sind generell keine Auswirkungen auf die Expression des Rezeptors per se zu erwarten. Die eigentliche Wirksamkeit der TKI besteht in der Verhinderung einer Phosphorylierung und somit in einer Minderung der Aktivität. Die meisten Rezeptortyrosinkinasen besitzen

mehrere dieser Kinasedomänen. Die genaue Lokalisation der Kinasedomänen, die eine Überaktivität besitzen, lässt sich mithilfe spezifischer Tests ermitteln.⁷⁵ In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Auswahl von je einem Rezeptorantikörper und einem Antikörper für die phosphorylierte Version des Rezeptors ein Fokus auf die Unterschiede in der Gesamtaktivität des Rezeptors gelegt, weniger auf die genaue Lokalisation der Aktivität innerhalb des Rezeptors. Bei genauerer Betrachtung fällt zudem auf, dass die phosphorylierte Version des Rezeptors häufig ein stärkeres Signal erzeugt als die Gesamtexpression des Rezeptors. Dies ist hauptsächlich auf Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der Antikörper und der Belichtungszeit zurückzuführen. Quantitative Vergleiche sind daher auch nur innerhalb einer Bande bei homogener Expression des Markerproteins GAPDH zulässig.

Bei der Untersuchung der Signaltransduktion lag der Fokus auf Zelllinie 11B, um mögliche Gründe für die Resistenzentwicklung gegenüber Lapatinib eruieren zu können. Es fällt auf, dass in der 3D-Kultur eine wesentlich stärkere Phosphorylierung des EGFR sowie des HER3 vorliegt. Wie zu erwarten, wird die Phosphorylierung des EGFR durch Therapie mit Lapatinib bedeutend herunterreguliert, während die Phosphorylierung des HER3 auf konstant hohem Niveau bleibt. Diese Beobachtung entspricht in dem Sinne den Erwartungen, dass Lapatinib lediglich ein Inhibitor für EGFR und HER2 ist. Daher erscheint die These plausibel, dass die beobachtete stärkere Phosphorylierung des HER3 für die Resistenzentwicklung gegenüber Lapatinib ursächlich sein könnte. Ebenso fällt auf, dass die Downstream-Signalproteine AKT und ERK in der 2D-Zellkultur weniger stark phosphoryliert sind. Dies wäre zu erwarten, wenn eine ausreichende Hemmung der HER-Familie besteht. In der 3D-Kultur sind diese, unabhängig von Lapatinib, konstant stark phosphoryliert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Hemmung des EGFR allein, zur Hemmung der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren nicht ausreicht. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass für die Resistenzentwicklung und die Phosphorylierung von AKT und ERK auch andere Mechanismen verantwortlich sind. So wurden bspw. die Expression und Phosphorylierung von HER4 nicht untersucht. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass eine HER-unabhängige Aktivierung der Signalproteine besteht. Diese Aktivierung könnte auch durch andere Rezeptortyrosinkinasen, intrinsische zelluläre Mechanismen oder noch unbekannte Signalkaskaden erfolgen.⁷⁶

Der HER3 ist bereits in Studien zu anderen Tumorentitäten eine diskutierte Option zur Überwindung von Resistenzen gegenüber EGFR-gerichteten Therapien.^{77, 78} Watanabe et al. konnten durch Kombinationstherapie mit dem HER3-selektiven Antikörper Paritumab eine Resistenz von Mammakarzinom-Zelllinien gegenüber dem HER2-selektiven Antikörper Trastuzumab überwinden.⁷⁹ Auch beim HNSCC ist ein Abzielen auf HER3 keine gänzlich neue Überlegung. So wiesen Wang et al. anhand eines Xenograft-Modells die erhöhte Dimerisierung von HER2 und HER3 nach. Durch Kombinationstherapie des HER3 Antikörpers MM-121 mit Cetuximab konnte daraufhin ein verstärkender Therapieeffekt belegt werden.⁸⁰

Bei allen genannten Beispielen handelt es sich allerdings ebenso nur um präklinische Studien, so dass noch kein Nachweis für einen klinischen Benefit der Therapieregime erbracht worden ist.⁸¹

Unter der Behandlung mit Afatinib ist deutlich erkennbar, wie die Phosphorylierung des HER3 simultan zu der des EGFR stark supprimiert wird. Die Erwartungshaltung hier war jedoch nicht so klar wie unter der Therapie mit Lapatinib. Afatinib wird in der Literatur uneinheitlich als panHER-Inhibitor oder auch als Inhibitor von HER1, HER2 und HER4 bezeichnet. Dies liegt wiederum an der Besonderheit des HER3, bei der Aktivierung eine Heterodimerisierung einzugehen. Da aber ohne die anderen Rezeptoren keine bekannte Möglichkeit der Aktivierung besteht, wird durch deren Blockade auch der HER3 inhibiert.⁸² Eine panHER-Inhibition ist demnach wahrscheinlich und wird durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt.

Allerdings waren auch unter erfolgreicher Therapie mit Afatinib sowohl AKT als auch ERK weiterhin phosphoryliert. Lediglich bei ERK ist ein gewisser Unterschied in der Stärke der Phosphorylierung zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe zu erkennen. Dies spricht für die These, dass die Zellen auch HER-unabhängig die Fähigkeit besitzen, die nachgeschaltete Signalkaskade aufrechtzuerhalten. Darüber, ob dies über endogene Vorgänge oder andere Rezeptorgruppen geschieht, lässt sich jedoch lediglich spekulieren.⁸³

Die Analyse der Linie 22B bot dahingegen ein gänzlich anderes Bild. So konnte weder in der 2D- noch in der 3D-Zellkultur eine relevante Menge an phosphoryliertem HER3 festgestellt werden. Deshalb war hier auch kein Unterschied zwischen der Gabe von Lapatinib und Afatinib zu erwarten. Die Phosphorylierung des EGFR wurde jedoch, ebenso wie in der Linie 11B, sowohl durch Lapatinib als auch durch Afatinib stark supprimiert.

Die reduzierte Phosphorylierung des HER3 in Linie 22B passt somit gut zu dem Erklärungsansatz, dass die gegen Lapatinib aufgebaute Resistenz der Linie 11B auf die stärkere HER3-Phosphorylierung zurückzuführen ist. Nicht erklären lässt sich hierdurch jedoch die erhöhte Wirksamkeit von Afatinib auf die Linie 22B in der 3D-Kultur. Denn aufgrund der nicht vorhandenen Aktivität von HER3 müsste demnach auch die zusätzliche Wirksamkeit durch HER3-Inhibition eingeschränkt sein. Hier hätte eine ergänzende Untersuchung des HER4 weitere wichtige Informationen über eine mögliche Ursache liefern können. Unter der Therapie mit 10 μM Afatinib in der 3D-Kultur konnten in der Linie 22B von keinem der gemessenen Signalproteine und Rezeptoren noch relevante Mengen festgestellt werden, obwohl noch eine Marker-Expression von GAPDH bestand. Die einfachste Erklärung hierfür ist, dass die Zellen vermutlich in zu großer Menge apoptotisch oder nekrotisch waren. Dies könnte dafür gesorgt haben, dass ein Großteil der funktionellen Proteine bereits zersetzt wurde und dadurch nicht mehr nachweisbar war. Dabei zeigt sich die Schwierigkeit der korrekten Dosisfindung in derartigen Versuchsreihen. Während eine zu niedrig gewählte Dosis eventuell einen zu geringen Effekt erzeugt, sorgt eine zu hoch gewählte Dosis für einen zu hohen nicht verwertbaren Zellzerfall, wie dies teilweise auch unter 2D-Kulturbedingungen der Fall war. Allerdings sollte die Signaltransduktion im Grenzbereich zur IC_{50} -Dosis untersucht werden, wodurch einige Erkenntnisse gewonnen werden konnten, die zur Ergänzung der Ergebnisse aus den Viabilitätstestungen dienen.

4.4 Bedeutung von CAF für die 3D-Kultur

Um die Tumorzellkultur, insbesondere die 3D-Zellkultur, besser mit in-vivo-ähnlichen Eigenschaften auszustatten, spielen die sogenannten tumorassoziierten Fibroblasten (engl. cancer associated fibroblasts, CAF) eine wesentliche Rolle. Sie gehören, ebenso wie Immunzellen, vaskuläre Zellen, Adipozyten und die Extrazellulärmatrix, zum Tumor Mikroenvironment (TME).⁸⁴ Diesem wurde in der Vergangenheit häufig zu wenig Beachtung geschenkt. Es ist jedoch nach heutigem Wissenstand essenziell für die Versorgung und Überlebensfähigkeit des Tumors. Deshalb ist es sinnvoll, diesen Teil der Tumorarchitektur bei der Untersuchung der Resistenzentwicklung von Tumorzellen mitzuberechnen.⁸⁵

Die verwendeten CAF wurden in Vorversuchen der Arbeitsgruppe aus Patientenmaterial gewonnen. Bedingt durch den Isolationsprozess und die Tatsache, dass keine Testung der Zellen erfolgte, kann nicht garantiert werden, dass es sich bei den gewonnenen Zellen um reine Fibroblasten handelt. Somit müsste korrekterweise von Stromazellen die Rede sein. Zur Vereinfachung, und da in der Literatur dahingehend häufiger von CAF die Rede ist, werden die Zellen in der vorliegenden Arbeit lediglich als CAF bezeichnet.

In der Viabilitätstestung unter 2D-Kulturbedingungen wurden die Fibroblasten nur geringfügig durch die Zugabe von Lapatinib oder Afatinib beeinflusst. Der Anteil lebender Zellen blieb konstant bei fast 100%. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Zunächst ist es wahrscheinlich, dass die CAF ein anderes Expressionsmuster als die Tumorzellen besitzen und somit ggf. auch weniger aktive Rezeptoren der HER-Gruppe. Nachgewiesen wurde dies in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht, da der Fokus auf der Resistenzentwicklung der Tumorzellen lag. Die stärkere Wirkung auf Tumorzellen bei gleichzeitiger Schonung von normalen Körperzellen entspricht demgegenüber dem gewünschten Effekt in der zielgerichteten Tumorthherapie. Es ist jedoch noch nicht geklärt, inwieweit die tumorassoziierten Fibroblasten auf zellulärer Ebene von normalen Fibroblasten zu unterscheiden sind. In ihrer Funktion und Expressionscharakteristik stellen die CAF über die verschiedenen Tumorentitäten hinweg eine sehr heterogene Gruppe dar.⁸⁶ Als gesichert scheint, dass CAF zahlreiche supportive und strukturelle Aufgaben im Tumor übernehmen. Teilweise sind diese rein mechanischer Natur, bspw. im Sinne einer Barrierefunktion gegenüber Immunzellen und Medikamenten. Darüber hinaus fungieren sie durch die Ausbildung einer Extrazellulärmatrix als Basis für die Vaskularisierung und Versorgung mit Nährstoffen. Den CAF werden jedoch auch komplexere Funktionen zugeschrieben. So wurden bereits kommunikative Eigenschaften in CAF nachgewiesen, wie die Exkretion von Wachstumsfaktoren oder immunsuppressiven Liganden.⁸⁷ Diese Kombination aus normalen fibroblastischen und malignen Eigenschaften erschwert die medikamentöse Abzielung auf CAF.

Ein weiterer Grund, warum die CAF kaum auf die TKI-Gabe reagiert haben, ist ihr generell langsames Wachstumsverhalten. TKI zielen, bedingt durch ihr Funktionsprinzip, ebenso wie herkömmliche Zytostatika, eher auf schnell teilende Zellen ab.⁸⁸ Bis zum vollständigen Bewachsen einer Kultureinheit benötigten die verwendeten Fibroblasten zumeist ca. zehn Tage, wohingegen die Tumorzelllinien

dieses Ziel in durchschnittlich ca. fünf Tagen erreichen. Dieser Wachstumsunterschied ist nicht zu vernachlässigen, erklärt den geringen Einfluss der TKI jedoch nicht vollständig.

Bei genauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass zwar der Anteil toter Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe kaum beeinflusst wurde, sich jedoch bei den mit Afatinib behandelten Zellen die Lücken zwischen den Zellen vergrößerte. Zudem wandelte sich die Konfiguration der Zellen von einer spindelförmigen in eine eher rundliche Form. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die CAF durch die Zugabe von Afatinib in ihrer Proliferation und Funktion eingeschränkt wurden. Generell ist der Vergleich der Viabilitätswerte von CAF und Tumorzellen nur eingeschränkt möglich. Zum einen haben die verwendeten CAF und die Tumorzelllinien nicht denselben Primärtumor als Ursprung. Des Weiteren wurde im Versuch mit den CAF der Anteil an toten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen manuell ermittelt. Bei den Versuchen mit Tumorzellen geschah dies hingegen über das alamarBlue™ Viabilitäts Assay, das die Viabilität ATP-abhängig mit der Kontrollgruppe vergleicht. Dadurch werden bei der Assay-Messung inaktive Zellen als weniger stark viabel gewertet. Somit entspricht eine Zählung des Anteils lebender Zellen an der Gesamtzahl der Zellen nicht vollständig der Viabilität mittels Assay-Messung. Bei Betrachtung der Gesamtheit aus Messwerten und mikroskopischer Analyse kann dennoch festgestellt werden, dass die TKI-Gabe einen verhältnismäßig geringen Effekt auf die Fibroblasten hatte. Auch aufgrund dessen scheint es erforderlich zu sein, die Fibroblasten in präklinische Tumormodelle miteinzubeziehen.

4.5 Entwicklung einer 3D-Kokultur

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass beim Versuch der Kokultur aus Tumorzellen und Fibroblasten häufig eine Schichtung aus Tumorzellen im Randbereich und Fibroblasten im Kernbereich des Sphäroids entstand. Die Tatsache, dass beide Zellarten nicht vom gleichen Primärtumor abstammen, stellt beim Versuch der Kokultur eine zusätzliche Schwierigkeit dar. Daher kann im Vorfeld kaum abgeschätzt werden, ob die beiden Zellarten miteinander interagieren, unabhängig voneinander existieren oder sogar schädigend aufeinander wirken. Deshalb wurde die Sphäroidbildung unter zeitversetzter Zellzugabe und mit unterschiedlichen Zellzahlen untersucht. Allerdings ordneten sich die Zellen,

unabhängig von der Zellzahl, meist zu einem singulären Sphäroid zusammen. Auch wenn es zunächst wieder zu einer getrennten Formierung von CAF und Tumorzellen kam, näherten sich die Zellen tendenziell mit längerer Kulturdauer immer stärker an den Sphäroid an. Dies bestätigt die Notwendigkeit der längeren Inkubationsdauer für die 3D-Kultur. Bis zur vollständigen Ausbildung eines stabilen Sphäroids wird zumeist von einer Kulturdauer von über 72 Stunden ausgegangen. In einigen Studien werden jedoch auch Kultivierungen über mehrere Wochen durchgeführt.^{48, 89} Dieser höhere Zeitaufwand kann als einer der Nachteile des 3D-Zellkulturmodells betrachtet werden. Andererseits entspricht dies stärker den In-vivo-Bedingungen, da für die Entwicklung eines Karzinoms und die Einstellung eines Therapieeffekts unter realen Bedingungen weit mehr als wenige Tage anberaumt werden müssen. Hierbei gilt es abzuwägen, ob hinsichtlich der individuellen Fragestellung die höheren Kosten und der Zeitaufwand den Mehrgewinn an Information durch die 3D-Zellkultur rechtfertigen.

Zudem stellt sich die Frage, welche optimale Größe die einzelnen Sphäroide haben sollten. Ein größerer Sphäroid ist einfacher zu handhaben, bspw. bei notwendigen Umpipettiervorgängen. Darüber hinaus bietet ein größerer Sphäroid die Möglichkeit, mehrere Regionen mit unterschiedlicher Nährstoffversorgung darzustellen, bis hin zu nekrotischen Regionen. Andererseits neigen zu große Sphäroide zu größerer Instabilität und weisen somit das Risiko auf, zu zerfallen oder in der Gesamtheit avital zu werden. Zudem verändern sich auch die Dichteigenschaften des Sphäroids in Abhängigkeit von der Größe.⁹⁰

Im Gegenzug sind kleinere Sphäroide schneller in der Formierung und bilden ein lockereres Grundgerüst. Dies konnte auch im vorliegenden Versuch beobachtet werden. In der 3D-Kokultur mit lediglich 10.000 Zellen bildete sich deutlich schneller ein homogenes Gemisch aus Fibroblasten und Tumorzellen. Die in anderen Studien verwendeten Sphäroid-Größen variieren stark. Häufig werden Zellzahlen unterhalb von 10.000 verwendet, mitunter aber auch wesentlich größere Sphäroide mit über 300.000 Zellen.^{91, 92}

In der vorliegenden Arbeit wurde wegen der genannten besseren Handhabbarkeit und der Möglichkeit zur Mitbeurteilung unterversorgter Areale eine Zellzahl von 50.000 gewählt. Dies entspricht einem Kompromiss. Aufgrund der Ergebnisse des Tracing-Versuchs kann aber nach ausreichender Kultivierungsdauer von über 96

Stunden von einem ausreichend kondensierten und relativ homogen durchmischten Sphäroid ausgegangen werden.

4.6 Ansprechverhalten in 3D-Kokultur

Die Viabilitätsversuche zur 3D-Kokultur aus Tumorzellen und CAF sowie zur 3D-Monokultur aus Fibroblasten fanden, ebenso wie die Versuche an den Tumorzellen in 3D-Monokultur, unter Verwendung des CellTiter-Glo 3D Viability Assay® statt. Aufgrund der identischen Versuchsbedingungen lassen sich die Ergebnisse gut miteinander vergleichen. Wegen des bereits in der 3D-Monokultur beobachteten Resistenzverhaltens der Zelllinie 11B gegenüber Lapatinib wurden die Kokulturversuche auf den Wirkstoff Lapatinib beschränkt, um den Materialaufwand zu minimieren. Hierbei bestand die Fragestellung darin, ob sich die Resistenz gegenüber Lapatinib auch in der Kokultur manifestiert und ggf. auch die Linie 22B durch die Kokultur eine gewisse Resistenz entwickeln kann.

Aufgrund der Versuche in der 2D-Zellkultur war zu erwarten, dass die CAF auch unter 3D-Kulturbedingungen kaum auf die Zugabe von Lapatinib reagieren. Das Ausmaß dieser Resistenz war dennoch überraschend. So zeigten weder die CAF noch die NHDF unter der Gabe der Höchstdosis von 50 µM Lapatinib einen signifikanten Viabilitätsverlust. Hinsichtlich des Resistenzverhaltens gegenüber Lapatinib konnte somit kein Unterschied zwischen CAF und NHDF nachgewiesen werden. Dies bestätigt in gewisser Weise die Annahme, dass CAF in vielerlei Hinsicht normalen Fibroblasten ähneln. Es ist zudem noch nicht genau bekannt, wodurch sich CAF bilden. Es bestehen Theorien über deren Ursprung aus lokalen Fibroblasten aber auch bezüglich der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT).⁹³

⁹⁴

Dies kann jedoch auch als Beispiel für den Überlebensvorteil herangezogen werden, den der Tumor aus den CAF bildet. Aufgrund der Expressions- und Wachstumseigenschaften von regulären Fibroblasten kann von einer Resistenz und Barrierewirkung gegenüber herkömmlichen zytostatisch wirksamen Medikamenten ausgegangen werden. Zudem besitzen die CAF auch promaligne supportive und kommunikative Eigenschaften.⁹⁵

Durch die starke Resistenz der Fibroblasten gegenüber Lapatinib wäre auch bei nicht vorhandener gegenseitiger Beeinflussung der Zellen zu erwarten, dass durch die

Beimischung von 50% CAF die Viabilität der 3D-Kokultur ansteigt. Dieser Effekt ist jedoch insbesondere bei der Zelllinie 11B nicht im erwarteten Maß eingetreten. So bestand weiterhin eine IC_{50} -Dosis $>50 \mu\text{M}$. Unter Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Lapatinib stellte sich aber ein signifikant stärkerer Viabilitätsverlust als in der 3D-Monokultur ein. Einen Erklärungsansatz hierfür zu finden, gestaltet sich schwierig, da die meisten Theorien von supportiven Eigenschaften der CAF ausgehen.⁹⁶ Die naheliegendste Erklärung besteht darin, dass die beiden verschiedenen Zelltypen in der 3D-Kokultur zwar nebeneinander koexistieren, jedoch nicht miteinander interagieren. Der zusätzliche Viabilitätsverlust könnte dann darin begründet sein, dass, bedingt durch das bestehende Zellgeflecht, weniger Interaktionen zwischen den Zellen stattfinden können. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass die Fibroblasten im Modell weniger einer Barrierefunktion nachkommen, sondern vielmehr das Grundgerüst des Sphäroids auflockern und dadurch eine bessere Wirkstoffzirkulation gewährleisten. Die letztgenannte Argumentation dürfte hierbei nur eine untergeordnete Rolle spielen, da davon auszugehen ist, dass die kleinen Moleküle der TKI auch in dicht gepackte Sphäroide problemlos diffundieren können.⁹⁷ Dies wurde zudem durch die Versuche in der 3D-Monokultur bestätigt, da keine Barriere-Entwicklung festzustellen und der Zelluntergang relativ homogen im Sphäroid verteilt war.

Bei der 3D-Kokultur aus 22B Zellen und CAF stellte sich hingegen der naheliegendere Effekt ein. So stieg die IC_{50} -Dosis von $9,666 \mu\text{M}$ in der Monokultur auf $27,33 \mu\text{M}$ in der Kokultur signifikant an. Auch unter Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Lapatinib konnte in der 3D-Kokultur noch 26,08% Viabilität detektiert werden, während in der 3D-Monokultur das Sphäroid bereits als vollständig avital zu werten war. Hierbei lässt sich allerdings nicht klären, wie viele der restlichen vorhandenen Zellen noch Tumorzellen waren und bei wie vielen es sich um CAF handelte. Um diese Unterscheidung vornehmen zu können, müssten zusätzliche parallele Versuche, bspw. mit immunhistochemischer Färbung, durchgeführt werden. Denn nach Viabilitätsanalyse mittels Lyse-basiertem Assay, wie dem CellTiter-Glo®, können keine weiteren Untersuchungen der Zellen mehr stattfinden.⁹⁸ Bei dem beobachteten positiven Effekt auf die Viabilität des Sphäroids ist davon auszugehen, dass es sich bei den verbliebenen Zellen um einen großen Anteil an CAF handelt. Dies liegt in der starken Resistenz der CAF gegenüber Lapatinib begründet. Um die These aufstellen zu können, dass eine positive Interaktion zwischen Tumorzellen und CAF stattgefunden hat, müsste die Viabilität unter $50 \mu\text{M}$ Lapatinib noch über 50% liegen.

In diesem Fall wäre ebenso die zusätzliche immunhistochemische Untersuchung von größerer Relevanz gewesen, um Regionen mit viablen Zellen differenzierter darstellen zu können.

Die Ergebnisse des Kokulturversuchs veranschaulichen dahingehend einige Schwierigkeiten bei der Findung eines geeigneten 3D-Modells. Durch die Bildung eines viablen Sphäroids ist die Modellentwicklung noch nicht abgeschlossen.

Zusätzlich muss bewiesen werden, dass die vorhandenen Kulturbedingungen das In-vivo-Verhalten in gewissem Maß repräsentieren können. Falls, wie im vorliegenden Versuch zur Kokultur, vermutlich keine Interaktion zwischen den Zellen stattfindet, so werden kaum zusätzliche Erkenntnisse gewonnen. Umso erfreulicher ist es, zu beobachten, dass auch simple 3D-Modelle, wie die Monokultur aus Zelllinien, zur Entwicklung gewisser Resistenzeigenschaften führen und neue Erkenntnisse liefern können. Viele Studien befassen sich mit dieser Thematik und dem Ziel, Medikamentenresistenzen anhand von 3D-Kultur Modellen vorhersagen zu können. Im Optimalfall wird hierfür die Kultur mit Zellen aus primärem Patientenmaterial gebildet.⁹⁹

4.7 Die Tumorstammzellnische

Im Rahmen der Betrachtung supportiver Zellen, wie CAF, sollte auch die These der Tumorstammzellnische thematisiert werden. Beim HNSCC wird davon ausgegangen, dass es neben normalen Tumorzellen auch eine Gruppe sogenannter Tumorstammzellen (CSC) gibt. Diese verfügen über ein größeres Potential für Medikamentenresistenzen, Metastasierung sowie die Proliferation von Tumorgewebe. Eine endgültige Definition dieser Stammzellen steht jedoch noch aus. Prince et al. waren die ersten, die CD44+-Zellen als Subpopulation mit stammzelltypischen Eigenschaften bei HNSCC beschrieben.¹⁰⁰ Die alleinige Betrachtung von CD44+ Zellen galt jedoch als nicht ausreichend, so dass weitere Marker, wie ALDH, zur Beschreibung der CSC im HNSCC herangezogen wurden.¹⁰¹ Heute wird vermutet, dass durch den Mangel eines singulären Markers die Kombination aus verschiedenen Oberflächenmarkern sowie exkludierenden Markern die beste Spezifität zur Definition von CSC bietet. Da dies jedoch mit einem größeren Zeit- und Kostenaufwand verbunden ist, werden für viele Untersuchungen auch heute noch Nachweise lediglich durch CD44 und/oder ALDH erbracht.^{102, 103}

Die These der Tumorstammzellnische geht davon aus, dass die CSC insbesondere in speziellen Mikroumgebungen vorzufinden sind, die sich aus regulären Tumorzellen, sowie CSC, Stromazellen, Endothelzellen und Immunzellen zusammensetzen.¹⁰⁴ Darüber hinaus bestehen spezielle Signalmechanismen, die von charakteristischer Bedeutung für die Nische sind. Einer dieser speziellen Signalmechanismen ist die SDF-1-CXCR4-Achse. Hierbei scheint eine erhöhte intratumorale Konzentration an SDF-1 mit einem Überlebensvorteil zu korrelieren.¹⁰⁵ Faber et al. konnten feststellen, dass die erhöhte SDF-1-Konzentration ein intratumorales Phänomen ist und nicht mit den Konzentrationen im Blut der Tumorpatienten korreliert.¹⁰⁶ Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass SDF-1 das Migrationsverhalten und die Podienformation von hämatopoetischen Stammzellen dosisabhängig stimuliert.¹⁰⁷

Aber auch viele weitere Signalkaskaden werden mit der Tumorstammzellnische in Verbindung gebracht, so auch die von Wachstumsfaktoren abhängige PI3K-AKT-mTOR-Signalkaskade. mTOR trägt, neben anderen Transkriptionsfaktoren, auch zur Stabilisierung des Hypoxia induced factor-1 alpha (HIF-1 α) bei. Dieser führt zu einer verstärkten Neoangiogenese und höheren Tumorgenität. Hierin zeigt sich die Kopplung von wachstumsfaktorabhängigen Signalkaskaden mit hypoxischen Umgebungsbedingungen in der Tumorstammzellnische. Diese hypoxischen Bedingungen sind allerdings durch die herkömmlichen 2D-Kulturformen nicht darstellbar.¹⁰⁸

Letztendlich ist es aufgrund der Heterogenität der Zellen und der multiplen Signalkaskaden schwierig, eine genaue Definition sowohl der CSC als auch der Tumorstammzellnische zu geben. Das Wissen über die Effektoren, wie die benötigten supportiven Zellen und eine hypoxische Zellumgebung, ermöglicht es jedoch, festzulegen welche Bedingungen für einen Nachbau der Tumorstammzellnische gegeben sein müssen. Daraus erschließt sich wiederum die Notwendigkeit einer komplexeren Kulturform, wie sie bspw. im Rahmen der 3D-Kultur zu erreichen ist.¹⁰⁴

4.8 Resistenzmechanismen gegenüber TKI

Die Beobachtung einer Resistenzentwicklung gegenüber Lapatinib in der 3D-Monokultur erfordert die Mitbetrachtung bereits bekannter Resistenzmechanismen gegenüber TKI. Viele dieser Mechanismen lassen sich anhand der verschiedenen Generationen von TKI erklären. Diese Entwicklungen sind vorwiegend auf die Verwendung beim NSCLC zurückzuführen, da hier EGFR-Inhibitoren am längsten klinisch eingesetzt werden. Die bekannten EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib sind TKI der ersten Generation. Sie werden durch ihre Reversibilität und die singuläre Wirkung auf den EGFR charakterisiert. Afatinib gehört aufgrund seiner pan-HER-Aktivität und Irreversibilität zur zweiten Generation der TKI. Die Entwicklung dieser zweiten Generation erfolgte, um Resistenzen gegenüber der ersten Generation an TKI zu umgehen. Diese Eigenschaft ist die wahrscheinlichste Ursache für den in den Versuchen weiterhin bestehenden Erfolg der Afatinib-Therapie. Als wesentliche Ursache einer Resistenz gegenüber diesen pan-HER-Inhibitoren gilt beim NSCLC die sogenannte Gatekeeper-Mutation T790M. Diese ist bei ca. 50% aller NSCLC-Patienten mit Resistenzen gegenüber Erst- und Zweitgenerationen an TKI nachweisbar. Die Resistenz wird dabei durch eine gesteigerte ATP-Affinität des Rezeptors vermittelt.¹⁰⁹ Neuere TKI der dritten Generation wurden daraufhin genau auf diesen Mechanismus zugeschnitten. So ist Osimertinib als TKI der dritten Generation selektiv auf die mutierte ATP-Bindetasche ausgerichtet.

Im Kontext des HNSCC veranschaulicht dies, dass der Erfolg der TKI beim NSCLC maßgeblich von charakteristischen Mutationen geprägt ist. Auch Imatinib, das bekannteste Beispiel für einen erfolgreichen Einsatz von TKI, ist in diesem Zusammenhang zu nennen. So ist die Wirksamkeit von Imatinib entscheidend von dem Vorhandensein der BCR-ABL-Translokation abhängig und somit ebenso durch eine Mutation getriggert.¹¹⁰

Vermutlich genügt es nicht, sich auf die Betrachtung der Expressions- und Aktivitätseigenschaften der Rezeptoren zu beschränken, wie es der Fall ist, wenn von einer bei bis zu 90% der HNSCC vorhandenen Überexpression des EGFR die Rede ist. Daher ist es erforderlich, die genetische Analyse hierbei nicht außer Acht zu lassen. Ein Ansatz im Rahmen der Untersuchung neuer Kulturformen könnte die vergleichende RNA-Sequenzanalyse von 2D- und 3D-Zellkulturen darstellen. Hinsichtlich der Mutationsrate des EGFR beim HNSCC gibt es bereits Studien, in denen, trotz einer hohen Überexpression, nur niedrige Mutationsraten nachzuweisen

waren. So konnten Chen et al. in einer systematischen Proteom-Analyse an 108 HNSCC-Patienten lediglich drei Mutationen im EGFR feststellen, von denen keine zu den bekannten Hotspot-Mutationen gerechnet werden konnte. Demgegenüber stand eine in 55 Fällen nachgewiesene Überaktivität des EGFR.¹¹¹ Diese Tatsache wird häufig als Grund für die schlechten Ansprechraten bezüglich einer EGFR-gerichteten Therapie herangezogen. Die Analyse weiterer Rezeptoren und Biomarker, die ein Ansprechen von TKI im HNSCC vorhersagen können, ist im Hinblick auf einen möglichen Therapieeinsatz demzufolge unerlässlich.¹¹²

4.9 Optimierung der 3D-Kultur

Die 3D-Zellkultur ist per se nicht neu, da die ersten Versuche unter 3D-Kulturbedingungen bis in die späten 1980er Jahre zurückreichen. Li et al. kultivierten Epithelzellen der Brustdrüse in einer Kollagenmatrix. Unter diesen Bedingungen waren die Epithelzellen dazu in der Lage, neue dreidimensionale Drüsengänge zu bilden, und besaßen im Gegensatz zur 2D-Zellkultur die Fähigkeit, Milch zu sezernieren.¹¹³ Seitdem werden die Vor- und Nachteile neuer Zellkulturformen diskutiert. Fest steht, dass bei der 3D-Zellkultur höhere Anforderungen bezüglich der Umgebungsbedingungen zu erfüllen sind. Die Bedeutung der richtigen Zellzahl und Wachstumsdauer wurde bereits in Abschnitt 4.5 dargelegt. Es gibt jedoch noch zahlreiche weitere Faktoren, die sich auf den Erfolg der Kultur auswirken.

Ein wesentlicher Aspekt ist die Wahl des richtigen Kulturmediums, in dem die Zellen wachsen sollen. In der vorliegenden Arbeit wurde entschieden, dieselben Kulturmedien zu verwenden, die auch für die 2D-Zellkultur der Zelllinien empfohlen wurden. Sobald jedoch mehrere Zellformen, wie in der 3D-Kokultur, verwendet werden sollen, besteht die Problematik, dass häufig unterschiedliche Medien für die verschiedenen Zellen empfohlen werden. Hier müssen insbesondere auch Zusätze, wie Aminosäuren und der Glukosegehalt beachtet werden. Mitunter sind Vorversuche zur Verträglichkeit verschiedener Medien notwendig. Ebenso kann sich das Zellmedium auf die Proliferationsrate der Zellen auswirken. Insbesondere in der 3D-Kokultur und Primärkulturen aus Patientenmaterial kann es hierbei zu ungewünscht starker Proliferation eines Zelltyps und gleichzeitiger Hemmung des Wachstums anderer Zellen im Sphäroid kommen. Häufig verwendet werden zudem künstliche Kulturmatrizes, bspw. aus Matrigel oder Alginate. In ihnen sollen die Zellen

analog zum Wachstum in der körpereigenen Extrazellulärmatrix aussprossen, weshalb sie insbesondere für Versuche zum Migrations- und Proliferationsverhalten geeignet sind. Die künstliche Extrazellulärmatrix genügt jedoch nicht, um Eigenschaften von Zellen des TME sowie die Signaltransduktion zwischen Tumorzellen und ihren supportiven Zellen nachzubilden.¹¹⁴

Ein wesentlicher Aspekt bei der Entwicklung einer 3D-Zellkultur ist zudem die Reproduktionsfähigkeit der Methode. Häufig lassen sich mit den gewählten Kulturbedingungen lediglich ausgewählte Zelllinien kultivieren oder es bilden sich nur sehr sporadisch stabile Sphäroide. Insbesondere beim Versuch der Primärkultur aus Patientenmaterial stellt dies oft eine große Hürde dar. Trotz intensiver Forschungsbemühungen existiert bisher noch keine Standardmethode, mit der sich konstant viable Sphäroide, aus primär entnommenem Karzinommaterial von HNSCC-Patienten, züchten lassen. Die Methode nach Kondo et al. stellt ein Beispiel für einen Versuch der Primärkultur von Kolonkarzinomen in 3D dar. Hierbei wird das Patientenmaterial zunächst zerkleinert, enzymatisch zu Einzelzellen isoliert und anschließend in eine Gelatine-haltige Matrix eingebettet.¹¹⁵ Tanaka et al. wendeten diese Methode bei ihren Versuchen mit HNSCC-Material an. Aber auch hier lag die Erfolgsrate für die Bildung von Sphäroiden lediglich bei 30,2%.¹¹⁶ Für einen routinemäßigen Einsatz in der Diagnostik und Resistenzforschung sind demzufolge zunächst weitere Optimierungen in der Kulturmethodik erforderlich.

Die Vorteile der Primärkultur aus Patientenmaterial sind dennoch vielfältig. So besitzen Tumorzelllinien zwar ebenso ihren Ursprung in primärem Patientenmaterial, neigen aber durch die häufige Passagierung zu genetischen Veränderungen und lassen sich nicht mehr verlässlich mit dem Ursprungsmaterial vergleichen.¹¹⁷ Darüber hinaus ist es für Tumorzelllinien charakteristisch, aus einer homogenen Masse an Tumorzellen, ohne supportive Stromazellen, zu bestehen. Bei der Primärkultur können diese supportiven Zellen hingegen im Optimalfall mitgezüchtet werden. Auch das Risiko der fehlenden Interaktion zwischen den Tumorzellen und den Stromazellen ist in der Primärkultur aufgrund des konformen Ursprungsgewebes als geringer einzuschätzen.

Im Hinblick auf die 3D-Zellkultur ist allerdings der Kostenfaktor nicht außer Acht zu lassen. So ist bei reiner Betrachtung der einzelnen Versuche die 2D-Kultur in jeder Hinsicht kostengünstiger und schneller. Somit lässt sich hiermit bei gleichen Kosten ein Vielfaches der Durchsatzrate erzeugen, was insbesondere bei der Entwicklung

neuer Medikamente ein bedeutendes Argument für die herkömmliche 2D-Kultur darstellt. Somit ergibt sich je nach Fragestellung und Zielsetzung eine andere Sichtweise auf ideale Kulturbedingungen.¹¹⁸ Auch die Möglichkeiten der 3D-Zellkultur unterscheiden sich in Abhängigkeit vom Verwendungszweck. So ist zwischen der präklinischen Untersuchung von Zellmaterial bezüglich bestimmter Eigenschaften, wie Signaltransduktion und Migrationsverhalten, und der patientennahen Testung zur Vorhersage von Medikamentenerfolgswahrscheinlichkeiten zu unterscheiden. Bei letzterer stellt wiederum die Kultur aus primärem Patientenmaterial den vielversprechendsten Ansatz dar. Dieser basiert auf der Vorstellung, nach operativer Tumorentnahme unter Verwendung des entnommenen Materials ein reliables Modell zu erzeugen, an dem verschiedene Formen der adjuvanten Chemotherapie getestet werden können. Diesem Vorgehen liegt in gewissem Maße das gleiche Prinzip zugrunde, das bei der Diagnostik mittels Blutkulturen zur Auswahl der geeigneten Antibiotikatherapie eingesetzt wird.⁹⁹

Für die erstgenannten präklinischen Untersuchungen könnten hingegen auch neuere Ansätze, wie das 3D-Bioprinting, an Bedeutung gewinnen.

4.10 Neue Methoden in der 3D-Kultur

Mit der Entwicklung neuer Technologien bestehen auch für die 3D-Zellkultur neue Möglichkeiten der Umsetzung. Ein Trend, der sich insbesondere in den letzten zehn Jahren entwickelt hat, ist das Verfahren des 3D-Bioprintings. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, das dem 3D-Druck ähnelt, der bereits in der Industrie für die Herstellung von Kleinteilen aus Kunststoff Verwendung findet. Die Zellen werden hierfür in einem viskosen Medium, wie bspw. Gelatine, gelöst und auf eine Matrix aus Kollagen aufgetragen. Wiederholte Phasen aus Matrixüberzug und anschließendem Auftragen verschiedener Zelltypen in der gewünschten Anordnung führen letztendlich zu einem 3D-Modell mit genau den Eigenschaften, die zuvor designt wurden. Mit Hinblick auf die Resistenzforschung von Karzinomzellen besteht das Ziel dieser neuen Methodik vorwiegend darin, die Architektur des TME so präzise wie möglich nachzubilden zu können. Es soll somit ermöglicht werden, neben Stromazellen, wie CAF, auch die Blut- und Lymphgefäßversorgung mit in das Modell zu integrieren. Dies würde einen enormen Fortschritt für die In-vitro-Zellkultur bedeuten. Es könnten somit, je nach Wunsch, über- und unterversorgte Areale erzeugt, sowie Mechanismen

der lymphogenen Metastasierung untersucht werden. In Abhängigkeit von der Reliabilität des Modells hätte die 3D-Kultur damit sogar das Potential, Tierversuche in gewissem Maße abzulösen.¹¹⁹

Es muss jedoch festgehalten werden, dass sich die Technologie des 3D-Bioprintings noch in einer sehr frühen Phase der Entwicklung befindet. Deshalb können die heutigen Modelle bei weitem noch nicht alle gewünschten Details repräsentieren. Die Gründe hierfür sind zum einen technischer und zum anderen biologischer Natur. Da es sich beim Nachbau des TME auf zellulärer Ebene um Abstände im Mikrometer-Bereich handelt, muss in naher Zukunft vermutlich noch auf einfachere Rekonstruktionen ausgewichen werden.¹²⁰ So muss bspw. ein komplexes Geflecht aus Kapillarstrombahnen zunächst durch geradlinige Tunnel aus Endothelzellen nachgebildet werden. Auch die Interaktionsfähigkeit der Zellen untereinander wird allein durch die Verwendung des 3D-Bioprintings nicht garantiert. Insbesondere komplexe Mechanismen, wie die Immunantwort, werden durch das reine Vorhandensein beliebiger T-Zellen oder Makrophagen noch nicht in ausreichendem Maße repräsentiert.¹²¹

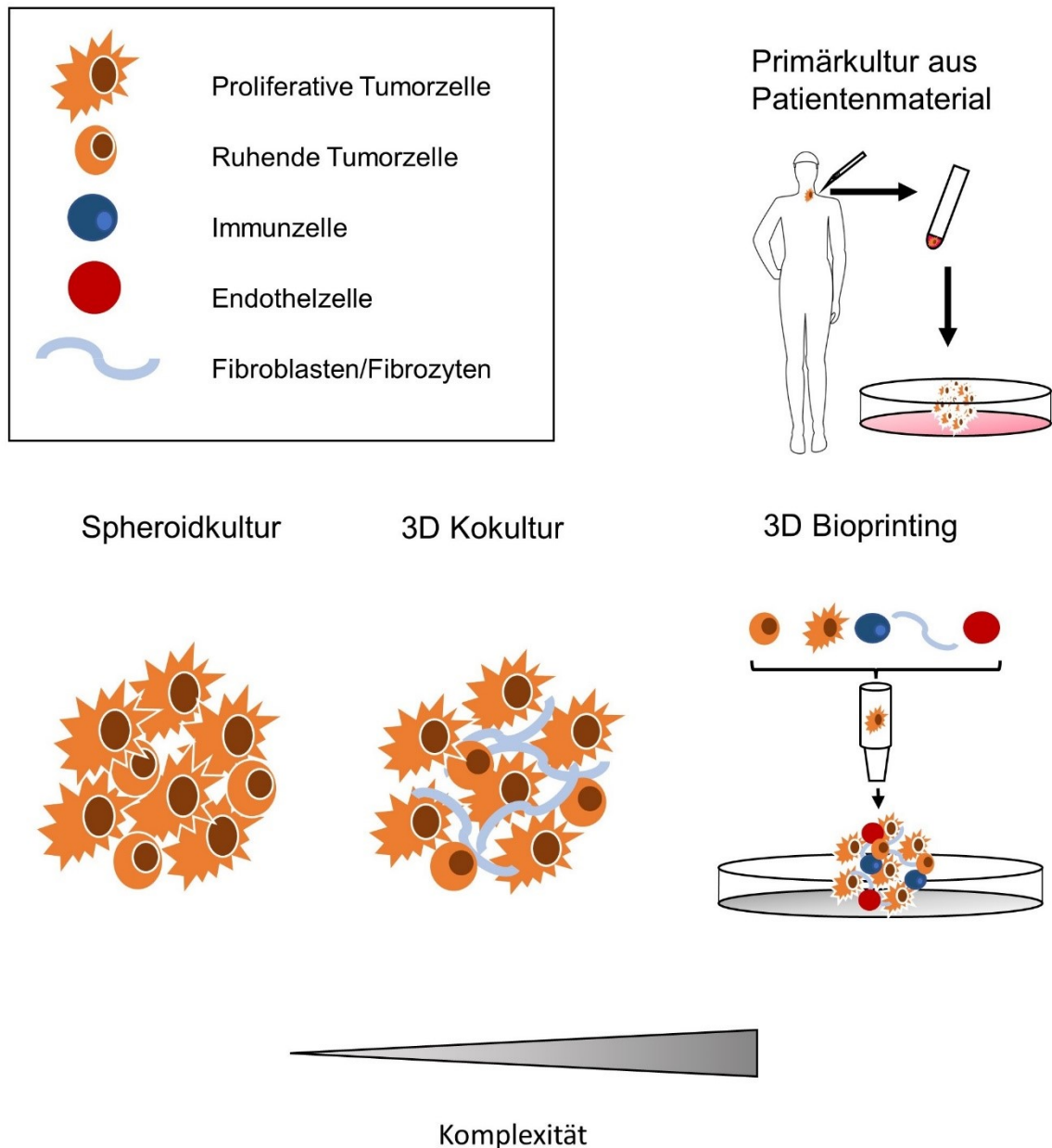


Abbildung 22: Auswahl verschiedener Methoden der 3D-Zellkultur, gestaffelt nach Komplexität und beinhaltetem Zellmaterial. Eigene Darstellung, Daten nach ¹²² und ⁷⁴

Dennoch erscheint das 3D-Bioprinting mit seinen multiplen Gestaltungsmöglichkeiten bezüglich komplexerer Interaktionen als wegweisende Technologie der Zukunft. Die Darstellung in Abbildung 22 suggeriert einen gleichen Grad an Komplexität für das 3D-Bioprinting und die Primärkultur aus Patientenmaterial. Dies liegt darin begründet, dass bei gleicher Anforderungsstellung an das Modell sowohl die Entwicklung als auch die Möglichkeiten der beiden Kulturformen als ähnlich eingeschätzt werden können. Darüber hinaus stehen die beiden Kulturformen nicht in Konkurrenz

zueinander, sondern die Integration von Zellen aus Patientenmaterial in die 3D-Bioprinting-Modelle ist hierbei eine explizierte Zielsetzung.⁷⁴

4.11 Limitationen der 3D-Kultur

Trotz der Fortschritte, die sich im Rahmen der letzten Jahrzehnte hinsichtlich neuer Zellkulturformen entwickelt haben, sollten auch deren Grenzen beleuchtet werden. In naher Zukunft werden Formen der 3D-Zellkultur mit hoher Wahrscheinlichkeit als Bindeglied zwischen herkömmlichen 2D-Kulturverfahren und Tierversuchsexperimenten genutzt werden. Trotz der ebenso nicht verlässlichen Übertragungsmöglichkeit von tierexperimentellen Daten auf den Menschen bilden Xenograft-Modelle einige Konditionen ab, für die es in heutigen 3D-Modellen noch keine Repräsentationsmöglichkeiten gibt. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei das natürliche Wachstumsverhalten in einem Organismus mit funktionierender Blutzirkulation. Trotz der Möglichkeit der Kokultur mit Endothelzellen, auch in Form von tubulären Systemen, fehlt auch mittels 3D-Bioprinting die Möglichkeit zur Einbindung in ein vorhandenes Kreislaufsystem. Dieses hat jedoch Einfluss auf den Stoffwechsel der Tumorzellen und insbesondere die Eingliederung von Immunzellen.¹²³

Die begrenzte Möglichkeit zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung ist dabei der Hauptgrund für eine limitierte Größe von Sphäroid-Modellen. Denn ab einer kritischen Größe, die in Abhängigkeit von den verwendeten Zellen und der Akzeptanz eines nekrotischen Kerns unterschiedlich ausfallen kann, sind die Sphäroide nicht mehr ausreichend viabel bzw. dazu fähig, weiter zu proliferieren.¹²⁴

¹²⁵ Dies entspricht jedoch nicht dem natürlichen Wachstum von Karzinomen, die durch das Einsproßen neuer Gefäße unter Signalwirkung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, dahingehend autark sind.¹²⁶

Somit ist es notwendig, diese Nachteile im Sinne von Entwicklungschancen zu nutzen. Einzelne Zellgruppen können dabei zunächst in verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten durch 3D-Kokultur-Modelle untersucht und neue Erkenntnisse bezüglich der Unterschiede zur 2D-Kultur gewonnen werden. Dies kann als wesentlicher Zwischenschritt hin zu einem Verständnis der kompletten Architektur des TME angesehen werden.

Nicht zuletzt aufgrund ethischer Bedenken besteht das Ziel darin, dass in Zukunft neue Modelle, wie die 3D-Zellkultur, einen Ersatz für Xenograft-Modelle darstellen. Hierfür werden noch weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet benötigt, sowie Studien, die eine Äquivalenz oder sogar Überlegenheit neuer Zellkulturmodelle gegenüber den bekannten Tierversuchsmodellen bestätigen. Bis dahin kann auf keine der beiden Kulturformen verzichtet werden. Dies gilt ebenso, wie bereits dargelegt, für die Ablösung von 2D-Zellkulturmodellen durch die teilweise überlegene 3D-Kultur.¹²⁷

4.12 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten signifikante Unterschiede im Ansprechverhalten von HNSCC-Zelllinien gegenüber TKI zwischen 2D- und 3D-Zellkulturen nachgewiesen werden. So bildet die Tumorzelllinie 11B in der Kultur in ULA-Platten stabile Sphäroide aus, die gegenüber dem TKI Lapatinib eine Resistenz mit einer $IC_{50} > 50 \mu M$ entwickelten. Als wahrscheinlichste Ursache hierfür konnte die unter 3D-Kulturbedingungen stärker ausgeprägte Phosphorylierung des HER3 festgemacht werden. Somit konnten die Überlebensvorteile mittels Zell-Zell-Interaktionen durch ein kosteneffizientes und einfach umzusetzendes Sphäroid-Modell aus Monokultur von HNSCC-Zelllinien veranschaulicht werden. Die stärkere Wirksamkeit des TKI Afatinib unter 3D-Zellkulturbedingungen geht dabei in gewissem Maße mit der erfolgsversprechenderen klinischen Studienlage von Afatinib gegenüber Lapatinib für die Therapie beim HNSCC einher. Dies ist vermutlich auf die breite Inhibition der gesamten ErbB-Rezeptor-Familie zurückzuführen. Dennoch konnte auch für Afatinib noch kein ausreichender Benefit gegenüber Standardtherapieregimen in klinischen Studien festgestellt werden, so dass aktuell kein TKI für die Therapie des HNSCC zugelassen ist. Die Zulassung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab steht dem in gewissem Maße gegenüber.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die bessere Wirksamkeit von Cetuximab gegenüber den TKI liegt in der sogenannten antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (engl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) begründet. Denn durch die Bindung der Antikörper an die überexprimierten Wachstumsfaktoren unterstützt Cetuximab indirekt die körpereigene Immunantwort auf das Karzinom. Für den regelhaften Einsatz von TKI fehlt es dem HNSCC hingegen an einer

ausgeprägten Mutationsfrequenz des EGFR. Ohne verlässliche Biomarker ist daher ein Einsatz von TKI beim HNSCC in naher Zukunft als nicht aussichtsreich einzuschätzen. Gleichzeitig wurde das geringe Ansprechen von Fibrozyten und CAF sowohl in 2D- als auch 3D-Zellkultur veranschaulicht. Die Einbindung in eine Kokultur mit Tumorzelllinien ließ sich zwar vollziehen, konnte jedoch in einem einfachen Setting, wie der simultanen Kultivierung in ULA-Platten, keinen Hinweis auf ein Interaktionsverhalten zwischen den Zellformen liefern.

Für die Untersuchung des Resistenzverhaltens und der Entwicklung neuer Therapiestrategien im Bereich der Karzinomforschung besteht der Bedarf an neuen Kulturformen, die eine gute Repräsentation des TME darstellen. Vielversprechend sind in dieser Hinsicht der Einsatz von primärem Patientenmaterial in der 3D-Zellkultur sowie 3D-Bioprinting-Verfahren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Plattenepithelkarzinomen der Kopf-/Halsregion (HNSCC) weisen eine verstärkte Expression des epidermalen Wachstumsrezeptors (EGFR) auf. Dieser gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Die Phosphorylierung dieser Rezeptoren lässt sich spezifisch mittels Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Lapatinib und Afatinib, inhibieren. Aktuell existieren jedoch noch keine klinischen Studien, die den Einsatz derartiger Tyrosinkinaseinhibitoren bei Patienten mit HNSCC rechtfertigen. Von den EGFR-gerichteten Therapieformen ist derzeit lediglich der monoklonale Antikörper Cetuximab beim HNSCC zugelassen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die systematische visuelle und Assay-basierte Viabilitätstestung mehrerer HNSCC-Zelllinien unter Therapie mit den TKI Lapatinib und Afatinib in 2D- und 3D- Zellkultur. Außerdem wurde eine vergleichende Western Blot Analyse von Zelllysaten aus therapierten und nicht-therapierten Zellen beider Zellkulturformen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Kokultur der Zelllinie UM-SCC 11B mit Fibroblasten untersucht. In der 3D-Zellkultur zeigte die Zelllinie UM-SCC 11B, im Gegensatz zur Zelllinie UM-SCC 22B, eine starke Resistenz ($IC_{50} > 50 \mu M$) gegenüber Lapatinib. Ebenso bestand eine stärkere Phosphorylierung des humanen epidermalen Wachstumsrezeptors 3 (HER3). Mittels Kokultur aus Zellen der Linie UM-SCC 11B und Fibroblasten konnte keine stärkere Resistenzentwicklung als in der 3D-Monokultur festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulichen, wie sich unter verschiedenen Zellkulturbedingungen das Resistenzverhalten und die Signaltransduktion von Karzinomzellen verändert. Eine stärkere Phosphorylierung des HER3 bietet dabei einen plausiblen Erklärungsansatz für die beobachtete Resistenz gegenüber Lapatinib. Bekannte Charakteristika der 3D-Zellkultur, wie das Vorhandensein von nährstoffunterversorgten Arealen, verstärkte Zell-Zell-Kontakte sowie veränderte Wachstumseigenschaften, sprechen für eine bessere Repräsentation der in vivo vorhandenen Bedingungen, als dies durch die konventionelle 2D-Zellkultur möglich ist. Die 3D-Zellkultur stellt daher eine wesentliche Schnittstelle zwischen 2D-Zellkultur und Xenograft-Modellen dar. Das zukünftige Ziel besteht darin, mittels neuer Technologien, wie dem 3D-Bioprinting, weitere Möglichkeiten zur Erforschung der Tumormikroumgebung und von Resistenzbildungen von Karzinomen zu schaffen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ferlay, J, Soerjomataram, I, Dikshit, R, Eser, S, Mathers, C, Rebelo, M, Parkin, DM, Forman, D, Bray, F: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136: E359-386, 2015.
2. Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2017.
3. Rahimi, S: HPV-related squamous cell carcinoma of oropharynx: a review. *J Clin Pathol*, 73: 624-629, 2020.
4. Rivera, C: Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 11884-11894, 2015.
5. Warnakulasuriya, S: Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*, 45: 309-316, 2009.
6. Jansen, L, Moratin, J, Waldmann, A, Zaoui, K, Holleczeck, B, Nennecke, A, Pritzkeleit, R, Plinkert, PK, Hoffmann, J, Arndt, V: Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome: Inzidenz, Mortalität und Überleben in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 64: 941-950, 2021.
7. Sturgis, EM, Wei, Q, Spitz, MR: Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol*, 31: 726-733, 2004.
8. Blot, WJ, McLaughlin, JK, Winn, DM, Austin, DF, Greenberg, RS, Preston-Martin, S, Bernstein, L, Schoenberg, JB, Stemhagen, A, Fraumeni, JF, Jr.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 48: 3282-3287, 1988.
9. Talamini, R, Bosetti, C, La Vecchia, C, Dal Maso, L, Levi, F, Bidoli, E, Negri, E, Pasche, C, Vaccarella, S, Barzan, L, Franceschi, S: Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control*, 13: 957-964, 2002.
10. Ndiaye, C, Mena, M, Alemany, L, Arbyn, M, Castellsagué, X, Laporte, L, Bosch, FX, de Sanjosé, S, Trottier, H: HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*, 15: 1319-1331, 2014.
11. Leemans, CR, Braakhuis, BJ, Brakenhoff, RH: The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 11: 9-22, 2011.
12. Robert Koch-Institut: *Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren*. 2018. Online: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/26/Art_01.html, Stand: 28.04.2020.

13. Jiarpinitnun, C, Larbcharoensub, N, Pattaranutaporn, P, Chureemas, T, Juengsamarn, J, Trachu, N, Lukerak, S, Chansriwong, P, Ngamphaiboon, N: Characteristics and Impact of HPV-Associated p16 Expression on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Thai Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 21: 1679-1687, 2020.
14. Bukhari, N, Joseph, JP, Hussain, SS, Khan, MA, Wakim, MJY, Yahya, EB, Arif, A, Saleem, A, Sharif, N: Prevalence of Human Papilloma Virus Sub Genotypes following Head and Neck Squamous Cell Carcinomas in Asian Continent, A Systematic Review Article. *Asian Pac J Cancer Prev*, 20: 3269-3277, 2019.
15. Velleuer, E, Dietrich, R: Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr*, 1: 9, 2014.
16. Maier, H, Gewelke, U, Dietz, A, Thamm, H, Heller, WD, Weidauer, H: [Laryngeal cancer and occupation--results of the Heidelberg laryngeal cancer study]. *Hno*, 40: 44-51, 1992.
17. Soskolne, CL, Jhangri, GS, Siemiatycki, J, Lakhani, R, Dewar, R, Burch, JD, Howe, GR, Miller, AB: Occupational exposure to sulfuric acid in southern Ontario, Canada, in association with laryngeal cancer. *Scand J Work Environ Health*, 18: 225-232, 1992.
18. Shah, FD, Begum, R, Vajaria, BN, Patel, KR, Patel, JB, Shukla, SN, Patel, PS: A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J Clin Biochem*, 26: 326-334, 2011.
19. Leemans, CR, Snijders, PJF, Brakenhoff, RH: The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18: 269-282, 2018.
20. Alamoud, KA, Kukuruzinska, MA: Emerging Insights into Wnt/ β -catenin Signaling in Head and Neck Cancer. *Journal of Dental Research*, 97: 665-673, 2018.
21. Polakis, P: Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, 2012.
22. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517: 576-582, 2015.
23. Lui, VW, Hedberg, ML, Li, H, Vangara, BS, Pendleton, K, Zeng, Y, Lu, Y, Zhang, Q, Du, Y, Gilbert, BR, Freilino, M, Sauerwein, S, Peyser, ND, Xiao, D, Diergaarde, B, Wang, L, Chiosea, S, Seethala, R, Johnson, JT, Kim, S, Duvvuri, U, Ferris, RL, Romkes, M, Nukui, T, Kwok-Shing Ng, P, Garraway, LA, Hammerman, PS, Mills, GB, Grandis, JR: Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*, 3: 761-769, 2013.
24. Xu, MJ, Johnson, DE, Grandis, JR: EGFR-targeted therapies in the post-genomic era. *Cancer Metastasis Rev*, 36: 463-473, 2017.
25. J.D. Brierley, MKG, and C. Wittekind,: *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition*, John Wiley & Sons, 2017.

26. Haughey, BH, Gates, GA, Arfken, CL, Harvey, J: Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 101: 105-112, 1992.
27. Keilholz, U: Kopf-/Halskarzinome. In: *Klinische Pharmakologie*. 2. Auflage ed. edited by WEHLING, M., Georg Thieme Verlag, 2011.
28. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF): *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms*. 2019. Online: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/017-076OLI_S3_Larynxkarzinom_2019-11.pdf, Stand: 23.04.2020.
29. Vermorken, JB, Mesia, R, Rivera, F, Remenar, E, Kaweckki, A, Rottey, S, Erfan, J, Zabolotnyy, D, Kienzer, HR, Cupissol, D, Peyrade, F, Benasso, M, Vynnychenko, I, De Raucourt, D, Bokemeyer, C, Schueler, A, Amellal, N, Hitt, R: Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*, 359: 1116-1127, 2008.
30. Concu, R, Cordeiro, M: Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Curr Top Med Chem*, 18: 192-198, 2018.
31. Iqbal, MS, Wilkinson, D, Tin, A, Bossi, P, Gradwell-Nelson, L, Kovarik, J, O'Hara, J, Kelly, C: Cetuximab in the management of nasopharyngeal carcinoma - a narrative review. *J Laryngol Otol*: 1-13, 2019.
32. Seiwert, TY, Burtneß, B, Mehra, R, Weiss, J, Berger, R, Eder, JP, Heath, K, McClanahan, T, Lunceford, J, Gause, C, Cheng, JD, Chow, LQ: Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*, 17: 956-965, 2016.
33. Ferris, RL, Blumenschein, G, Jr., Fayette, J, Guigay, J, Colevas, AD, Licitra, L, Harrington, K, Kasper, S, Vokes, EE, Even, C, Worden, F, Saba, NF, Iglesias Docampo, LC, Haddad, R, Rordorf, T, Kiyota, N, Tahara, M, Monga, M, Lynch, M, Geese, WJ, Kopit, J, Shaw, JW, Gillison, ML: Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The New England journal of medicine*, 375: 1856-1867, 2016.
34. Scaltriti, M, Baselga, J: The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12: 5268-5272, 2006.
35. Grandis, JR, Tweardy, DJ: Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer research*, 53: 3579-3584, 1993.
36. Marshall, J: Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer*, 107: 1207-1218, 2006.

37. Normanno, N, De Luca, A, Bianco, C, Strizzi, L, Mancino, M, Maiello, MR, Carotenuto, A, De Feo, G, Caponigro, F, Salomon, DS: Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366: 2-16, 2006.
38. Ren, R: Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 5: 172-183, 2005.
39. Krause, DS, Van Etten, RA: Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*, 353: 172-187, 2005.
40. Vermorken, JB, Trigo, J, Hitt, R, Koralewski, P, Diaz-Rubio, E, Rolland, F, Knecht, R, Amellal, N, Schueler, A, Baselga, J: Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *J Clin Oncol*, 25: 2171-2177, 2007.
41. Martins, RG, Parvathaneni, U, Bauman, JE, Sharma, AK, Raez, LE, Papagikos, MA, Yunus, F, Kurland, BF, Eaton, KD, Liao, JJ, Mendez, E, Futran, N, Wang, DX, Chai, X, Wallace, SG, Austin, M, Schmidt, R, Hayes, DN: Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31: 1415-1421, 2013.
42. Agarwal, V, Subash, A, Nayar, RC, Rao, V: Is EGFR really a therapeutic target in head and neck cancers? *J Surg Oncol*, 119: 685-686, 2019.
43. Xu, MJ, Johnson, DE, Grandis, JR: EGFR-targeted therapies in the post-genomic era. *Cancer Metastasis Rev*, 36: 463-473, 2017.
44. Cohen, EE, Halpern, AB, Kasza, K, Kocherginsky, M, Williams, R, Vokes, EE: Factors associated with clinical benefit from epidermal growth factor receptor inhibitors in recurrent and metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*, 45: e155-160, 2009.
45. Argiris, A, Karamouzis, MV, Raben, D, Ferris, RL: Head and neck cancer. *Lancet*, 371: 1695-1709, 2008.
46. Costa, EC, Moreira, AF, de Melo-Diogo, D, Gaspar, VM, Carvalho, MP, Correia, IJ: 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology advances*, 34: 1427-1441, 2016.
47. Koledova, Z: 3D Cell Culture: An Introduction. *Methods Mol Biol*, 1612: 1-11, 2017.
48. Ayuso, JM, Vitek, R, Swick, AD, Skala, MC, Wisinski, KB, Kimple, RJ, Lambert, PF, Beebe, DJ: Effects of culture method on response to EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep*, 9: 12480, 2019.
49. Chen, SMY, Krinsky, AL, Woolaver, RA, Wang, X, Chen, Z, Wang, JH: Tumor immune microenvironment in head and neck cancers. *Mol Carcinog*, 59: 766-774, 2020.

50. Luo, X, Fong, ELS, Zhu, C, Lin, QXX, Xiong, M, Li, A, Li, T, Benoukraf, T, Yu, H, Liu, S: Hydrogel-based colorectal cancer organoid co-culture models. *Acta Biomater*, 132: 461-472, 2021.
51. Park, W, Bae, M, Hwang, M, Jang, J, Cho, DW, Yi, HG: 3D Cell-Printed Hypoxic Cancer-on-a-Chip for Recapitulating Pathologic Progression of Solid Cancer. *J Vis Exp*, 2021.
52. Paracelsus: Theophrast Paracelsus: Werke. Bd. 2. 508-513, 1965.
53. Kondo, N, Tsukuda, M, Ishiguro, Y, Kimura, M, Fujita, K, Sakakibara, A, Takahashi, H, Toth, G, Matsuda, H: Antitumor effects of lapatinib (GW572016), a dual inhibitor of EGFR and HER-2, in combination with cisplatin or paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology reports*, 23: 957-963, 2010.
54. Young, NR, Soneru, C, Liu, J, Grushko, TA, Hardeman, A, Olopade, OI, Baum, A, Solca, F, Cohen, EE: Afatinib efficacy against squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines in vitro and in vivo. *Target Oncol*, 10: 501-508, 2015.
55. Brands, RC, De Donno, F, Knierim, ML, Steinacker, V, Hartmann, S, Seher, A, Kübler, AC, Müller-Richter, UDA: Multi-kinase inhibitors and cisplatin for head and neck cancer treatment in vitro. *Oncology letters*, 18: 2220-2231, 2019.
56. Brands, RC, Knierim, LM, De Donno, F, Steinacker, V, Hartmann, S, Seher, A, Kübler, AC, Müller-Richter, UDA: Targeting VEGFR and FGFR in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Oncology reports*, 38: 1877-1885, 2017.
57. Kang, ES, Oh, MA, Lee, SA, Kim, TY, Kim, SH, Gotoh, N, Kim, YN, Lee, JW: EGFR phosphorylation-dependent formation of cell-cell contacts by Ras/Erks cascade inhibition. *Biochim Biophys Acta*, 1773: 833-843, 2007.
58. Adrian, G, Ceberg, C, Carneiro, A, Ekblad, L: Rescue Effect Inherited in Colony Formation Assays Affects Radiation Response. *Radiat Res*, 189: 44-52, 2018.
59. Hanahan, D, Weinberg, RA: The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
60. Ediriweera, MK, Tennekoon, KH, Samarakoon, SR: In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. *J Appl Toxicol*, 39: 38-71, 2019.
61. Zhang, P, Song, E, Jiang, M, Song, Y: Celecoxib and Afatinib synergistic enhance radiotherapy sensitivity on human non-small cell lung cancer A549 cells. *Int J Radiat Biol*, 97: 170-178, 2021.
62. Harvey, RD, Adams, VR, Beardslee, T, Medina, P: Afatinib for the treatment of EGFR mutation-positive NSCLC: A review of clinical findings. *J Oncol Pharm Pract*, 26: 1461-1474, 2020.
63. Jensen, C, Teng, Y: Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*, 7: 33, 2020.

64. Lee, HJ, Shin, S, Kang, J, Han, KC, Kim, YH, Bae, JW, Park, KH: HSP90 Inhibitor, 17-DMAG, Alone and in Combination with Lapatinib Attenuates Acquired Lapatinib-Resistance in ER-positive, HER2-Overexpressing Breast Cancer Cell Line. *Cancers (Basel)*, 12, 2020.
65. Bergkvist, GT, Argyle, DJ, Pang, LY, Muirhead, R, Yool, DA: Studies on the inhibition of feline EGFR in squamous cell carcinoma: enhancement of radiosensitivity and rescue of resistance to small molecule inhibitors. *Cancer Biol Ther*, 11: 927-937, 2011.
66. Melissaridou, S, Wiechec, E, Magan, M, Jain, MV, Chung, MK, Farnebo, L, Roberg, K: The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int*, 19: 16-16, 2019.
67. Krishnan, MA, Yadav, K, Chelvam, V: Agarose Micro-Well Platform for Rapid Generation of Homogenous 3D Tumor Spheroids. *Curr Protoc*, 1: e199, 2021.
68. Chioni, AM, Bajwa, RT, Grose, R: 3D Organotypic Culture Model to Study Components of ERK Signaling. *Methods Mol Biol*, 1487: 255-267, 2017.
69. Dominijanni, AJ, Devarasetty, M, Forsythe, SD, Votanopoulos, KI, Soker, S: Cell Viability Assays in Three-Dimensional Hydrogels: A Comparative Study of Accuracy. *Tissue Eng Part C Methods*, 27: 401-410, 2021.
70. Phan, TG, Croucher, PI: The dormant cancer cell life cycle. *Nat Rev Cancer*, 20: 398-411, 2020.
71. Nunes, AS, Barros, AS, Costa, EC, Moreira, AF, Correia, IJ: 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng*, 116: 206-226, 2019.
72. Ravi, M, Paramesh, V, Kaviya, SR, Anuradha, E, Solomon, FD: 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*, 230: 16-26, 2015.
73. Ryu, NE, Lee, SH, Park, H: Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 8, 2019.
74. Boucherit, N, Gorvel, L, Olive, D: 3D Tumor Models and Their Use for the Testing of Immunotherapies. *Front Immunol*, 11: 603640, 2020.
75. Sabbah, DA, Hajjo, R, Sweidan, K: Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 20: 815-834, 2020.
76. Song, X, Fan, PD, Bantikassegn, A, Guha, U, Threadgill, DW, Varmus, H, Politi, K: ERBB3-independent activation of the PI3K pathway in EGFR-mutant lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, 75: 1035-1045, 2015.
77. Temraz, S, Mukherji, D, Shamseddine, A: Dual targeting of HER3 and EGFR in colorectal tumors might overcome anti-EGFR resistance. *Crit Rev Oncol Hematol*, 101: 151-157, 2016.

78. Kawakami, H, Okamoto, I, Yonesaka, K, Okamoto, K, Shibata, K, Shinkai, Y, Sakamoto, H, Kitano, M, Tamura, T, Nishio, K, Nakagawa, K: The anti-HER3 antibody patritumab abrogates cetuximab resistance mediated by heregulin in colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 5: 11847-11856, 2014.
79. Watanabe, S, Yonesaka, K, Tanizaki, J, Nonagase, Y, Takegawa, N, Haratani, K, Kawakami, H, Hayashi, H, Takeda, M, Tsurutani, J, Nakagawa, K: Targeting of the HER2/HER3 signaling axis overcomes ligand-mediated resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Cancer Med*, 8: 1258-1268, 2019.
80. Wang, D, Qian, G, Zhang, H, Magliocca, KR, Nannapaneni, S, Amin, AR, Rossi, M, Patel, M, El-Deiry, M, Wadsworth, JT, Chen, Z, Khuri, FR, Shin, DM, Saba, NF, Chen, ZG: HER3 Targeting Sensitizes HNSCC to Cetuximab by Reducing HER3 Activity and HER2/HER3 Dimerization: Evidence from Cell Line and Patient-Derived Xenograft Models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23: 677-686, 2017.
81. Sequist, LV, Lopez-Chavez, A, Doebele, RC, Gray, JE, Harb, WA, Modiano, MR, Jackman, DM, Baggstrom, MQ, Atmaca, A, Felip, E, Provencio, M, Cobo, M, Kripas, CJ, MacBeath, G, Czibere, AG, Cho, BC, Park, K, Shepherd, FA: A randomized phase 2 trial of MM-121, a fully human monoclonal antibody targeting ErbB3, in combination with erlotinib in EGFR wild-type NSCLC patients. *Journal of Clinical Oncology*, 32: 8051-8051, 2014.
82. van Lengerich, B, Agnew, C, Puchner, EM, Huang, B, Jura, N: EGF and NRG induce phosphorylation of HER3/ERBB3 by EGFR using distinct oligomeric mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: E2836-e2845, 2017.
83. Akula, SM, Abrams, SL, Steelman, LS, Emma, MR, Augello, G, Cusimano, A, Azzolina, A, Montalto, G, Cervello, M, McCubrey, JA: RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets*, 23: 915-929, 2019.
84. Vitale, I, Manic, G, Coussens, LM, Kroemer, G, Galluzzi, L: Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab*, 30: 36-50, 2019.
85. Habanjar, O, Diab-Assaf, M, Caldefie-Chezet, F, Delort, L: 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci*, 22, 2021.
86. Sahai, E, Astsaturov, I, Cukierman, E, DeNardo, DG, Egeblad, M, Evans, RM, Fearon, D, Greten, FR, Hingorani, SR, Hunter, T, Hynes, RO, Jain, RK, Janowitz, T, Jorgensen, C, Kimmelman, AC, Kolonin, MG, Maki, RG, Powers, RS, Puré, E, Ramirez, DC, Scherz-Shouval, R, Sherman, MH, Stewart, S, Tlsty, TD, Tuveson, DA, Watt, FM, Weaver, V, Weeraratna, AT, Werb, Z: A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*, 20: 174-186, 2020.

87. Biffi, G, Tuveson, DA: Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev*, 101: 147-176, 2021.
88. Davies, AM, Ho, C, Lara, PN, Jr., Mack, P, Gumerlock, PH, Gandara, DR: Pharmacodynamic separation of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 7: 385-388, 2006.
89. Luckert, C, Schulz, C, Lehmann, N, Thomas, M, Hofmann, U, Hammad, S, Hengstler, JG, Braeuning, A, Lampen, A, Hessel, S: Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. *Arch Toxicol*, 91: 393-406, 2017.
90. Zhang, W, Li, C, Baguley, BC, Zhou, F, Zhou, W, Shaw, JP, Wang, Z, Wu, Z, Liu, J: Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. *Anal Biochem*, 515: 47-54, 2016.
91. Ingargiola, M, Runge, R, Heldt, JM, Freudenberg, R, Steinbach, J, Cordes, N, Baumann, M, Kotzerke, J, Brockhoff, G, Kunz-Schughart, LA: Potential of a Cetuximab-based radioimmunotherapy combined with external irradiation manifests in a 3-D cell assay. *Int J Cancer*, 135: 968-980, 2014.
92. Braunholz, D, Saki, M, Niehr, F, Öztürk, M, Borràs Puértolas, B, Konschak, R, Budach, V, Tinhofer, I: Spheroid Culture of Head and Neck Cancer Cells Reveals an Important Role of EGFR Signalling in Anchorage Independent Survival. *PLoS One*, 11: e0163149, 2016.
93. De Wever, O, Demetter, P, Mareel, M, Bracke, M: Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*, 123: 2229-2238, 2008.
94. Petersen, OW, Nielsen, HL, Gudjonsson, T, Villadsen, R, Rank, F, Niebuhr, E, Bissell, MJ, Rønnov-Jessen, L: Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol*, 162: 391-402, 2003.
95. Sharbeen, G, McCarroll, JA, Akerman, A, Kopecky, C, Youkhana, J, Kokkinos, J, Holst, J, Boyer, C, Erkan, M, Goldstein, D, Timpson, P, Cox, TR, Pereira, BA, Chitty, JL, Fey, SK, Najumudeen, AK, Campbell, AD, Sansom, OJ, Ignacio, RMC, Naim, S, Liu, J, Russia, N, Lee, J, Chou, A, Johns, A, Gill, AJ, Gonzales-Aloy, E, Gebiski, V, Guan, YF, Pajic, M, Turner, N, Apte, MV, Davis, TP, Morton, JP, Haghighi, KS, Kasparian, J, McLean, BJ, Setargew, YF, Phillips, PA: Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Determine Response to SLC7A11 Inhibition. *Cancer Res*, 81: 3461-3479, 2021.
96. Chen, Y, McAndrews, KM, Kalluri, R: Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol*, 18: 792-804, 2021.
97. Achilli, TM, McCalla, S, Meyer, J, Tripathi, A, Morgan, JR: Multilayer spheroids to quantify drug uptake and diffusion in 3D. *Mol Pharm*, 11: 2071-2081, 2014.
98. Haga, K, Yamazaki, M, Maruyama, S, Kawaharada, M, Suzuki, A, Hoshikawa, E, Chan, NN, Funayama, A, Mikami, T, Kobayashi, T, Izumi, K, Tanuma, JI:

- Crosstalk between oral squamous cell carcinoma cells and cancer-associated fibroblasts via the TGF- β /SOX9 axis in cancer progression. *Transl Oncol*, 14: 101236, 2021.
99. Pasch, CA, Favreau, PF, Yueh, AE, Babiarz, CP, Gillette, AA, Sharick, JT, Karim, MR, Nickel, KP, DeZeeuw, AK, Sprackling, CM, Emmerich, PB, DeStefanis, RA, Pitera, RT, Payne, SN, Korkos, DP, Clipson, L, Walsh, CM, Miller, D, Carchman, EH, Burkard, ME, Lemmon, KK, Matkowskyj, KA, Newton, MA, Ong, IM, Bassetti, MF, Kimple, RJ, Skala, MC, Deming, DA: Patient-Derived Cancer Organoid Cultures to Predict Sensitivity to Chemotherapy and Radiation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25: 5376-5387, 2019.
100. Prince, ME, Sivanandan, R, Kaczorowski, A, Wolf, GT, Kaplan, MJ, Dalerba, P, Weissman, IL, Clarke, MF, Ailles, LE: Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 973-978, 2007.
101. Clay, MR, Tabor, M, Owen, JH, Carey, TE, Bradford, CR, Wolf, GT, Wicha, MS, Prince, ME: Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head & neck*, 32: 1195-1201, 2010.
102. Allegra, E, Trapasso, S, Pisani, D, Puzzo, L: The role of BMI1 as a biomarker of cancer stem cells in head and neck cancer: a review. *Oncology*, 86: 199-205, 2014.
103. Motegi, A, Fujii, S, Zenda, S, Arahira, S, Tahara, M, Hayashi, R, Akimoto, T: Impact of Expression of CD44, a Cancer Stem Cell Marker, on the Treatment Outcomes of Intensity Modulated Radiation Therapy in Patients With Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 94: 461-468, 2016.
104. He, J, Xiong, L, Li, Q, Lin, L, Miao, X, Yan, S, Hong, Z, Yang, L, Wen, Y, Deng, X: 3D modeling of cancer stem cell niche. *Oncotarget*, 9: 1326-1345, 2018.
105. Clatot, F, Picquenot, JM, Choussy, O, Gouéran, S, Moldovan, C, Schultheis, D, Cornic, M, François, A, Blot, E, Laberge-Le-Couteulx, S: Intratumoural level of SDF-1 correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 47: 1062-1068, 2011.
106. Faber, A, Goessler, UR, Hoermann, K, Schultz, JD, Umbreit, C, Stern-Straeter, J: SDF-1-CXCR4 axis: cell trafficking in the cancer stem cell niche of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology reports*, 29: 2325-2331, 2013.
107. Faber, A, Roderburg, C, Wein, F, Saffrich, R, Seckinger, A, Horsch, K, Diehlmann, A, Wong, D, Bridger, G, Eckstein, V, Ho, AD, Wagner, W: The many facets of SDF-1 α , CXCR4 agonists and antagonists on hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Biotechnol*, 2007: 26065, 2007.

108. Ju, F, Atyah, MM, Horstmann, N, Gul, S, Vago, R, Bruns, CJ, Zhao, Y, Dong, QZ, Ren, N: Characteristics of the cancer stem cell niche and therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther*, 13: 233, 2022.
109. Yun, CH, Mengwasser, KE, Toms, AV, Woo, MS, Greulich, H, Wong, KK, Meyerson, M, Eck, MJ: The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 2070-2075, 2008.
110. Cohen, P, Cross, D, Jänne, PA: Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat Rev Drug Discov*, 20: 551-569, 2021.
111. Huang, C, Chen, L, Savage, SR, Egeuz, RV, Dou, Y, Li, Y, da Veiga Leprevost, F, Jaehnig, EJ, Lei, JT, Wen, B, Schnaubelt, M, Krug, K, Song, X, Cieřlik, M, Chang, HY, Wyczalkowski, MA, Li, K, Colaprico, A, Li, QK, Clark, DJ, Hu, Y, Cao, L, Pan, J, Wang, Y, Cho, KC, Shi, Z, Liao, Y, Jiang, W, Anurag, M, Ji, J, Yoo, S, Zhou, DC, Liang, WW, Wendl, M, Vats, P, Carr, SA, Mani, DR, Zhang, Z, Qian, J, Chen, XS, Pico, AR, Wang, P, Chinnaiyan, AM, Ketchum, KA, Kinsinger, CR, Robles, AI, An, E, Hiltke, T, Mesri, M, Thiagarajan, M, Weaver, AM, Sikora, AG, Lubiński, J, Wierzbicka, M, Wiznerowicz, M, Satpathy, S, Gillette, MA, Miles, G, Ellis, MJ, Omenn, GS, Rodriguez, H, Boja, ES, Dhanasekaran, SM, Ding, L, Nesvizhskii, AI, El-Naggar, AK, Chan, DW, Zhang, H, Zhang, B: Proteogenomic insights into the biology and treatment of HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell*, 39: 361-379.e316, 2021.
112. Martinez-Useros, J, Garcia-Foncillas, J: The challenge of blocking a wider family members of EGFR against head and neck squamous cell carcinomas. *Oral oncology*, 51: 423-430, 2015.
113. Li, ML, Aggeler, J, Farson, DA, Hatier, C, Hassell, J, Bissell, MJ: Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 136-140, 1987.
114. Charbonier, F, Indana, D, Chaudhuri, O: Tuning Viscoelasticity in Alginate Hydrogels for 3D Cell Culture Studies. *Curr Protoc*, 1: e124, 2021.
115. Kondo, J, Endo, H, Okuyama, H, Ishikawa, O, Iishi, H, Tsujii, M, Ohue, M, Inoue, M: Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 6235-6240, 2011.
116. Tanaka, N, Osman, AA, Takahashi, Y, Lindemann, A, Patel, AA, Zhao, M, Takahashi, H, Myers, JN: Head and neck cancer organoids established by modification of the CTOS method can be used to predict in vivo drug sensitivity. *Oral oncology*, 87: 49-57, 2018.

117. Li, J, Settivari, RS, LeBaron, MJ: Genetic instability of in vitro cell lines: Implications for genetic toxicity testing. *Environ Mol Mutagen*, 60: 559-562, 2019.
118. Zoetemelk, M, Rausch, M, Colin, DJ, Dormond, O, Nowak-Sliwinska, P: Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Sci Rep*, 9: 7103, 2019.
119. Zhang, YS, Duchamp, M, Oklu, R, Ellisen, LW, Langer, R, Khademhosseini, A: Bioprinting the Cancer Microenvironment. *ACS Biomater Sci Eng*, 2: 1710-1721, 2016.
120. Liu, F, Liu, C, Chen, Q, Ao, Q, Tian, X, Fan, J, Tong, H, Wang, X: Progress in organ 3D bioprinting. *Int J Bioprint*, 4: 128, 2018.
121. Jin, Z, Li, X, Zhang, X, DeSousa, P, Xu, T, Wu, A: Engineering the fate and function of human T-Cells via 3D bioprinting. *Biofabrication*, 13, 2021.
122. Affolter, A, Lammert, A, Kern, J, Scherl, C, Rotter, N: Precision Medicine Gains Momentum: Novel 3D Models and Stem Cell-Based Approaches in Head and Neck Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 9: 666515, 2021.
123. Hidalgo, M, Amant, F, Biankin, AV, Budinská, E, Byrne, AT, Caldas, C, Clarke, RB, de Jong, S, Jonkers, J, Mælandsmo, GM, Roman-Roman, S, Seoane, J, Trusolino, L, Villanueva, A: Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov*, 4: 998-1013, 2014.
124. Tse, HM, Gardner, G, Dominguez-Bendala, J, Fraker, CA: The Importance of Proper Oxygenation in 3D Culture. *Front Bioeng Biotechnol*, 9: 634403, 2021.
125. Singh, SK, Abbas, S, Saxena, AK, Tiwari, S, Sharma, LK, Tiwari, M: Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome. *Biotechniques*, 69: 333-338, 2020.
126. Apte, RS, Chen, DS, Ferrara, N: VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 176: 1248-1264, 2019.
127. Aboulkheyr Es, H, Montazeri, L, Aref, AR, Vosough, M, Baharvand, H: Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends Biotechnol*, 36: 358-371, 2018.

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Heid, Jonas Elias
Geburtsdatum: 07.03.1996
Geburtsort: Heidelberg
Familienstand: ledig
Vater: Werner Heid
Mutter: Verena Heid (geb. Hafner)

SCHULISCHER WERDEGANG

2006 – 2014 Adolf-Schmitthenner-Gymnasium Neckarbischofsheim
02.06.2014 Allgemeine Hochschulreife

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

SS 2015 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
30.03.2017 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
2017 – 2021 Hauptstudium an der Medizinischen Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg
15.04.2021 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
30.05.2022 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt mein Dank den Personen, die durch ihren Beitrag maßgeblich am Erfolg dieser Dissertation beteiligt waren:

Meiner Doktormutter **Prof. Dr. med. Anne Lammert** für die Überlassung des Promotionsthemas, das Teilen der Begeisterung für die Thematik und die zügige Rückmeldung zu jeglichen organisatorischen Anliegen.

Meinem Betreuer und Laborleiter Herrn **Dr. Johann Kern** für die Teilhabe an der Projektplanung im Labor, die kurze Anbindung und den unkomplizierten Austausch bezüglich aller Datensätze.

Frau **Prof. Dr. med. N. Rotter** für die Überlassung der Räumlichkeiten im Labor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie Mannheim, sowie die Finanzierung des Projekts.

Besonderen Dank an **Petra Prohaska** für die Einarbeitung im Labor und die helfende Hand, wann immer dies während der Durchführung der Experimente notwendig war.

An meine Eltern **Werner Heid** und **Verena Heid** für das kontinuierliche Vertrauen und die Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Abschließend noch einen herzlichen Dank an meine Partnerin **Caroline Elsasser** für die unzähligen aufbauenden Worte und die Motivation während der gesamten Promotionszeit.