

Aus der
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Wirkung des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235
auf die Kombination von Cisplatin und Bestrahlung
bei HPV-negativen und -positiven Plattenepithelkarzinom-Zellen
der Kopf-Hals-Region**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Carolin Gröbner
aus Lich

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 28.06.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner
Referent:	Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. Robert Mandic
2. Korreferent:	Herr Prof. Dr. Thomas Wündisch

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	8
1.1	Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region	8
1.1.1	<i>Einführung</i>	8
1.1.2	<i>Ätiologie und Epidemiologie</i>	8
1.1.3	<i>Tumorgenese HPV-negativer und -positiver HNSCC</i>	8
1.2	Therapie	10
1.3	Strahlentherapie	10
1.3.1	<i>DNA-Schädigung</i>	10
1.3.2	<i>DNA-Reparatur</i>	11
1.4	Radiochemotherapie	12
1.4.1	<i>Cisplatin</i>	13
1.4.2	<i>Reparatur der Cisplatin-Addukte</i>	13
1.4.3	<i>Cisplatin in der Krebstherapie</i>	13
1.4.4	<i>Wirkung von Cisplatin auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit</i>	15
1.5	Prognose von HPV-negativen und -positiven HNSCC	16
1.6	De-Eskalation beim HPV-positiven HNSCC	16
1.7	Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg	17
1.8	Dualer PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235	19
1.9	Fragestellungen der Arbeit	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material	22
2.1.1	<i>Geräte</i>	22
2.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	23
2.1.3	<i>Software</i>	23
2.1.4	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	23
2.1.5	<i>Allgemeine Puffer und Reagenzien</i>	24
2.1.6	<i>Zellkulturmedium</i>	24
2.1.7	<i>Zellkulturlinien</i>	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	<i>Zellkultur</i>	25
2.2.2	<i>Bestrahlung</i>	26
2.2.3	<i>Behandlung der Zellen</i>	26
2.2.4	<i>Koloniebildungstest</i>	27
2.2.5	<i>Statistische Auswertung</i>	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Wirkung von Cisplatin	29
3.2	Verstärkung von CDDP durch BEZ235	30
3.3	Verstärkung von CDDP durch BEZ235 in Abhängigkeit vom HPV-Status	32
3.4	Wirkung von BEZ235 auf die Kombination aus CDDP und Strahlung	33
4	DISKUSSION	38
4.1	Cisplatinempfindlichkeit der HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen	38
4.2	Einfluss von BEZ235 auf die Cisplatinempfindlichkeit	40
4.3	Wirkung von BEZ235 auf die Kombination aus CDDP und Strahlung	40
4.4	Klinische Relevanz und Ausblick	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	43
6	SUMMARY	45
7	LITERATURVERZEICHNIS	47
8	ANHANG	53
8.1	Curriculum Vitae	53
8.2	Liste der Publikationen	55
8.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer	55
8.4	Danksagung	56
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	57

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	
Abb. 1: Deregulation des Zellzyklus durch E6 und E7 bei Transfektion mit HPV	9
Abb. 2: Cisplatin, Aktivierung und DNA-Schädigung	12
Abb. 3: Radiochemotherapie (RCT) mit Cisplatin bei fortgeschrittenem HNSCC	14
Abb. 4: PI3K/Akt/mTOR-Signalweg	18
Abb. 5: Strahlensensibilisierung durch Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges	20
Abb. 6: Cisplatinempfindlichkeit von HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen	29
Abb. 7: Verstärkung von CDDP durch BEZ235	30
Abb. 8: Verstärkung von CDDP durch BEZ235 in Cal33 und UM-SCC-47 Zellen	31
Abb. 9: Verstärkung von CDDP durch BEZ235 in HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen	32
Abb. 10: Wirkung von CDDP auf die Strahlenempfindlichkeit	34
Abb. 11: Wirkung einer Vorbehandlung mit BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit	35
Abb. 12: BEZ235 in Kombination mit CDDP und Strahlung	36
Abb. 13: BEZ235 in Kombination mit CDDP und 2Gy	37
Abb. 14: CDDP-Empfindlichkeit von HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen	38

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Geräte	22
Tab. 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	23
Tab. 3: Auflistung der verwendeten Software.	23
Tab. 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	23
Tab. 5: Daten der HPV-negativen und -positiven HNSCC-Linien.....	24
Tab. 6: Parameter für den Kolonietest	27
Tab. 7: DMF _{50%} für die kombinierte Behandlung mit BEZ235, CDDP und Strahlung...	36

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alphabetische Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen.

Alt-EJ	alternative Endjoining
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
AKT/Akt	Protein Kinase B
BEZ235	NVP-BEZ235, Dactolisib
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
BD	Basenschäden
CDDP	Cisplatin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CDKN2A	Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor 2A
CT	Chemotherapie
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
DDR	DNA-Schadensantwort
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dosismodifikationsfaktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Einzelstrangbrüche
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ESB	DNA-Einzelstrangbrüche
f	weiblich
FBS	Fetales Kälberserum
G	G-Grading
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papilloma Virus
HR	Homologe Rekombination
HRAS	Unterform des G-Protein Rat sarcoma (Ras)
ICL	Interstrang-Quervernetzung
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
ISA	Intrastrangquervernetzung
kt	keine Therapie
m	männlich
M-Stadium	Fernmetastase
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
mut	mutiert
MW	Molekulargewicht
N-Stadium	Lymphknotenstatus
MEM	Minimum Essential Medium
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	Nicht-Homologe Endverknüpfung
nM	Nanomolar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Platierungseffizienz
PDK1	3'-phosphoinositide-dependent kinase 1
PIK3CA	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
pRB/RB	Retinoblastom Protein
PS	Petrischale
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
RAS	Rat sarcoma
RCT	Radiochemotherapie
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
RT	Radiotherapie
SEM	Standard error of the mean
SSA	Single-strand Annealing
T-Stadium	Tumorgröße
TSC2	tuberous sclerosis complex 2, tuberin
TP53	Tumorsuppressorprotein 53

UA	Universität von Amsterdam
UD/UDü	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
UDr	Universität Dresden
UM	Universität Michigan
UP	Universität Pittsburgh
UT	Universität Turku
ÜF	Überlebensfraktion
VM	Vollmedium
wt	Wildtyp
ub	unbekannt
ZS	Zellkulturschale

1 EINLEITUNG

1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

1.1.1 Einführung

Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) sind eine sehr heterogene Gruppe von Tumorerkrankungen. Anhand ihrer anatomischen Lokalisation werden die Karzinome in Tumore der Nasenhaupt- und Nebenhöhlen, Mundhöhle, Naso-, Oro- und Hypopharynx sowie des Larynx unterteilt. Bei Männern entfallen ca. 30 % aller HNSCC auf die Mundhöhle, 28% auf den Oropharynx, 23% auf den Larynx und 12% auf den Hypopharynx. Bei Frauen sind dies die Anteile 40, 26, 14 und 7% (RKI 2019).

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Als Ursache für das Entstehen von HNSCC wird vor allem der erhöhte Konsum von Alkohol und Tabak angesehen (RKI 2019). Seit ca. 1980 wird aber vermehrt das Auftreten von HNSCC beobachtet, die durch einen Humanen Papillomavirus und da insbesondere HPV-16 und HPV-18 induziert werden. Daher wird aktuell zwischen HPV-negativen (verursacht durch Alkohol und Tabak) und HPV-positiven (verursacht durch HPV-Viren) unterschieden. Sowohl hinsichtlich Tumorbiologie, Therapieansprechen sowie Prognose handelt es sich hierbei um zwei ganz eigenständige Entitäten. Auch bezüglich der Lokalisation bestehen große Unterschiede. HPV-induzierte Tumoren treten vor allem im Zungengrund, dem oberen Rachenabschnitt (Oropharynx), sowie den Rachenmandeln auf. Für die anderen Lokalisationen ist vor allem erhöhter Tabak- und Alkoholkonsum von Bedeutung (RKI 2019).

HNSCC ist weltweit die sechsthäufigste Tumorentität mit ab dem Jahr 1990 generell leicht sinkender Inzidenz (Ferlay et al. 2010, RKI 2019, Sano und Oridate 2016). Dagegen wird für HPV-pos. HNSCC eine Zunahme beobachtet (Chaturvedi et al. 2013, Tinhofer et al. 2015). Hierbei handelt es sich vor allem um Oropharynx- und Mundhöhlenkarzinome. Der Anteil HPV-positiver Tumoren an allen HNSCC variiert zwischen 20 bis 30% (Ang et al. 2010, Mehanna et al. 2013, Reuschenbach et al. 2019, Tinhofer et al. 2015).

In Deutschland erkrankten 2016 ca. 18.000 Patienten an einem Tumor des oberen Aerodigestivtrakts, davon etwa 13.000 Männer und 5.000 Frauen. Etwa 5.500 Männer bzw. 1.700 Frauen verstarben an dieser Tumorerkrankung (RKI 2019).

1.1.3 Tumorgenese HPV-negativer und -positiver HNSCC

Die Tumorgenese ist generell ein mehrstufiger Prozess mit Akkumulation bestimmter genetischer Veränderungen, die Auswirkungen auf zentrale zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Zellwachstum und Zelltod haben (Hanahan und Weinberg

2011). Bezüglich dieser Tumorgenese unterscheiden sich HPV-negative und positive HNSCC erheblich, was zu großen Unterschieden in den molekularen Eigenschaften und damit auch Therapieansprechen führt.

Ursache von HPV-negativen HNSCC sind lang andauernde Expositionen mit pathogenen Substanzen, die zu Epithelreaktionen wie Hyperplasie und Hyperkeratose führen. In Folge dieser Reaktionen entwickeln sich über verschiedene histopathologische Stadien transformierte Zellen bis hin zum invasiven Karzinom mit Metastasierung (Chin et al. 2004, Leemans et al. 2011). Hierbei entstehen Zellklone mit einer Vielzahl an willkürlich über das gesamte Genom verteilten Mutationen wie u.a. in dem Tumorsuppressorprotein TP53 und dem Protoonkogen pRb (Leemans et al. 2011, Sano und Oridate 2016). Diese Mutationen bewirken einen Verlust von Kontrollmechanismen im Zellzyklus und erlauben eine unkontrollierte Zellprogression. Zusätzliche Mutationen im Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR), des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 2A (CDKN2A), der Phosphatase PTEN, der Phosphoinositid-3-Kinase PIK3CA, des HRAS, sowie im PIK3CA treiben die Proliferation der Tumorzellen voran (Sheu et al. 2009, Stransky et al. 2011).

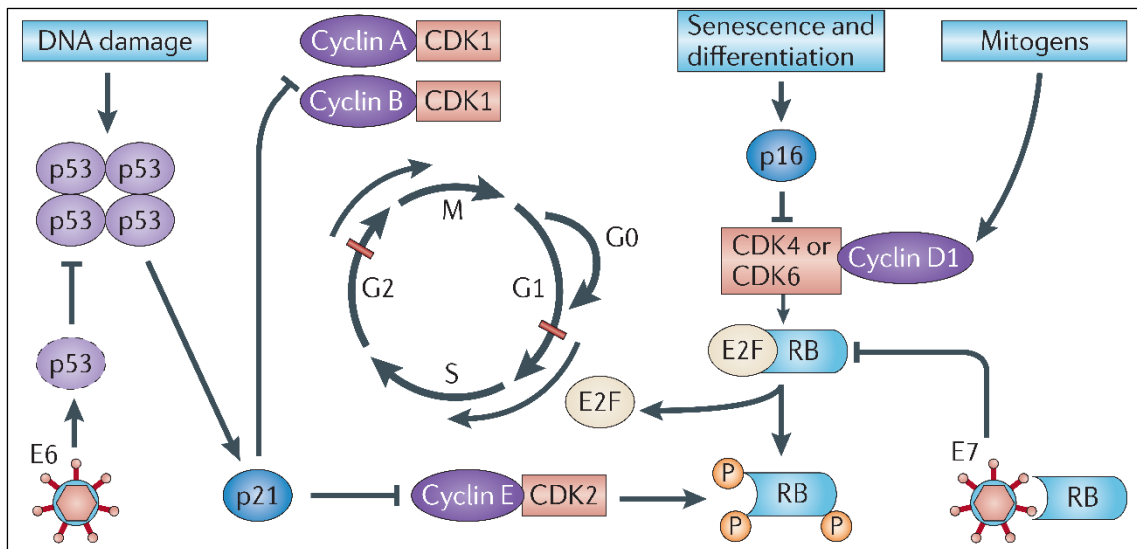


Abb. 1: Deregulation des Zellzyklus durch E6 und E7 bei Transfektion mit HPV
 Durch E6 und E7 werden in der Zelle über die Inaktivierung von TP53 bzw. RB die Zellzykluskontrolle insbesondere nach Schädigung der DNA verhindert (Abb. aus Leemans et al. 2011).

Die Karzinogenese von HPV-positiven HNSCC wird durch die Transformation von epithelialen Basalzellen mit humanen Papillomaviren (HPV) und da insbesondere den HPV-Typen 16, 18, 33 und 35 bewirkt (Leemans et al. 2011). Initial entscheidend ist die Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom. Dies führt zur Expression der beiden Virusonkogene E6 und E7 (Abb. 1). E7 bewirkt eine Hyperphosphorylierung und damit einen proteasomalen Abbau des Retinoblastomproteins (Rb). Rb ist am G1/S-

Checkpoint beteiligt und blockiert bei geschädigter DNA durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Wird pRb jedoch vorab abgebaut, so kommt es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und damit zur unkontrollierten Zellproliferation (Leemans et al. 2011). E6 bewirkt über eine Polyubiquitinierung den proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors p53. In den HPV- pos. Zellen liegt somit kein oder nur eine sehr geringe Menge an aktivem p53 vor, so dass bei Schädigung der DNA nicht der G1-Arrest ausgelöst wird und den Zellen Zeit für eine DNA-Reparatur gegeben wird (Leemans et al. 2011). Über das Aussetzen der Zellzykluskontrolle bewirken E6 und E7 gemeinsam, dass sich weitere Mutationen in den Zellen etablieren können und so eine Transformation der Zelle und damit Entstehen eines Tumors möglich ist (Leemans et al. 2011).

1.2 Therapie

Tumoren der Kopf-Hals-Region werden in Deutschland entsprechend der S3-Leitlinien mittels eines multimodalen Therapiekonzepts bestehend aus den drei Säulen Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie behandelt (Onkologie 2019).

Bei HNSCC-Tumoren im frühen Stadium (I und II) erfolgt in der Regel eine unimodale Therapie, bei der der Tumor entweder chirurgisch entfernt wird oder alternativ eine primäre Radiotherapie durchgeführt wird. Bei fortgeschrittenen Tumoren im Stadium III und IV erfolgt eine risikoadaptierte Therapie, wobei die chirurgische Behandlung entweder mit einer alleinigen Bestrahlung oder mit einer Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie kombiniert wird.

1.3 Strahlentherapie

Ziel der Strahlentherapie ist es, durch eine fokussierte Bestrahlung des Tumors alle Tumorzellen abzutöten, um dadurch eine lokale Kontrolle zu erreichen (Dikomey et al. 2016, Dikomey et al. 2012).

Die Gesamtdosis der Strahlentherapie liegt beim kurativen Ansatz bei 72-74 Gy und beim adjuvanten Konzept bei 60 Gy. Je nach Therapiekonzept kann dabei die Bestrahlung mit einer konventionellen Fraktionierung von 1,8 bis 2 Gy pro Fraktion in 5 Tagen pro Woche erfolgen, als akzelerierte Fraktionierung mit mehr als 10 Gy pro Woche oder auch hyperfraktioniert mit täglich zwei Einzeldosen von 1,1 bis 1,2 Gy pro Fraktion (Bourhis et al. 2012, Mazon et al. 2009, Tasoulas et al. 2021).

1.3.1 DNA-Schädigung

Die Wirkung der Strahlentherapie auf Zellen und Gewebe beruht in erster Linie auf der Schädigung der DNA durch direkte oder indirekte Ionisation (Dikomey et al. 2016,

Dikomey et al. 2012). Hieraus entstehen eine Vielzahl an DNA-Schäden unterschiedlicher Komplexität. Pro Gy sind dies ca. 1000 Einzelstrangbrüche (ESB), ca. 2000 Basenschäden (BD) und ca. 30 Doppelstrangbrüche (DSB) (Dikomey et al. 2016, Dikomey et al. 2012).

1.3.2 DNA-Reparatur

Um die Stabilität des Genoms zu gewährleisten, sind Zellen in der Lage, DNA-Schäden sehr effektiv zu erkennen und zu beseitigen. Dazu kommt es nach DNA-Schädigung zur Aktivierung eines Netzwerks, was auch als *DNA damage response* (DDR) bezeichnet wird (Dikomey et al. 2016, Dikomey et al. 2012). Entscheidend ist hierbei die Aktivierung der Proteine ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) sowie DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (Dikomey et al. 2016, Dikomey et al. 2012).

DNA-Schäden wie ESB und BD, welche nur einen DNA-Strang betreffen, werden von den Reparaturmechanismen der Zellen sehr schnell erkannt und weitgehend fehlerfrei repariert.

Auch DSB werden von der Zelle sehr schnell erkannt. Ihre Reparatur ist aber aufgrund der Schädigung beider DNA-Stränge wesentlich komplexer und beinhaltet das Risiko für eine fehlerhafte Reparatur, welche zu einer Mutation oder sogar zum Absterben der Zelle führen kann (Dikomey et al. 2016, Dikomey et al. 2012). Für die Reparatur der DSB stehen der Zelle mehrere Mechanismen zur Verfügung. Der wichtigste Mechanismus ist hierbei das NHEJ (engl. *non-homologous end-joining*). Bei diesem Prozess erfolgt eine direkte Verknüpfung der DNA-Bruchenden, ohne dass eine homologe Kopie des Doppelstranges vorliegen muss (Hoeijmakers 2001). NHEJ ist in allen Zellzyklusphasen aktiv. Diese Reparatur ist insgesamt sehr fehlerhaft und geht häufig mit Mutationen sowie auch Translokationen oder Deletionen einher.

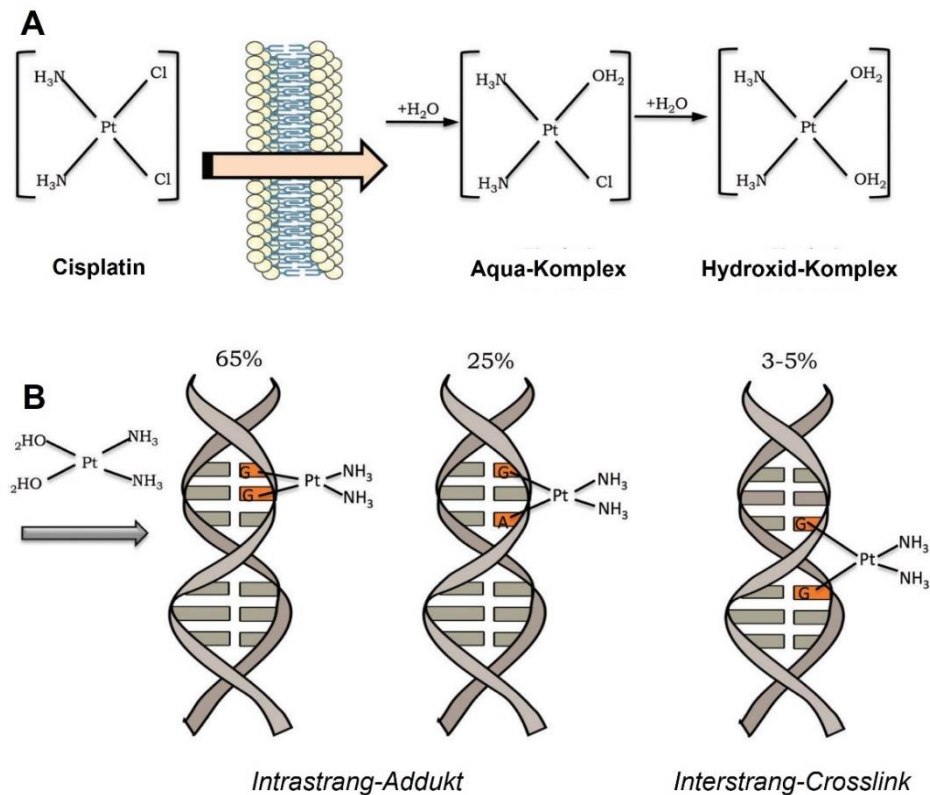
Die Reparatur mittels Homologer Rekombination (HR) ist ein weiterer wichtiger Mechanismus (Dikomey et al. 2016, Dikomey et al. 2012). Bei diesem Prozess wird für die Reparatur des DSB das intakte Schwesterchromatid als Vorlage genutzt. Diese Reparatur ist daher auf die späte S- und G2-Phase beschränkt (Hoeijmakers 2001). Die Reparatur ist weitgehend fehlerfrei.

Neben den klassischen Reparaturwegen NHEJ und HR existieren noch sogenannte Ersatzwege wie das alternative Endjoining (Alt-EJ) sowie das Single-strand Annealing (SSA), die vor allem in Tumorzellen aktiv sind (Dikomey et al. 2016, Dikomey et al. 2012). Beide Reparaturwege sind sehr fehlerhaft (Iliakis et al. 2015, Kasten-Pisula et al. 2009).

1.4 Radiochemotherapie

Bei der Behandlung von HNSCC wird die Radiotherapie sehr oft mit einer Chemotherapie kombiniert (Mazeron et al. 2009). Dabei kann es verschiedene Abläufe geben. Bei der simultanen Radiochemotherapie (RCT) finden beide Behandlungen parallel statt. Dabei erfolgt in der Regel die Gabe der Zytostatika 30 Minuten vor der Bestrahlung. Die weiteren Intervalle richten sich nach dem jeweils angewendeten Strahlentherapieschema. Die Radiochemotherapie kann allein (definitive RCT) oder in Kombination mit einer chirurgischen Therapie durchgeführt werden. Bei letzterem wird zwischen einer adjuvanten und einer neo-adjuvanten RCT unterschieden. Bei einer adjuvanten RCT, wie sie häufig bei HNSCC durchgeführt wird, erfolgt zunächst die operative Entfernung des Tumors gefolgt von einer Nachbehandlung mit RCT. Bei einem neo-adjuvanten Regime soll durch die Vorbehandlung mit einer RCT der Tumor verkleinert und damit die Chancen für eine effektive Chirurgie erhöht werden.

Je nach Tumorentität werden ganz unterschiedliche Zytostatika verwendet. Die am häufigsten eingesetzten Substanzen sind 5-Fluoruracil, Mitomycin C und Cisplatin, sowie auch Antikörper wie Cetuximab (Mazeron et al. 2009, Budach et al. 2016, Zeller 2016).



1.4.1 Cisplatin

Cisplatin gilt als die wichtigste Komponente der Radiochemotherapie. Diese Substanz wurde 1844 erstmalig von dem italienischen Chemiker Michele Peyrone synthetisiert (Zeller 2016). Cisplatin ist ein planarer Komplex, der am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloridliganden und zwei Amminliganden gebunden hat (Abb. 2B). Cisplatin muss in der Zelle noch aktiviert werden, indem die Chloridoliganden durch Wasser ersetzt werden, wodurch ein Aqua- bzw. ein Hydroxid-Komplex entsteht (Abb. 2A).

Der Hydroxid-Komplex kann mit der DNA Querverknüpfungen bilden (Abb. 2B). Hierbei ist zwischen Intrastrang- (ISA) und Interstrang-Quervernetzungen (ICL) zu unterscheiden, wobei die Vernetzungen innerhalb eines Stranges wesentlich häufiger sind als die Vernetzungen zwischen den gegenüberliegenden Strängen (Abb. 2B). ICL sind dabei wesentlich toxischer insbesondere für proliferierende Zellen, da sie wegen der kovalenten Bindung an beide Stränge die Auftrennung der DNA-Doppelhelix verhindern, wodurch sowohl die Transkription als auch die Replikation gehemmt wird (Deans und West 2011).

1.4.2 Reparatur der Cisplatin-Addukte

Die Reparatur der Cisplatin-Addukte kann je nach Bedingung durch ganz unterschiedliche Reparaturwege erfolgen. An der Reparatur sind vor allem die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) und der Fanconi-Anämie-Signalweg, sowie auch HR und NHEJ beteiligt (Chen et al. 2016, Damia und Broggini 2019, Rocha et al. 2018, Rodríguez und D'Andrea 2017).

Intrastrang-Addukte (ISA) werden vor allem über das NER erkannt und beseitigt (Rocha et al. 2018). Bei dieser Reparatur wird das ISA herausgeschnitten, wobei ca. 30 Nukleotide entfernt werden. Mit dem intakten gegenüberliegenden Strang als Vorlage kann mittels Reparatursynthese die Lücke wieder geschlossen werden. Befindet sich die Zelle gerade in der S-Phase, kann durch das Zusammentreffen der Lücke mit einer Replikationsgabel ein DSB entstehen. Dieser DSB wird dann über die Replikations-abhängige HR repariert. Die Reparatur von ICLs ist wesentlich komplexer, da beide Stränge beschädigt sind. Bei der Entfernung des ICLs mittels NER entsteht daher in der Regel ein DSB, der mittels NHEJ oder HR repariert werden kann.

1.4.3 Cisplatin in der Krebstherapie

Cisplatin wurde schon 1974 bei der Behandlung von Hodenkrebs eingesetzt (Alderden et al. 2006). Heute wird Cisplatin bei einer großen Anzahl an Tumorentitäten wie Ovar- und Zervixkarzinom, Blasenkrebs, Melanom, Lymphome sowie Kopf-Hals-Tumoren verwendet (Alderden et al. 2006, Rocha et al. 2018).

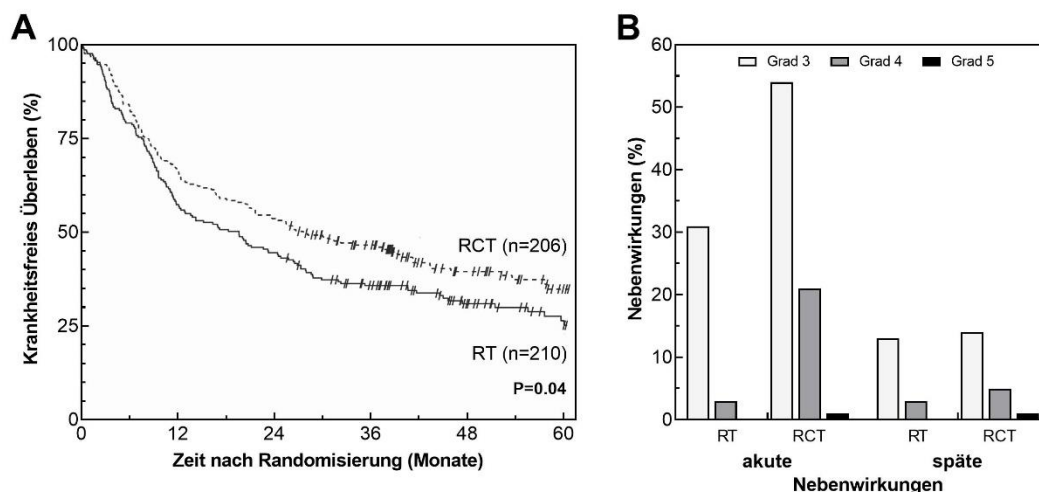


Abb. 3: Radiochemotherapie (RCT) mit Cisplatin bei fortgeschrittenem HNSCC

A) Krankheitsfreies Überleben beim fortgeschrittenen HNSCC nach Radiochemotherapie (RCT) im Vergleich zu einer Radiotherapie (RT) bei einer adjuvanten Anordnung. B) Akute und späte Nebenwirkungen der HNSCC-Patienten. Daten aus Cooper et al. (Cooper et al. 2004)

Die Wirkung von Cisplatin in Kombination mit einer Strahlentherapie wurde erstmalig an 27 Patienten mit fortgeschrittenem Krebs im Nasenrachenraum getestet (Al-Sarraf et al. 1990). Im Vergleich zu HNSCC-Patienten aus früheren Studien, die allein mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, wurde bei einer Nachbeobachtungszeit von 4 Jahren eine Zunahme im Gesamtüberleben von ca. 30 auf 55% erreicht. Allerdings war dies begleitet mit einem deutlichen Anstieg an z.T. schweren Nebenwirkungen (Al-Sarraf et al. 1990). In der finalen Auswertung dieser Studie mit 52 Patienten (Al-Sarraf et al. 1997) zeigte sich bei einer Nachbeobachtungszeit von 2 Jahren zwar immer noch ein deutlicher Unterschied in der lokalen Kontrolle (RCT=80% vs. RT=66%), wohingegen der Gewinn im Gesamtüberleben nur noch marginal war (RCT=52% vs. RT=50%). Allerdings waren weiterhin deutlich mehr schwere Nebenwirkungen nach der RCT zu beobachten.

Die erste umfassende Studie mit einer adjuvanten Anordnung mit insgesamt 416 HNSCC-Patienten zeigte einen deutlichen Vorteil für die RCT (Cooper et al. 2004). Nach RT lag das Krankheitsfreie-Überleben bei einer Nachbeobachtungszeit von 5 Jahren nur bei 26% nach RCT jedoch bei 35% (Abb. 3A). Allerdings wurden auch bei dieser Studie nach der RCT deutlich mehr akute Nebenwirkungen (Abb. 3B) beobachtet. Keine Unterschiede ergaben sich dagegen für die späten Nebenwirkungen (Abb. 3B).

Diese Ergebnisse wurden durch weitere Studien bestätigt (Bernier et al. 2004, Mendenhall et al. 2006). Es wurde außerdem gezeigt, dass noch höhere Heilungsraten erreicht werden können, wenn bei der RCT Cisplatin mit anderen Agentien wie 5-Fluorouracil und Taxanen kombiniert wurde (Budach et al. 2016).

Wurde dagegen bei der RCT auf die Gabe von Cisplatin verzichtet, um die

Nebenwirkungen zu reduzieren, konnte im Vergleich zur alleinigen RT keine Verbesserung erreicht werden (Tobias et al. 2010). Basierend auf diesen Daten hat sich die Cisplatin-basierte Radiochemotherapie als fester Bestandteil bei der Behandlung von vor allem fortgeschrittenen HNSCC etabliert. Aufgrund der hohen akuten Nebenwirkungen dieser Behandlung wird aber weiterhin die große Notwendigkeit gesehen, weniger toxische Alternativen zu entwickeln.

1.4.4 Wirkung von Cisplatin auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Für die starke und eindeutige Wirkung von Cisplatin in Kombination mit einer Radiotherapie auf die Tumorheilung werden sowohl additive als auch synergistische Effekte verantwortlich gemacht. Der additive Effekt wird durch die komplementäre Wirkung von Cisplatin und Strahlung erklärt. Dabei wird angenommen, dass Cisplatin vor allem auf Zellen in der S-Phase wirkt, die generell als sehr strahlenresistent gelten (Hall und Giaccia 2006). Allerdings sind die wenigen Daten, die diesbezüglich vorliegen, sehr widersprüchlich. Für S-Phase- bzw. proliferierende Zellen wird sowohl von einer erhöhten als auch einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin berichtet (Carde und Laval 1981, Dimanche-Boitrel et al. 1992, Donaldson et al. 1994, Meyn et al. 1980).

Auch bezüglich der synergistischen Wirkung von Cisplatin und Strahlung ist die Datenlage sehr widersprüchlich. Wenn eine synergistische Wirkung beobachtet wurde, dann waren die Effekte eher moderat mit Verstärkungsfaktoren von 1,1 -1,5 (Begg et al. 1986, Iwata et al. 2020, Raaphorst et al. 1995, Rühle et al. 2017, Zhang et al. 2009).

Auch für HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen sind die Daten bezüglich der Wirkung von Cisplatin allein oder in Kombination mit Bestrahlung erstaunlich widersprüchlich. Für die alleinige Wirkung von Cisplatin wird bei Nachweis mittels eines Viabilitätstest für HPV- pos. Zellen eine deutlich geringere Empfindlichkeit beobachtet (Leonard et al. 2019, Nagel et al. 2013). Bei Nachweis mittels Koloniebildungstest zeigt sich dagegen kein Unterschied (Busch et al. 2016), bzw. wurde in einer Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe sogar eine signifikant höhere Empfindlichkeit für HPV-pos. Zellen gemessen (Ziemann et al. 2015).

Für die Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung wurde für HPV-pos. als auch HPV-neg. nur eine geringe oder häufig sogar gar keine Strahlensensibilisierung festgestellt ohne einen erkennbaren Unterschied zwischen den beiden Entitäten (Busch et al. 2016, Prevc et al. 2018). Das gleiche Ergebnis wurde auch in einer Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe gemacht (Ziemann et al. 2015).

Insgesamt deuten diese Daten an, dass der starke klinische Effekt von Cisplatin im Rahmen der RCT vermutlich eher auf eine additive als auf eine synergistische Wirkung

mit Strahlung beruht. Es wäre daher zu untersuchen, wie die Wirkung von Cisplatin in Kombination mit Bestrahlung verstärkt werden kann, so dass ein klarer synergistischer Effekt erzielt wird. Dies könnte eine Reduktion der Cisplatinkonzentration erlauben und damit eine Minderung der schweren Nebenwirkungen nach Cisplatinbehandlung.

1.5 Prognose von HPV-negativen und -positiven HNSCC

Bezüglich der Heilungschancen von HNSCC ergab sich eine gänzlich neue Einschätzung, nachdem gezeigt wurde, dass sich diesbezüglich HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC unterscheiden mit einem deutlich höheren Überleben für HPV-pos. HNSCC. Dies wurde sowohl nach alleiniger Radiotherapie (Lassen et al. 2009) als auch Radiochemotherapie (Ang et al. 2010, Nguyen-Tan et al. 2014) gezeigt, sowie auch nach adjuvanter Radiochemotherapie (Linge et al. 2018, Lohaus et al. 2014). Insgesamt wurden dabei für die Patienten mit einem HPV-pos. HNSCC mit 5-Jahres-Überlebensraten von 60-80% deutlich höhere Werte erreicht als für Patienten mit HPV-neg. HNSCC mit nur 30-40%.

Das deutlich bessere Ansprechen der HPV-pos. HNSCC auf eine Radiotherapie wird auf eine erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt (Arenz et al. 2014, Kimple et al. 2013, Rieckmann et al. 2013). Als Ursache hierfür wird eine verminderte DSB-Reparatur mit einem verstärkten G2-Arrest angesehen (Arenz et al. 2014, Kimple et al. 2013, Rieckmann et al. 2013). Die Reduktion in der DSB-Reparatur kann z. T. auf einen Defekt in der HR zurückgeführt werden (Ziemann et al. 2017). Dagegen ist die in den HPV-pos. Zellen stark reduzierte Menge an wildtyp-p53, anders als zunächst vermutet (Kimple et al. 2013), hierfür ohne Bedeutung, wie eine Reaktivierung des p53 zeigt (Seltzsaam et al. 2019).

1.6 De-Eskalation beim HPV-positiven HNSCC

Aufgrund der hohen Heilungsrate für HPV-pos. HNSCC, wie sie durch die RCT erreicht werden kann, wird die Möglichkeit aber auch die Notwendigkeit gesehen, diese Entität nicht mehr genauso zu behandeln wie bisher, sondern stattdessen die Therapie zu de-eskalieren. Dabei sollte die Therapie weiterhin eine hohe Heilungsrate garantieren mit aber einer deutlichen Reduktion der Nebenwirkungen.

Untersucht wurde, ob dieses Ziel durch Minderung der Gesamtdosis oder des Zielvolumens, sowie vor allem durch eine weniger toxische Chemotherapie erreicht werden kann (Rühle et al. 2021). So wurde überprüft, ob es möglich ist, bei der RCT Cisplatin durch einen Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) zu ersetzen. Dieses Konzept basierte auf einer Studie, bei der für den fortgeschrittenen

HNSCC eine Zunahme der Heilungsrate beobachtet wurde, wenn eine alleinige Radiotherapie mit dem EGFR-Inhibitor Cetuximab kombiniert wurde (Bonner et al. 2006). Allerdings konnte dieses Ergebnis in nachfolgenden Studien mit überwiegend HPV-neg. HNSCC, bei denen EGFR-Inhibitoren mit aktuellen Radiochemotherapien kombiniert wurden, nicht bestätigt werden (Ang et al. 2010, Dietz et al. 2018, Giralt et al. 2015, Martins et al. 2013, Mesía et al. 2015).

Auch bei den zwei ausschließlich mit HPV-pos. HNSCC durchgeführten Studien konnte durch den Einsatz von EGFR-Inhibitoren an Stelle des Cisplatin keine gleichwertige Wirkung erreicht werden (Gillison et al. 2019, Mehanna et al. 2019). Vielmehr wurde sogar eine Abnahme der Überlebensrate beobachtet. Auf Grund dieser Daten wird die Cisplatin-basierte Radiochemotherapie weiterhin für HPV- pos. HNSCC als die Standardtherapie angesehen (Rühle et al. 2021). Angesichts dieses für die Patienten sehr negativen Ergebnisses wurde von der „*Head and Neck Cancer International Group*“ (HNCIG) zudem für weitere De-Eskalationsstudien mit HPV-pos. HNSCC die Handlungsanweisung ausgesprochen, wonach zunächst in der Phase 2 das jeweilige Konzept gründlich abzusichern sei, bevor eine umfangreiche Phase 3 Studie gestartet werden kann (Mehanna et al. 2020). In einem aktuellen Übersichtsartikel wurde zudem dargelegt, dass auch aufgrund der aktuellen präklinischen Daten keine Verbesserung der Heilungsraten bei einer Kombination aus Radiotherapie und EGFR-Inhibition zu erwarten sei (Rieckmann und Kriegs 2019). Es wird vielmehr auf die dringende Notwendigkeit hingewiesen, für HPV-pos. HNSCC neue Targets zu identifizieren, die eine gezielte Strahlensensibilisierung und damit Steigerung der Heilungsrate möglich machen. Als eine Chance diesbezüglich eine Verbesserung zu erreichen, wird die Kombination der RCT mit mehreren spezifischen Inhibitoren gesehen, um so die Signalwege in den Tumorzellen effektiv zu unterdrücken (Hintelmann et al. 2020). Als wichtige Targets werden hierbei neben dem EGFR-Signalweg, auch der RAS/RAF/MEK- sowie der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg genannt (Hintelmann et al. 2020).

1.7 Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg (Abb. 4) ist einer der am häufigsten in HNSCC mutierten Signaltransduktionswege, mit Veränderungen sowohl in HPV-neg. als auch HPV-pos. HNSCC (Dienstmann et al. 2014, Iida et al. 2020, Toulany und Rodemann 2015).

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg vermittelt Wachstumssignale an die Zelle. Dies geschieht durch die Bindung spezifischer Liganden an ein membranständiges Rezeptortyrosinkinase-Dimer. Hierzu gehören u.a. Rezeptoren für

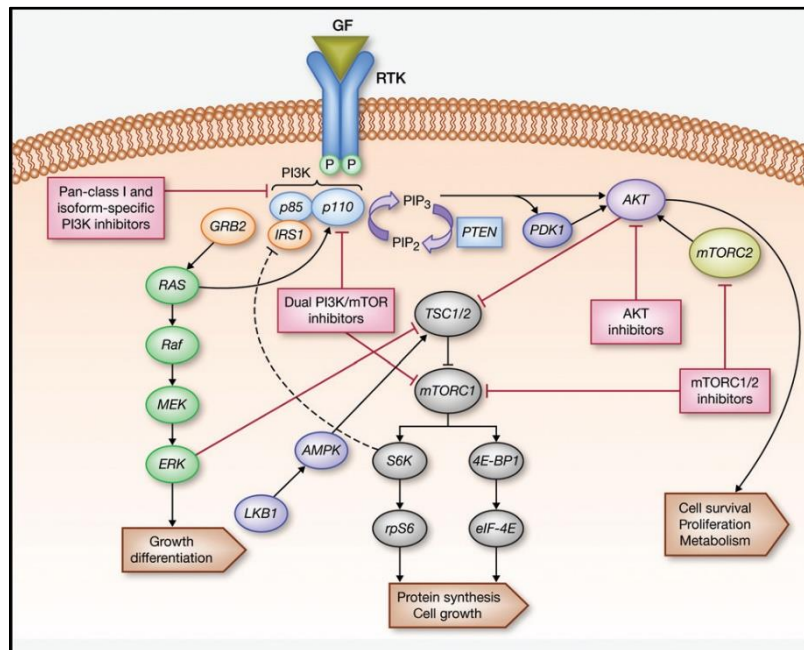


Abb. 4: PI3K/Akt/mTOR-Signalweg.

Die Graphik ist mit geringen Veränderungen der Arbeit (Dienstmann et al. 2014) entnommen.

Wachstumsfaktoren wie EGFR und IGF-1R bzw. Zelladhäsionsmoleküle wie beispielsweise Integrine und Onkogene wie RAS. Durch die Bindung der Liganden wird das Enzym PI3K an die Membran rekrutiert und aktiviert. Dies bewirkt, dass die p110-Untereinheit das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert. Der sogenannte ‚second messenger‘ PIP₃ bindet dann an Proteine wie die PDK1 (3′-phosphoinositide-dependent kinase 1) sowie die Serin/Threoninkinase Akt, wodurch diese an die Zellmembran angelagert werden. Antagonist der Reaktion ist der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*). Er bewirkt über die Dephosphorylierung von PIP₃ eine Umwandlung zu PIP₂ und unterbindet damit die Aktivierung der PDK1 und Akt.

Akt phosphoryliert und aktiviert eine Vielzahl von Proteinen, die eine wichtige Rolle für die Proliferation sowie das Zellüberleben haben. Dies erfordert die zweifache Phosphorylierung von Akt. Die erste Phosphorylierung an der Base Thre308 wird durch die PDK1 geleistet. Zusätzlich muss Akt zusätzlich an Ser473 phosphoryliert werden, was größtenteils durch das Protein selbst geschieht.

Eine wichtige Funktion von Akt ist die Aktivierung von mTOR. Dies kann sowohl direkt über Akt als auch indirekt über TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2, tuberin*) erfolgen. Physiologisch liegt mTOR in zwei verschiedenen Komplexen vor. Als mTOR1 ist es an das Enzym Raptor gebunden, dagegen als mTOR2 an das Enzym Rictor. Beide Komplexe stimulieren die Proteintranslation und führen so zur Synthese von

Schlüsselproteinen der Zellproliferation und des Zellwachstums. Durch die Komplexbildung mit S6K1 kann mTOR1 diese Aktivierung verstärken. Der mTOR2-Komplex kann wiederum in einer Art positiver Rückkopplung das Akt-Protein an der Position Ser473 phosphorylieren.

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist sehr häufig in HNSCC mutiert mit bis zu 62% aktivierenden Veränderungen in PI3K und dies sowohl in HPV-neg. als auch HPV-pos. HNSCC (Iglesias-Bartolome et al. 2013, Lui et al. 2013, Stransky et al. 2011). Während in HPV-neg. HNSCC vorwiegend Mutationen von PTEN vorliegen, werden in HPV-pos. HNSCC vor allem aktivierende Mutationen des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges gefunden (Fernández-Mateos et al. 2020, Saintigny et al. 2018).

Mutationen im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg korrelieren mit einer schlechteren Prognose sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie (Iida et al. 2020, Toulany und Rodemann 2015). Eine Inhibition dieses Signalwegs bietet daher einen wichtigen Ansatzpunkt zur Überwindung der Resistenz mit der Möglichkeit für eine Therapie-De-Eskalation und Reduktion der akuten und späten Nebenwirkungen.

1.8 Dualer PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235

In zahlreichen präklinischen Studien mit soliden Tumoren wurden bereits starke Hemmungen des Tumorwachstums bei Einsatz von PI3K-Inhibitoren beobachtet (Horn et al. 2015, Iida et al. 2020, Toulany und Rodemann 2015). Das gilt sowohl für eine Monotherapie als auch für die Kombination mit einer Bestrahlung.

Um eine effektive Inhibition des PI3K/mTOR-Signalweges zu erreichen, muss der Inhibitor an möglichst mehreren Stellen angreifen, um auch positive Rückkopplungen zu unterbinden (Dienstmann et al. 2014). Solch eine Wirkung ist mittels des dualen Inhibitors NVP-BEZ235 (BEZ235, Dactolisib) erreichbar (Maira et al. 2008). BEZ235 ist ein Imidazoquinolinderivat mit hoher Spezifität gegenüber dem katalytischen Zentrum der PI3K-Kinase sowie dem Enzym mTOR mit einer effektiven Hemmung bereits in einer nanomolaren Konzentration (Maira et al. 2008)

BEZ235 zeigt eine starke antiproliferierende Wirkung auf Tumorzellen verschiedener Entitäten (Chen et al. 2015, Konstantinidou et al. 2009, Maira et al. 2008). In Kombination mit einer Bestrahlung kann durch BEZ235 zudem eine sehr effektive Strahlensensibilisierung erreicht werden (Chen et al. 2015, Fokas et al. 2012, Gil del Alcazar et al. 2014, Kuger et al. 2013, Mukherjee et al. 2012, Yu et al. 2017). Die strahlensensibilisierende Wirkung von BEZ235 beruht dabei nicht auf einer induzierten Apoptose (Fokas et al. 2012, Konstantinidou et al. 2009, Kuger et al. 2013),

sondern auf einer Unterdrückung der DSB-Reparatur (Chen et al. 2015, Gil del Alcazar et al. 2014, Mukherjee et al. 2012).

In einer ersten Untersuchung (Schötz et al. 2020) konnte in unserer Arbeitsgruppe erstmalig gezeigt werden, dass mittels BEZ235 sowohl in HPV-neg. als auch -pos.

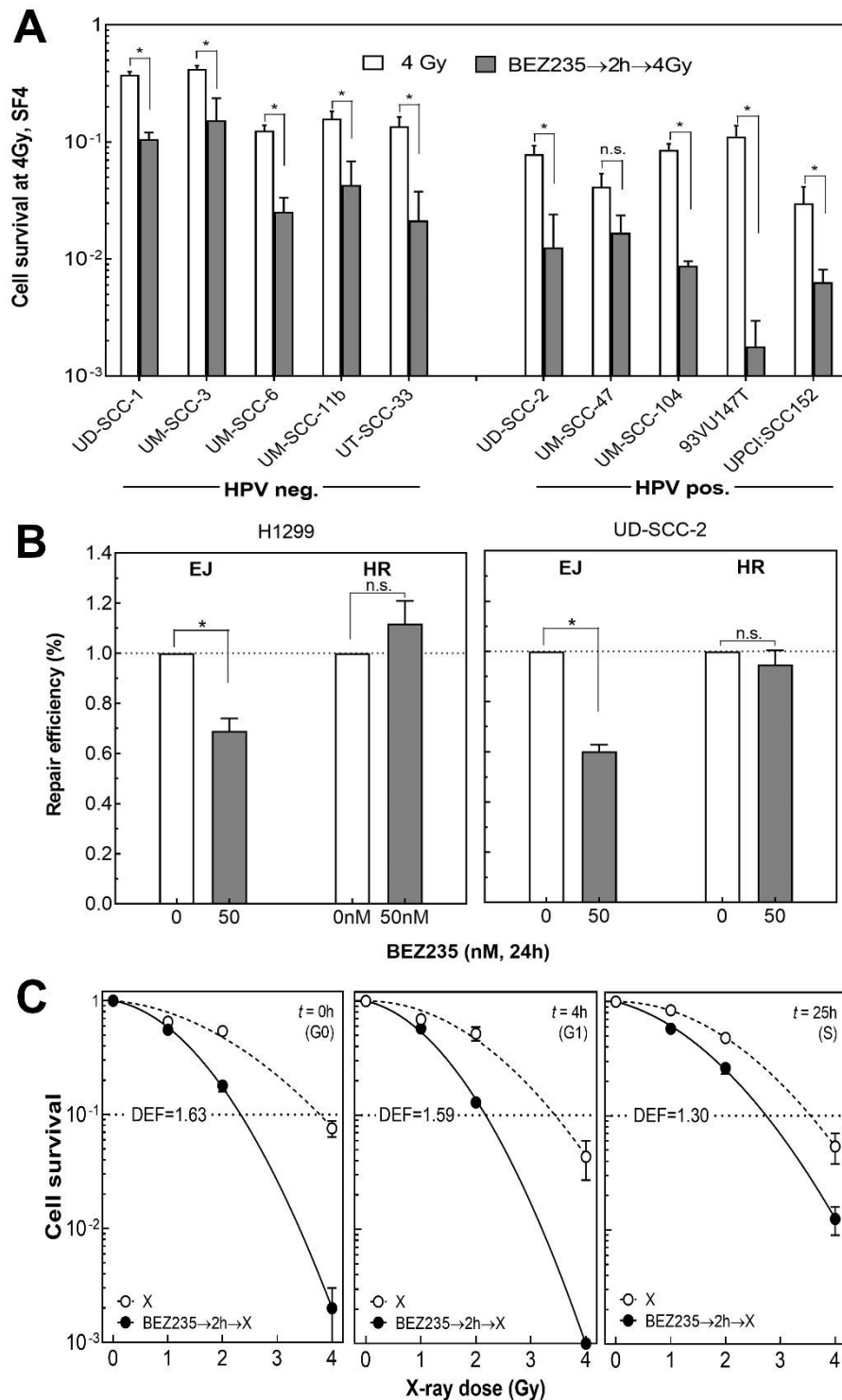


Abb. 5: Strahlensensibilisierung durch Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges
 Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges mit dem dualen Inhibitor BEZ235.
 A) Strahlen-sensibilisierung durch BEZ235 in HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zelllinien.
 B) Wirkung von BEZ235 auf die DSB-Reparaturwege EJ und HR.
 C) Strahlensensibilisierung durch BEZ235 für G0, G1 und S-Phasezellen. Daten wurden der Arbeit (Schötz et al. 2020) entnommen.

HNSCC-Zellen eine sehr effektive Strahlensensibilisierung erreicht werden kann (Abb. 5A). Diese Sensibilisierung kann auf eine Hemmung der DSB-Reparatur und da vor allem des NHEJ zurückgeführt werden (Abb. 5B). Dementsprechend wurde vor allem für Zellen in der G1-Phase eine starke Sensibilisierung beobachtet (Abb. 5C), da dort das NHEJ der entscheidende DSB-Reparaturprozess ist.

Zu klären ist, ob durch BEZ235 für HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen auch die Wirkung einer kombinierten Behandlung mit Photonen und Cisplatin gesteigert werden kann. Damit soll insbesondere geklärt werden, ob dies einen erfolgreichen Ansatz für eine de-eskalierte Therapie bei diesen Tumoren bietet.

1.9 Fragestellungen der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollte erstmalig geklärt werden, ob durch den dualen Inhibitor BEZ235 sowohl in HPV-neg. als auch HPV-pos. HNSCC-Zellen die Wirkung von Cisplatin allein oder in Kombination mit einer Photonenstrahlung gesteigert werden kann.

Um Unterschiede in den Zelllinien zu erfassen, wurden diese Untersuchungen an insgesamt sechs HPV-neg. sowie sechs HPV-pos. HNSCC-Linien durchgeführt.

Mit diesen Untersuchungen sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Unterscheiden sich HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen in ihrer Cisplatin-Empfindlichkeit?
2. Kann durch den dualen Inhibitor BEZ235 sowohl in HPV-neg. als auch -pos. HNSCC-Zellen eine Steigerung der Cisplatin-Empfindlichkeit erreicht werden?
3. Kann durch den dualen Inhibitor BEZ235 die Wirkung einer kombinierten Behandlung aus Cisplatin und Photonenstrahlung sowohl in HPV-neg. als auch pos. HNSCC-Zellen gesteigert werden?
4. Kann basierend auf den Ergebnissen ein neues Konzept für die Behandlung von HNSCC entwickelt werden?

Insgesamt soll mit diesen Untersuchungen geklärt werden, ob die Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges mit dem dualen Inhibitor BEZ235 in Kombination mit einer Bestrahlung und Cisplatinbehandlung eine de-eskalierte Therapie für HPV-neg. und pos. HNSCC möglich ist.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	INCO153med	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	HERACell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Dispenser	Isopenser	ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Deutschland
Feinwaage	Summit SI-64	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Gefrierschrank -20 °C	MediLine LKPv 6520	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Herafreeze Typ HFU 586 Basic	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Licht-Mikroskop	CKX41 Inversmikroskop	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Kleinbrutschrank	Heraeus B 15	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kühl-Gefrier-Kombination	Comfort	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Magnetrührer	MIX 1 eco	2mag AG, München, Deutschland
Mikroliterpipetten	Reference® 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge	Heraeus FRESCO 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pipettierhelfer	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Präzisionswaage	MXX-412	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Röntgenbestrahlungsanlage	X-RAD 320 iX	Precision X-Ray Inc., North Branford, CT, USA
Sterilbank	HERASAFE KS 12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Universalzentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vertikaler Standautoklav	V-65	Systemec GmbH, Linden, Deutschland
Vortex-Schüttler	MX-S	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
Deckgläser	15 mm x 15 mm	Menzel GmbH, Braunschweig
Einmalspritzen	20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Soda-Glas, 150 mm	LLG Labware GmbH, Meckenheim, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 20µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturgefäße	TC-Schale 60 mm / 100 mm Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Software

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Software.

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA	Statistik, Visualisierung
Microsoft Office 2010 Professional	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA	Datenauswertung

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Accutase®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Cisplatin Teva 1 mg/ml	Teva GmbH, Ulm, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium, ohne Magnesium (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut, unvergällt/vergällt	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS superior)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Formaldehydlösung 37 %, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM Non Essential Amino Acids Solution 100x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Natriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
NVP-BEZ235	Selleckchem, München, Deutschland
Roswell-Park Memorial Institute (RPMI) 1640 - Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Stabiles Glutamin 200 mM	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland

2.1.5 Allgemeine Puffer und Reagenzien

<i>Ethanol 70 %</i>	<i>für Reinigungszwecke</i>
Ethanol absolut, vergällt	3,5 l
vollentsalztes Wasser	ad 5 l

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 10x, pH 7,4

zur Zubereitung von 1xPBS 1:10 mit vollentsalztem Wasser verdünnt

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
vollentsalztes Wasser	ad 1 l

2.1.6 Zellkulturmedium

Zellkulturmedium Lagerung bei +4 °C

Roswell's Park Memorial Institute (RPMI-1640)	500 ml
Fetales Kälberserum	50 ml
MEM Non Essential Amino Acids Solution 100x	5 ml
Stabiles Glutamin 200 mM	5 ml

2.1.7 Zellkulturlinien

Tab. 5: Daten der HPV-negativen und -positiven HNSCC-Linien

HPV-negativ							
Zelllinie	Alter/ Geschlecht	p53- Status	TNM	Grading	Loka- lisation	The- rapie	Quelle
FaDu	56/m	p53mut	TxNxMx	G4	Hypo- pharynx	RCT	UDr
UM-SCC-3	73/f	p53mut	T1N1M0	G3	Nase	kT	UM
UM-SCC-6	37/m	p53mut	T2N0M0	G2-G3	Zunge	kT	UM
UT-SCC-33	86/f	p53mut	T2N0M0	G2	Mund- höhle	kT	UT
UM-SCC-11b	65/m	p53mut	T2N2aM0	ub	Larynx	CT	UM
Cal33	69/m	p53mut	ub.	ub	Zunge	kT	UDr
HPV-positiv							
UD-SCC-2	58/m	p53wt	T1N3M0	G3	Hypo- pharynx	ub.	UDü
UM-SCC-47	53/m	p53wt	T3N1M0	G1-G2	Zunge	ub.	UM
UM-SCC-104	56/m	p53wt	T4N2bM0	G2	Mund- höhle	RT/C T	UM
93VU-147T	58/m	p53wt	T4N2M0	ub.	Mund- höhle	kT	UA
UPCI:SCC-152	47/m	p53wt	T2N0M0	G2	Hypo- pharynx	RCT	UP
UPCI:SCC-154	54/m	p53wt	T4N2M0	G4	Zunge	RCT	UP

UA, Universität Amsterdam; UDr, Universität Dresden; UDü, Universität Düsseldorf; UM, Universität Michigan; UP, Universität Pittsburgh; UT, Universität Turku
kT, keine Therapie; CT, Chemotherapie; RT, Radiotherapie; ub., unbekannt;

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Inkubation der in Tabelle 5 aufgeführten HNSCC-Linien erfolgte unter kontrolliert gleichbleibenden Bedingungen bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Inkubator.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkulturschalen (ZS) mit einem Durchmesser von 10 cm, einer Wachstumsfläche von 58 cm² und einer Medium-Menge von 10 ml pro ZS als Monolayer-Kultur. Für die Durchführung von Untersuchungen in Form von Koloniebildungstests wurden ZS mit einem Durchmesser von 6 cm mit einer Wachstumsfläche von 21 cm² und einer Medium-Menge von 4 ml pro ZS verwendet.

Eine vollständige Konfluenz führt zu einem Absinken der Proliferationsrate, Veränderung der Zellstoffwechselaktivität und somit zu einem Absterben der Kultur, was ein regelmäßiges Zelllinien-adaptiertes Passagieren nötig macht, um ein weiteres Wachstum zu ermöglichen. Zum Kulturerhalt wurden die Zellen alle 3 bis 5 Tage ab einer Konfluenz von 70 bis 80% passagiert. Nach Absaugen des überschichteten Vollmediums (VM) wurde der Zellrasen mit 4 ml steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Raumtemperatur) gewaschen. Durch Überschichtung mit 2 ml Accutase (Raumtemperatur) und einer Zelllinien-adaptierten Inkubationszeit von 5 bis 15 Minuten, bei 37°C, erfolgte das Ablösen der adhärent wachsenden Zellen, unter Sichtkontrolle der proteolytischen Wirkung am Lichtmikroskop. Für den Kulturerhalt wurde die Zellsuspension mit vorgewärmtem VM verdünnt und abhängig von der jeweiligen Zelllinien im Verhältnis von 1:2 bis 1:15 in eine neue ZS ausgesät. Die Zelllinien wurden über maximal 20 Passagen subkultiviert.

Die Frequenz des Mediumwechsels ist abhängig vom Metabolismus und Wachstumsgeschwindigkeit und unterscheidet sich daher stark von Zelllinie zu Zelllinie. Ein Farbumschlag des im RPMI 1640 Medium enthaltenen Indikators Phenolrot zeigt eine Veränderung der Mediumzusammensetzung und somit den Zeitpunkt für einen Mediumwechsel an.

Die Experimente wurden mit Zellen durchgeführt, die zu etwa 60-80% im konfluenten Stadium waren. Nach Ablösen der Zellen mit einer Accutaselösung wurde die Zellsuspension in 8 ml aufgenommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem VM mehrmals resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Im Anschluss erfolgte die Aussaat definierter Zellzahlen.

Die Zellzahl pro ml wurde mittels Zählung am Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden 10 µl der Zellsuspension auf die mit einem Deckgläschen abgedeckte Neubauerkammer überführt und 8 Quadrate der Größe 1 mm² ausgezählt, mit dem Kammerfaktor 10⁴ multipliziert und das arithmetische Mittel berechnet. Aus der errechneten Zellzahl pro ml wurden die entsprechenden Volumina errechnet, um definierte Zellzahlen in Zellkulturgefäßen auszusäen. Nach der Aussaat der Zellen erfolgte eine Inkubation für 24 h, während der die Zellen adhären. Anschließend erfolgte die jeweilige Behandlung.

2.2.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur mit Hilfe der Röntgenbestrahlungsanlage X-RAD 320iX (320 keV, 10 mA, Dosisrate 1,2 Gy/min, Filterung 0,5 mm Cu und 0,5 mm Al) im strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ). Die Bestrahlungen erfolgten mit Einzeldosen von 1 Gy, 2 Gy und 4 Gy.

2.2.3 Behandlung der Zellen

Cisplatin: Das in dieser Untersuchung verwendete Chemotherapeutikum Cisplatin (*cis*-Diammindichloroplatin, CDDP; MW: 300,05 g/mol) wurde in der Zytostatikazubereitung des Universitätsklinikums Marburg in Volumina von 1 ml und einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml zur Verfügung gestellt. Die Lagerung der Lösung erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Die Cisplatin-Stammlösung wurde unter Herstellung einer Zwischenverdünnung von 1 mM mit sterilem Wasser (Aqua ad iniectabilia) in Mikroreaktionsgefäßen auf die benötigten Konzentrationen zur Arbeitslösung verdünnt.

Zur Behandlung der Zellen wurde die CDDP-Arbeitslösung direkt in die Zellkulturgefäße gegeben, die 4 ml Medium beinhalten. Die Behandlungsschemata, sowie die verwendeten CDDP-Konzentrationen der verschiedenen Versuche sind im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben.

NVP-BEZ235: Der duale Inhibitor NVP-BEZ235 (Dactolisib) mit einem Molekulargewicht von 469,55 g/mol, wurde in Pulverform bezogen und nach Angaben des Herstellers in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 500 µM gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung von 50 nM wurde die Stocklösung für die jeweiligen Versuche durch Verdünnung in Zellkulturmedium jeweils frisch hergestellt.

Der Inhibitor wurden direkt in die Zellkulturgefäße gegeben, die 4 ml Medium beinhalten. Die Behandlungsschemata der verschiedenen Versuche sind jeweils dem Ergebnisteil dieser Arbeit zu entnehmen.

2.2.4 Koloniebildungstest

Das Überleben der Zellen wurde mittels des Koloniebildungstests bestimmt. Dieser Test basiert auf der Fähigkeit von einzelnen Zellen, sich unbegrenzt mitotisch zu teilen und Kolonien zu bilden. Diese Untersuchung wurde erstmal 1956 von Puck und Marcus im Zusammenhang mit Bestrahlungsexperimenten beschrieben und ist heute der methodische Standard für *in-vitro* Messungen des klonogenen Überlebens von Zellen (Puck und Marcus 1956).

Je nach Linie sind unbehandelte Zellen unterschiedlich effizient in der Lage eine Kolonie zu bilden. Vor Durchführung der Experimente war daher für jede Zelllinie die sogenannte Platierungseffizienz (PE) zu bestimmen (Tab. 6). Basierend auf dieser PE war für jede Zelllinie festzulegen, wieviel Zellen pro Zellkulturschale mit dem Durchmesser von 6 cm ausgesät werden müssen, um auch nach Behandlung eine ausreichende Zahl an Kolonien erwarten zu können (Tab. 6).

Tab. 6: Parameter für den Kolonietest

Zelllinie HPV+	PE (%)	Aussaat	Zelllinie HPV-	PE (%)	Aussaat
UD-SCC-2	20-30	600	UM-SCC-3	40-50	700
UM-SCC-47	10-20	600	UM-SCC-6	10-20	750
UM-SCC-104	5-10	1000	UM-SCC-11b	10-20	550
UPCI:SCC154	5-10	1000	UT-SCC-33	30-40	700
UPCI:SCC152	10-20	2200	Cal33	30-40	450
93VU-147T	10-20	1100	FaDu	30-40	500

Bei Erreichen der kritischen Größe wurden die Kolonien fixiert. Dazu war erforderlich, dass bei jedem Versuch mit Hilfe des Lichtmikroskops überprüft wurde, wann dieser Zeitpunkt erreicht war. Die Inkubation der Zellen variierte daher nach Behandlung zwischen 6 bis maximal 28 Tagen. Für die Fixierung wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und nachfolgend mit einer Kristallviolett-Färbelösung (0,1% Kristallviolett, 10% Formaldehyd) überschichtet. Die Fixation erfolgte durch Formaldehyd, die Färbung der Kolonien durch den Farbstoff Kristallviolett. Nach Entfernen der Färbelösung, sowie dem Waschen der Zellen in voll-entsalztem Wasser, wurden die Kolonien an der Luft getrocknet.

Nach Fixierung wurden die Kolonien mithilfe von Lichtmikroskop und Leuchttisch ausgewertet. Ausgeschlossen wurden dabei jene Mikrokolonien, die aus Zellen entstehen, die nach Behandlung noch einige wenige Teilungen durchlaufen und dann irreversibel ihr Proliferationsvermögen verlieren. Dies stellt insbesondere nach Bestrahlung die dominierende Form des Zellabsterbens dar.

Aus der Zahl der Kolonien nach Behandlung PE(Behandlung) konnte nach Normierung auf die PE der unbehandelten Zellen, die jeweilige Überlebensfraktion, ÜF, der Zellen berechnet werden mit $\text{ÜF} = \text{PE}(\text{Behandlung}) / \text{PE}(\text{Kontrolle})$.

2.2.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Daten der einzelnen Untersuchungen in Excel übertragen. Die Berechnung des arithmetischen Mittelwerts, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) wurden ebenfalls mit dieser Software berechnet.

Im Anschluss wurden die Daten für die weitere statistische Auswertung und zur Generierung der Abbildungen in das Programm Graph Pad Prism überführt. Bei einem P-Wert $<0,05$ gelten die Daten als statistisch signifikant bei $P <0,001$ als hoch signifikant, was in den Abbildungen mit den Symbolen (* bzw. **) gekennzeichnet wird.

3 ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von Cisplatin

Erstes Ziel der Arbeit war es, für die verschiedenen HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zelllinien die Cisplatinempfindlichkeit zu bestimmen. Die Zellen wurden dafür einen Tag nach Aussaat für 24 h bei verschiedenen Konzentrationen mit Cisplatin (CDDP) inkubiert, dann das Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 12 bis 16 Tage im Brutschrank gehalten, bis die Kolonien der überlebenden Zellen eine Mindestgröße von 50 Zellen erreicht hatten (Abb. 6A). Wie für die HPV-neg. Linie

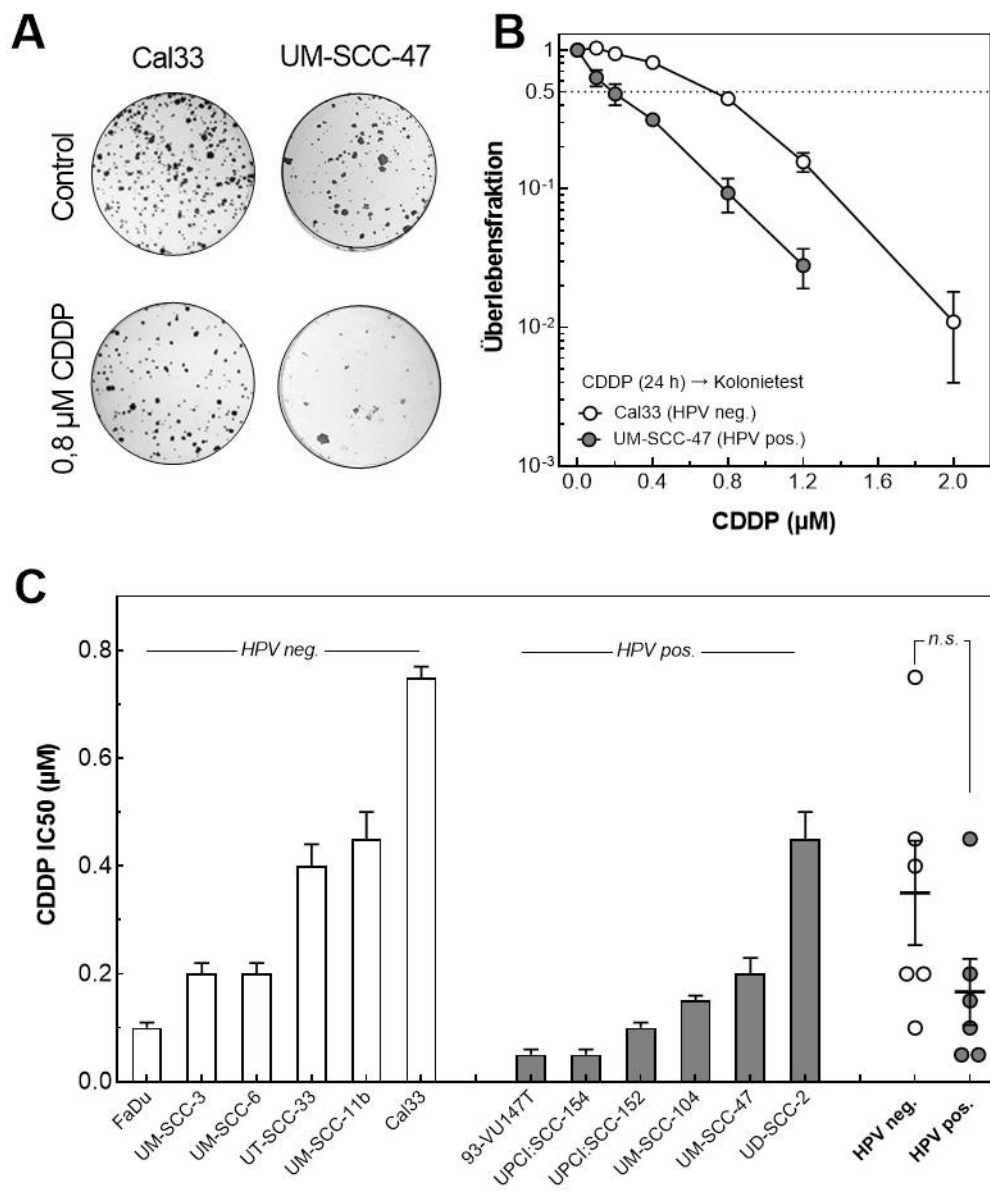


Abb. 6: Cisplatinempfindlichkeit von HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen

Inkubation von HPV-neg. und -pos. Zelllinien für 24h mit CDDP bei einer Konzentration von 0,05 bis 2 µM. A) Nachweis des Zellüberlebens mittels Koloniebildungstest. B) Wirkung von CDDP auf die Überlebensfraktion der HPV-neg. Linie Cal33 sowie der HPV-pos. Linie UM-SCC-47 mit Bestimmung der IC50. C) IC50 für CDDP für alle getesteten HPV-neg. und pos. HNSCC-Zelllinien. Vergleich mittels t-Test.

Cal33 und die HPV-pos. Linie UM-SCC-47 in Abb. 6B dargestellt, nimmt die Überlebensrate der Zellen mit zunehmender CDDP-Konzentration ab. Aus diesen Werten wurde jeweils die Cisplatin-Konzentration IC₅₀ bestimmt, bei der die Überlebensfraktion auf 50% reduziert wurde. Für die Cal33-Zellen ergab sich ein IC₅₀ von 0,75 μ M CDDP, für die UM-SCC-47-Zellen eine Konzentration von 0,20 μ M.

Abb. 6C zeigt die Zusammenstellung aller IC₅₀-Werte. Sowohl für HPV-neg. als auch HPV-pos. Zelllinien ergab sich eine breite Verteilung der IC₅₀ Werte. Im Mittel sind dabei HPV-pos. Zelllinien mit einer IC₅₀=0,17 \pm 0,07 μ M etwas empfindlicher als die HPV neg. Linien mit IC₅₀=0,35 \pm 0,10 μ M, was aber statistisch nicht signifikant ist (P=0,112).

3.2 Verstärkung von CDDP durch BEZ235

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges durch den dualen Inhibitor BEZ235 auf die Wirkung von CDDP hat. Dabei war vorab zu testen, wie diese beiden Substanzen zu kombinieren sind, um den stärksten Effekt zu erreichen. Dieser Versuch wurde mit den HPV-pos. Zellen UD-SCC-2 durchgeführt, für die zuvor für CDDP eine IC₅₀ von 0,50 μ M bestimmt wurde (Abb. 6C). Die CDDP-Behandlung sollte mit einer BEZ235-Behandlung von 50 nM kombiniert werden. Diese Konzentration wurde gewählt, weil in einer vorangehenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass dadurch der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg effektiv gehemmt wird (Schötz et al. 2020).

Eine Inkubation mit BEZ235 allein bewirkte nur eine minimale Abnahme der Überlebensfraktion der UD-SCC-2-Zellen (Abb. 7A). Bei Kombination mit CDDP wurde

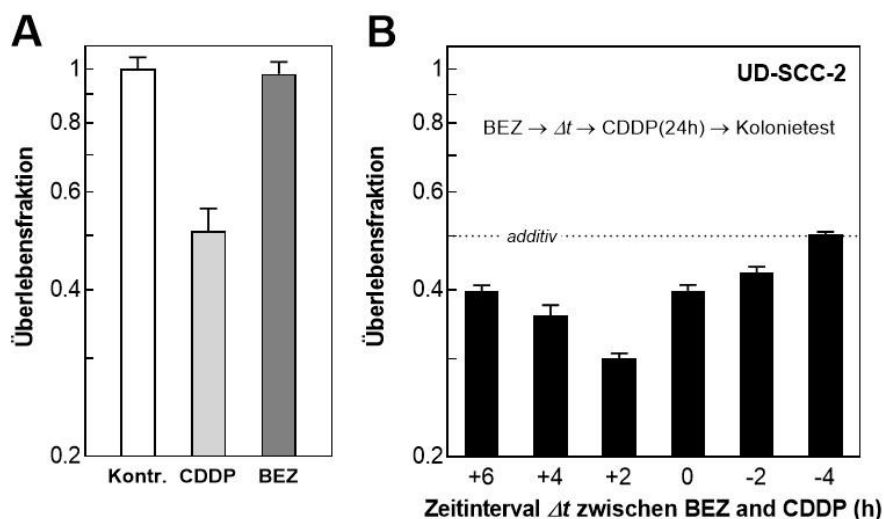


Abb. 7: Verstärkung von CDDP durch BEZ235

A) Alleinige Wirkung von BEZ (50 nM) und CDDP (0,50 μ M) auf das Zellüberleben von UD-SCC-2-Zellen. B) Wirkung von BEZ und CDDP in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen den beiden Behandlungen.

BEZ235 entweder +6, +4 oder +2 h zuvor bzw. gleichzeitig dazugegeben, oder erst -2 oder -4 h danach (Abb. 7B). Die CDDP-Behandlung dauerte immer 24 h. Anschließend wurde das Medium von den Zellen genommen und gegen Substanz-freies Medium ausgetauscht.

Die gestrichelte Linie bei der Überlebensrate von 0,49 zeigt den rein additiven Effekt der beiden Behandlungen (Abb. 7B). Die größte Verstärkung der CDDP-Wirkung ergab sich, wenn BEZ235 2 Stunden vor Beginn der CDDP-Behandlung dazugegeben wurde mit einer Abnahme der Überlebensfraktion auf 0,30. Für andere Intervalle wurde jeweils ein geringerer Effekt erzielt und bei Gabe von BEZ235 erst 4 Stunden nach Beginn der CDDP-Behandlung wurde nur ein rein additiver Effekt beider Behandlungen gemessen. Für weitere Untersuchungen wurde damit festgelegt, dass die Behandlung

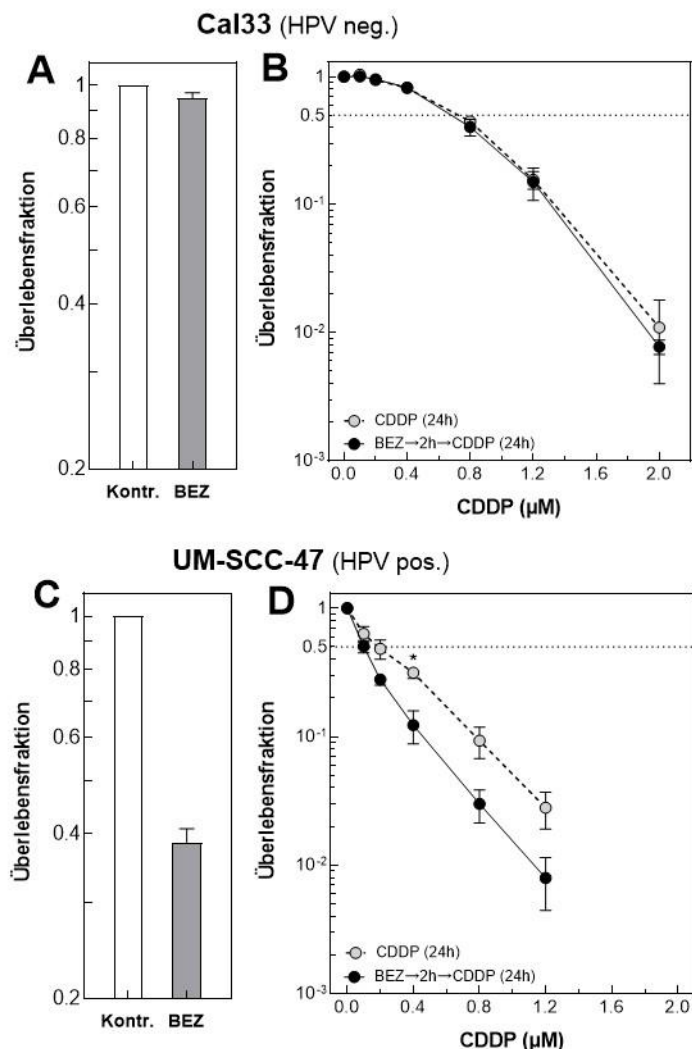


Abb. 8: Verstärkung von CDDP durch BEZ235 in Cal33 und UM-SCC-47 Zellen

Cal33 und UM-SCC-47-Zellen wurden 2h nach Vorbehandlung mit 50 nM BEZ235 für 24h mit CDDP bei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach Austausch gegen Substanz-freies Medium erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für das Wachstum der Kolonien. A und C; Alleinige Wirkung von BEZ235 (50 nM) auf das Zellüberleben. B und D; Wirkung einer Vorbehandlung mit BEZ235 auf die CDDP-Empfindlichkeit.

mit BEZ235 2 Stunden vor der Cisplatininkubation gestartet werden musste, um eine optimale Verstärkung des CDDP-Effektes zu erreichen.

3.3 Verstärkung von CDDP durch BEZ235 in Abhängigkeit vom HPV-Status

Es sollte geklärt werden, ob die Verstärkung des CDDP-Effektes durch BEZ235 vom HPV-Status der HNSCC-Zelllinien abhängt. Für diese Versuche wurde BEZ235 (50 nM) jeweils 2 Stunden vor Beginn der CDDP-Behandlung gegeben, wie es zuvor für die UD-SCC-2-Zellen als optimale Kombination gemessen wurde (Abb. 7B).

Abb. 8 zeigt die Wirkung von BEZ235 auf die CDDP-Empfindlichkeit der HPV-neg. Zellen Cal33 sowie der HPV-pos. Zellen UM-SCC-47. Bei den Cal33-Zellen hat BEZ235 allein keinen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben und bewirkt auch

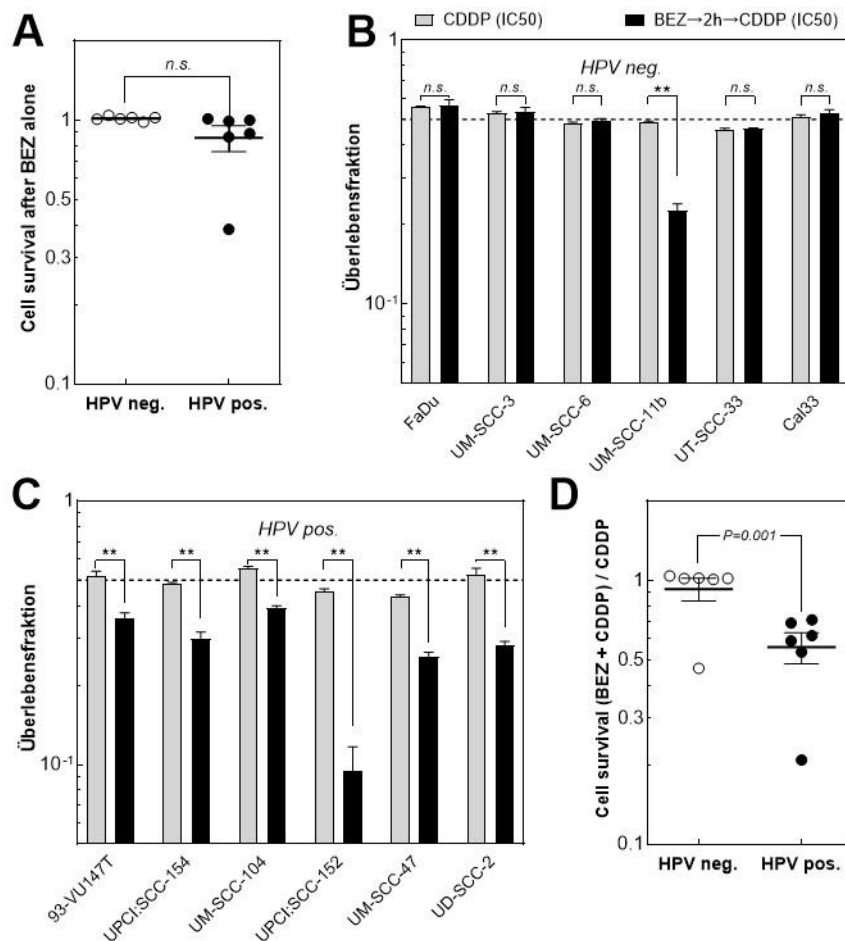


Abb. 9: Verstärkung von CDDP durch BEZ235 in HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen

Die Zellen wurden zunächst für 2 h bei 50 nM BEZ235 vorbehandelt und anschließend für 24h mit CDDP inkubiert. Die CDDP Inkubation erfolgte dabei bei der zuvor bestimmten IC50 (Abb. 1). A) Alleinige Wirkung von BEZ235 (50 nM) auf das Zellüberleben. B und C) Wirkung der Vorbehandlung mit BEZ235 in Kombination mit CDDP (IC50) auf die Überlebensrate von HPV -neg. bzw. -pos. HNSCC-Zelllinien. D) Überlebensrate der HPV-neg. und -pos. Zelllinien nach kombinierter Behandlung mit BEZ und CDDP nach Normierung auf die Überlebensrate nach CDDP allein. Paarweise Vergleiche jeweils mittels t-Test.

keine Änderung der CDDP-Empfindlichkeit (Abb. 8A und B). Im Gegensatz dazu wurde für die UM-SCC-47-Zellen gemessen, dass BEZ235 allein bereits eine deutliche Abnahme der Überlebensrate bewirkte (Abb. 8C). Bei dieser Zelllinie wurde durch eine Vorbehandlung mit BEZ235 ebenfalls eine deutlich gesteigerte Wirkung der CDDP-Behandlung erreicht (Abb. 8D). Während ohne Vorbehandlung mit BEZ235 die Überlebensrate nach 24-stündiger Inkubation mit 0,2 μM CDDP noch bei ca. 50% liegt, nahm sie bei Vorbehandlung mit BEZ235 auf ca. 28% ab ($P=0,001$).

Abb. 9. zeigt die Wirkung einer zweistündigen Vorbehandlung mit BEZ235 auf die CDDP-Empfindlichkeit für alle sechs HPV-neg. und sechs HPV-pos. Zelllinien. Hierbei erfolgte die CDDP-Inkubation immer bei der Konzentration IC_{50} , so dass nach der CDDP-Behandlung allein die Überlebensrate für alle Zelllinien ca. 50% betrug, so dass ein einfacher Vergleich bezüglich der verstärkenden Wirkung von BEZ235 möglich war (Abb. 9B und C). Die Wirkung von BEZ235 allein zeigte im Mittel für HPV-pos. Zellen einen etwas größeren Effekt, der aber nicht signifikant war (Abb. 9A, $P=0,135$).

In Kombination mit CDDP zeigte sich je nach HPV-Status ein deutlicher Unterschied (Abb. 9B und C). Während bei den HPV-neg. Linien bis auf die UM-SCC-11b-Zellen durch die Vorbehandlung mit BEZ235 keine weitere signifikante Abnahme der Überlebensrate erreicht wurde, war dies im Gegensatz dazu bei allen HPV-pos. Linien der Fall. Die geringste aber immer noch signifikante Abnahme wurde dabei für die HPV-pos. Linie UM-SCC-104 beobachtet und die deutlichste für die Linie UPCI:SCC-152. Bei Normierung auf die Überlebensrate nach CDDP allein ergeben sich die Werte, wie sie in Abb. 9D zusammengestellt sind. Im Mittel ergibt sich für die so normierte Überlebensrate eine hoch-signifikante ($P=0,001$) Abnahme für die HPV-pos. Zelllinien. Damit zeigen diese Daten eindeutig, dass bei den HPV-pos. Zellen die Wirkung von CDDP durch eine Vorbehandlung mit BEZ235 deutlich gesteigert werden kann, was bei den HPV-neg. Zellen bis auf eine Linie nicht der Fall ist.

3.4 Wirkung von BEZ235 auf die Kombination aus CDDP und Strahlung

In einem weiteren Schritt sollte geklärt werden, welche Wirkung eine Vorbehandlung mit BEZ235 auf die kombinierte Behandlung mit CDDP und Photonenstrahlen hat. Diese Kombination wird sehr häufig bei der Therapie von HNSCC eingesetzt.

Abb. 10 zeigt die Wirkung dieser Kombination auf zwei HPV-neg. und -pos. Linien. Bei der Behandlung mit CDDP wurde jeweils IC_{50} eingesetzt, so dass durch CDDP allein die Überlebensrate jeweils auf 50% reduziert wurde (Abb. 10A, C, E und G).

Wurde CDDP mit der Photonenbestrahlung kombiniert, so ergab sich für die Wirkung von CDDP auf die Strahlenempfindlichkeit der Zelllinie ganz unterschiedliche Effekte.

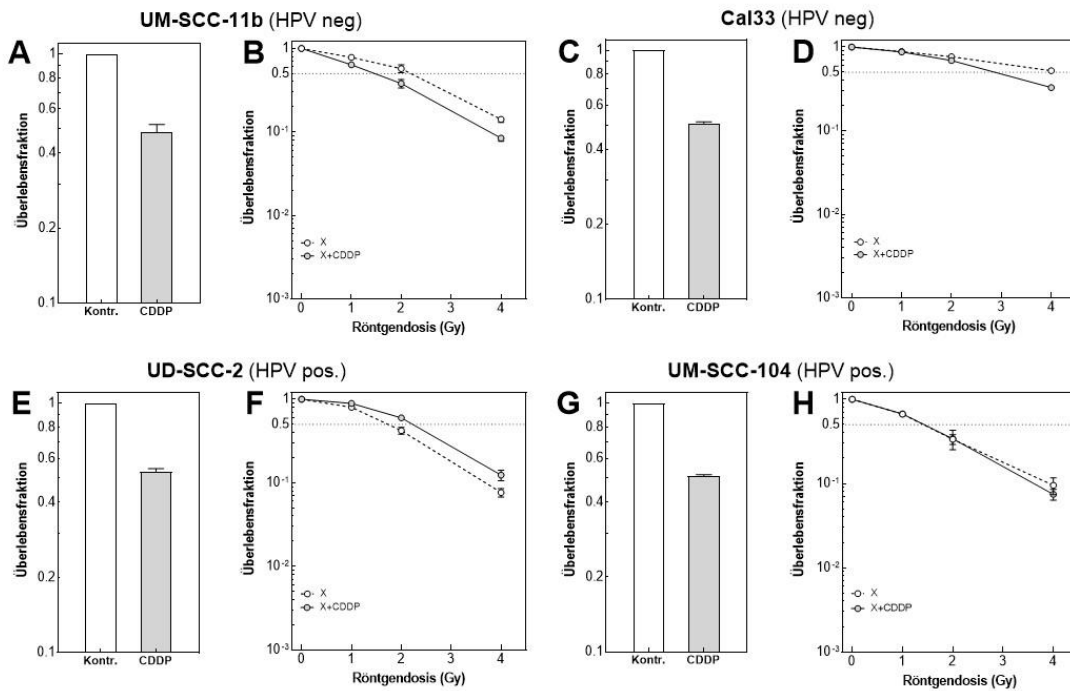


Abb. 10: Wirkung von CDDP auf die Strahlenempfindlichkeit

CDDP wurde den Zellen unmittelbar vor der Bestrahlung zugesetzt mit jeweils der entsprechenden IC50. Nach 24 Stunden wurde das Medium ausgewechselt und die Zellen für den Kolonietest weiter inkubiert. A, C, E, G) Wirkung von CDDP allein auf die Überlebensrate. B, D, F, H) Wirkung von CDDP auf die Überlebensrate nach Photonenbestrahlung.

Für die HPV-neg. Linie UM-SCC-11b wird eine geringe Strahlensensibilisierung bei Kombination mit CDDP beobachtet (Abb. 10B). Bei der HPV neg. Linie Cal33 zeigt sich ebenfalls eine geringe Sensibilisierung, die aber erst bei 4 Gy erkennbar ist (Abb. 10D). Bei der HPV-pos. Linie UD-SSC-2 war dagegen sogar eine Verminderung der Strahlenempfindlichkeit festzustellen, die sich bereits bei einer Strahlendosis von 2 Gy deutlich auswirkte (Abb. 10F) und bei der HPV-pos. Linie UM-SCC-104 hatte CDDP keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit (Abb. 10H).

Für die Überlebensrate von 50% wurde der jeweilige Dosismodifikationsfaktor DMF berechnet. Hierbei ergaben sich für die vier Linien die Werte $DMF_{50\%}$ zwischen 0,8 und 1,5 (Tab. 7). Damit zeigte sich für CDDP insgesamt ein sehr heterogenes Bild, wonach durch CDDP für zwei HNSCC-Zelllinien eine geringe Strahlensensibilisierung erreicht wird, dagegen für zwei weitere keine oder sogar eine Strahlenresistenz bewirkt wird.

Ein wesentlich homogeneres Bild ergab sich, wenn die Zellen vor der Bestrahlung mit BEZ235 vorbehandelt wurden (Abb. 11). Zur Vorbehandlung wurde den Zellen BEZ235 2 Stunden vor der Bestrahlung dazugegeben.

Die Behandlung mit BEZ235 allein hatte keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die jeweilige Überlebensrate (Abb. 11A, C, E und G). Die Vorbehandlung mit BEZ235 ergab aber für alle vier getesteten Linien eine klare Steigerung der Strahlenempfindlichkeit (Abb. 11B, D, F und H). Für den $DMF_{50\%}$ ergaben sich die Werte

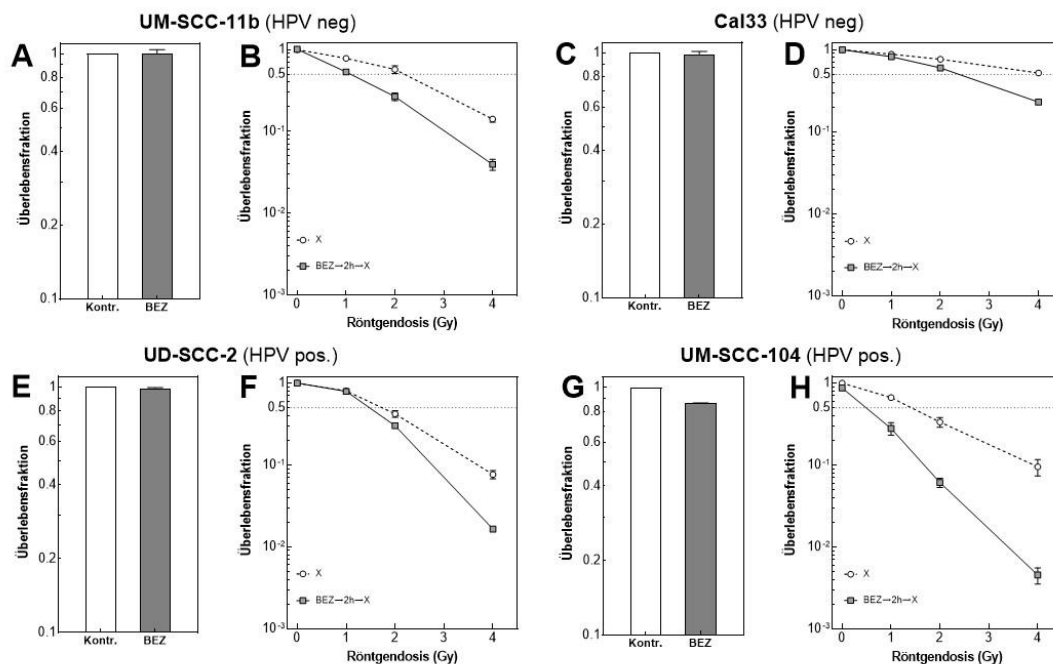


Abb. 11: Wirkung einer Vorbehandlung mit BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit

Die Zellen wurden für 2 Stunden mit 50 nM BEZ235 vorbehandelt und dann bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde das Medium ausgewechselt und die Zellen für den Kolonietest weiter inkubiert. A, C, E, G) Wirkung von BEZ235 allein auf die Überlebensrate. B, D, F, H) Wirkung der Vorbehandlung mit BEZ235 auf die Überlebensrate nach Photonenbestrahlung.

zwischen 1,3 und 3,0 (Tab. 7). Die stärksten Effekte wurden damit für die Linien UM-SCC-104 und UM-SCC-11b beobachtet und ein mittlerer bzw. geringerer für die Linien Cal33 und UD-SCC-2. Insgesamt zeigen diese Daten, dass für alle vier getesteten HNSCC-Linien durch eine Vorbehandlung mit BEZ235 eine Strahlensensibilisierung erreicht wird, die bei drei Linien sogar sehr stark bzw. ausgeprägt ausfällt und bei der vierten Linie (UD-SCC-2) gering ist.

Abb. 12 zeigt die Wirkung einer Vorbehandlung mit BEZ235 auf die Strahlensensibilisierung durch CDDP. D.h. nach Vorbehandlung mit 50 nM BEZ235 für zwei Stunden erfolgte eine Bestrahlung mit und ohne gleichzeitige Inkubation mit CDDP. Für die CDDP-Behandlung wurde wiederum die jeweilige IC50 gewählt.

Wie bereits in Abb. 9 gezeigt, ist die Wirkung von BEZ235 auf CDDP allein je nach Zelllinie und HPV-Status unterschiedlich. Während in der HPV-neg. Linie Cal33 die Wirkung von CDDP durch eine Vorbehandlung nicht gesteigert wird (Abb. 12C), wurde für die HPV neg. Linie UM-SCC-11b eine Steigerung beobachtet (Abb. 12A), sowie auch für die beiden HPV-pos. Linien UD-SCC-2 und UM-SCC-104 (Abb. 12 E und G).

Es sollte vor allem geklärt werden, wie sich bei den verschiedenen HNSCC-Zelllinien eine Vorbehandlung mit BEZ235 auf die Wirkung von CDDP auf die Strahlenempfindlichkeit auswirkt. Hier zeigt sich ein überraschend homogenes Bild. In

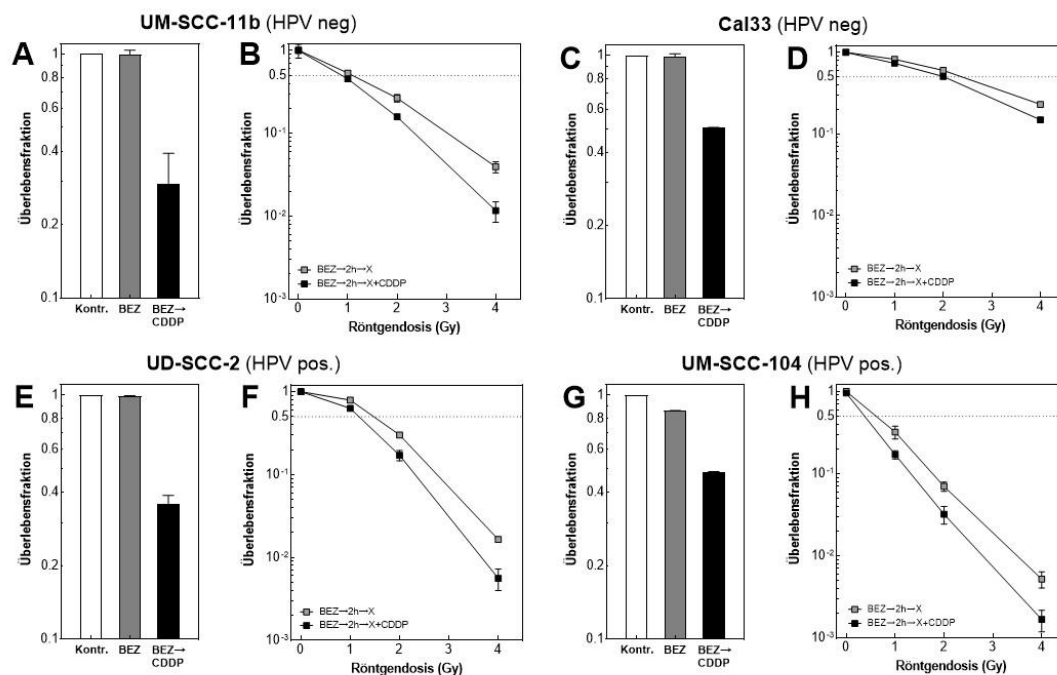


Abb. 12: BEZ235 in Kombination mit CDDP und Strahlung

Die Zellen wurden für 2 Stunden mit 50 nM BEZ235 vorbehandelt und bestrahlt bzw. zusätzlich mit CDDP behandelt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde das Medium ausgewechselt und die Zellen für den Kolonietest weiter inkubiert. A, C, E und G) Wirkung der Vorbehandlung mit BEZ235 allein oder in Kombination mit CDDP auf die Überlebensrate. B, D, F und H) Wirkung von CDDP auf die Strahlenempfindlichkeit der Photonenbestrahlung bei Vorbehandlung mit BEZ235.

allen vier untersuchten HNSCC-Linien bewirkt CDDP nach Vorbehandlung mit BEZ235 eine Steigerung der Strahlenempfindlichkeit (Abb. 12B, D, F, H). Das Ausmaß dieses Effektes variiert je nach Zelllinie etwas. Für den $DMF_{50\%}$ ergeben sich die Werte zwischen 1,3 und 1,7 (Tab. 7). Diese Daten zeigen, dass bei einer Vorbehandlung mit BEZ235 durch CDDP immer eine klare Strahlensensibilisierung erreicht wurde. Auffallend war auch, dass vor allem für die beiden HPV-pos. Zelllinien eine deutliche Strahlensensibilisierung erreicht wurde, während ohne Vorbehandlung kein Effekt oder sogar eine Radioprotektion festzustellen war (Tab. 7). Damit unterscheidet sich dieses Ergebnis deutlich von den unterschiedlichen und geringen Effekten von CDDP auf die Strahlensensibilisierung, wie sie ohne Vorbehandlung erzielt wurden (Abb. 10).

Tab. 7: $DMF_{50\%}$ für die kombinierte Behandlung mit BEZ235, CDDP und Strahlung

Behandlung	UM-SCC-11b	Cal33	UD-SCC-2	UM-SCC-104
X+CDDP	1,5	1,4	0,8	1,0
BEZ+X	2,0	1,7	1,3	3,0
BEZ+X+CDDP	1,4	1,3	1,4	1,7

$DMF_{50\%}$, Dosismodifikationsfaktor bei der Überlebensrate von 50%

Um diesen Effekt in seiner Bedeutung noch einmal herauszustellen, wurden die Werte, wie sie für die verschiedenen Zelllinien für die Strahlendosis von 2 Gy erzielt

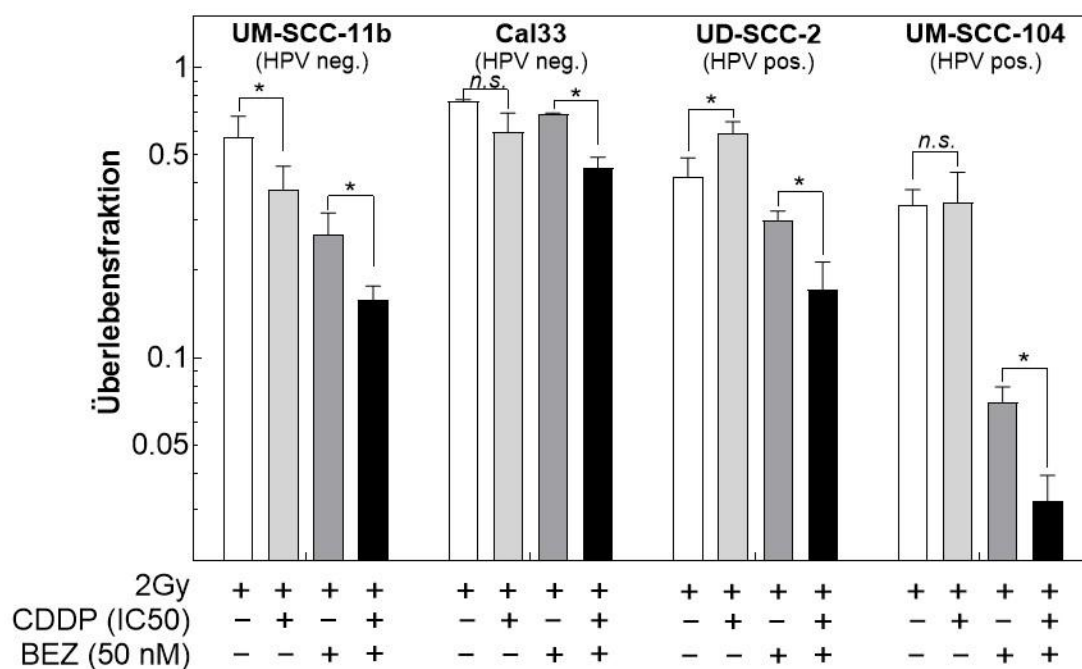


Abb. 13: BEZ235 in Kombination mit CDDP und 2Gy

Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und zusätzlich mit CDDP bei jeweils der IC50 inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit und ohne 50 nM BEZ235 für 2 Stunden vor der Bestrahlung behandelt. Daten aus Abb. 12. Paarweise Vergleiche jeweils mittels t-Test.

wurden, noch einmal in Abb. 13 zusammengestellt. Die Abb. 13 zeigt zum einen die Überlebensrate der verschiedenen Zelllinien nach einer Bestrahlung mit 2 Gy (Abb. 13, weiße Säule). Die nächste, hellgraue Säule zeigt an, wie sich je nach Zelllinie eine gleichzeitige Inkubation mit CDDP bei jeweils dem IC50 auswirkt. Wie oben bereits dargestellt, zeigt sich hier ein sehr heterogenes Bild. Während für die UM-SCC-11b Zellen eine weitere Abnahme der Überlebensfraktion gemessen wird, zeigt sich bei den Linien Cal33 und UM-SCC-104 keine signifikante Änderung, wohingegen bei der UD-SCC-2 sogar eine Zunahme festzustellen ist. Wurden die Zellen vor der Bestrahlung mit 2 Gy mit BEZ235 behandelt zeigte sich dagegen für alle Linien eine klare wenn auch bei Cal33 nur geringe Abnahme der Überlebensfraktion (Abb. 13, dunkelgraue Säulen). Wurden die mit BEZ235 vorbehandelten Zellen gleichzeitig zur Bestrahlung mit 2 Gy auch mit CDDP inkubiert, so bewirkte die CDDP-Behandlung stets eine weitere signifikante Abnahme der Überlebensfraktion (Abb. 13, schwarze Säulen). Damit macht diese Darstellung noch einmal deutlich, dass bei einer Vorbehandlung mit BEZ235 durch CDDP immer eine Strahlensensibilisierung erreicht wird. Wohingegen ohne Vorbehandlung dies durch CDDP nur sehr eingeschränkt der Fall ist.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie sich bei HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen eine Vorbehandlung mit dem dualen PI3K/Akt/mTOR-Inhibitor BEZ235 auf die Kombination aus Cisplatin allein und die Kombination mit einer Bestrahlung auswirkt.

Diese Untersuchungen wurden an insgesamt sechs HPV-neg. sowie sechs HPV-pos. Zelllinien durchgeführt. Mit dieser Zahl an verschiedenen Linien wurde der bekannterweise großen Heterogenität dieser Zellentität nach Bestrahlung bzw. CDDP-Behandlung Rechnung getragen (Kasten-Pisula et al. 2011, Nagel et al. 2013), wie auch durch zahlreiche Arbeiten aus dem eigenen Labor demonstriert (Arenz et al. 2014, Degenhardt et al. 2020, Lerch et al. 2020, Ziemann et al. 2015). Die ausgewählten HPV-neg. (FaDu, UM-SCC-3, UM-SCC-6, UM-SCC-11b, UT-SCC-33, Cal33) bzw. HPV-pos. HNSCC-Zelllinien (93VU-147T, UD-SCC-2, UM-SCC-47, UM-SCC-104, UPCI:SCC152, UPCI:SCC154) gehören zu den in der Forschung etablierten Zelllinien, deren Eignung für präklinische Untersuchungen bereits in zahlreichen Untersuchungen belegt wurde (Arenz et al. 2014, Busch et al. 2016, Kasten-Pisula et al. 2011, Lerch et al. 2020, Rieckmann et al. 2013).

4.1 Cisplatinempfindlichkeit der HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen

Bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber CDDP zeigten sowohl HPV-neg. als auch HPV-pos. Zelllinien eine große Heterogenität (Abb. 6). Für diese Versuche wurden die Zellen bei verschiedenen Konzentrationen CDDP für 24 h inkubiert und anschließend

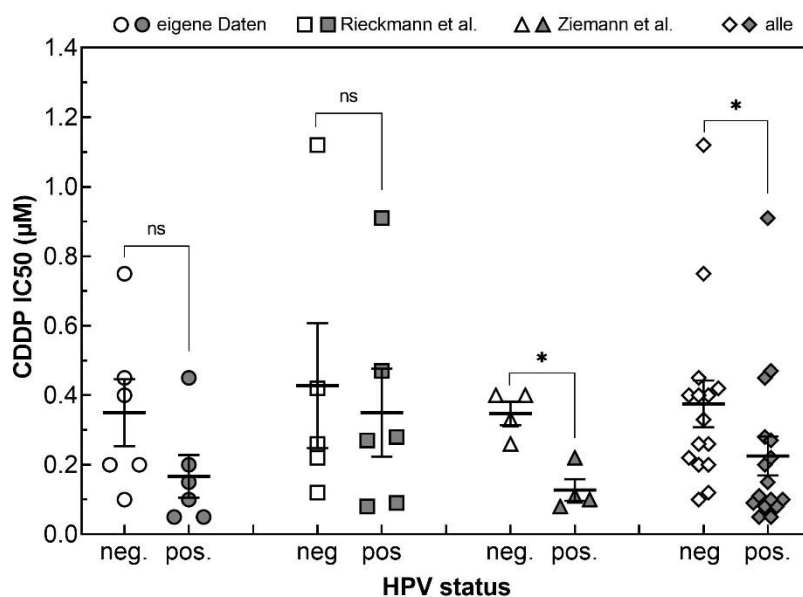


Abb. 14: CDDP-Empfindlichkeit von HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen

IC50-Werte aus dieser Arbeit im Vergleich zu den Daten aus anderen Publikationen. Die Zellen wurden jeweils für 24h bei unterschiedlichen CDDP-Konzentrationen inkubiert und anschließend für den Kolonietest ausplattiert. Paarweise Vergleiche jeweils mittels t-Test.

für den Koloniebildungstest ausplattiert. Die IC₅₀ variierte dabei insgesamt von 0,05 bis 0,75 µM. Bei Vergleich der beiden Entitäten zeigt sich zwar im Mittel für HPV-pos. Zellen eine etwas größere Empfindlichkeit als für HPV-neg. Zellen, was aber nicht signifikant ist (IC₅₀=0,17±0,07 µM vs. IC₅₀=0,35±0,10 µM, P=0,112).

Sehr ähnliche Ergebnisse wurden von Busch et al. berichtet mit ebenfalls einer nicht signifikanten, höheren CDDP-Empfindlichkeit für HPV-pos. Zellen (Busch et al. 2016). Im Gegensatz dazu zeigte sich in einer vorangehenden Studie aus dem eigenen Labor eine signifikant höhere CDDP-Empfindlichkeit für HPV-pos. Zellen (Ziemann et al. 2015). Die Zusammenfassung dieser Daten macht noch einmal die breite Streuung der HNSCC-Zellen bezüglich der CDDP-Empfindlichkeit deutlich mit insgesamt einer klar signifikant höheren Empfindlichkeit für die HPV-pos. Zelllinien (Abb. 14, P=0,029).

Arbeiten, in denen das Zellüberleben mittels Vitalitätstest bestimmt wurde, ergaben dagegen eine klar geringere CDDP-Empfindlichkeit für die HPV-pos. Zellen (Leonard et al. 2019, Nagel et al. 2013). Dieser Widerspruch macht deutlich, dass der Vitalitätstest nur sehr begrenzt dafür geeignet ist, die CDDP-Empfindlichkeit tatsächlich abzubilden. Dies liegt vermutlich daran, dass der Vitalitätstest ganz wesentlich durch die Proliferationsgeschwindigkeit der jeweiligen Zellen bestimmt wird und daher die im Mittel höhere Proliferationsgeschwindigkeit der HPV-pos. Zellen bei diesem Test eine geringere CDDP-Empfindlichkeit vortäuscht.

Die Ursachen für die höhere CDDP-Empfindlichkeit der HPV-pos. Zellen sind bisher noch nicht bekannt. Es könnte sein, dass hierfür der Defekt in der HR verantwortlich ist, wie er in einer Arbeit des Labors für HPV-pos. Zellen gezeigt wurde (Ziemann et al. 2017). HR ist ein Reparaturprozess, der ganz entscheidend an der Beseitigung der bei der Behandlung mit CDDP entstehenden DSB beteiligt ist (Chen et al. 2016, Damia und Broggin 2019, Rocha et al. 2018, Rodríguez und D'Andrea 2017).

Bereits in mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass Zellen mit einem Defekt im HR eine hohe Empfindlichkeit gegenüber CDDP aufweisen (Birkelbach et al. 2013, Huang et al. 2013, Tavecchio et al. 2008). So wurde gefunden, dass ein Knock-Down von Rad51, welches ein zentrales Protein des HR ist, eine deutliche Zunahme der CDDP-Empfindlichkeit bewirkt (Ito et al. 2005). Für Lungenkarzinomzellen wurde zudem beobachtet, dass Linien mit einem Defekt in der Bildung von Rad51-Foci nach CDDP-Behandlung, was auf einen Defekt in der HR deutet, ebenfalls eine erhöhte CDDP-Empfindlichkeit aufweisen (Birkelbach et al. 2013).

Es wäre somit für HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen zu untersuchen, wie sich ein Knock-Down von Rad51 auf die CDDP-Empfindlichkeit auswirkt. Sollte die höhere CDDP-Empfindlichkeit der HPV-pos. Zellen an einem Defekt in der HR liegen, so dürfte

der Knock-Down von Rad51 bei diesen Zellen keine weitere Steigerung der CDDP-Empfindlichkeit bewirken, wohl aber bei den HPV-neg. HNSCC-Zellen.

4.2 Einfluss von BEZ235 auf die Cisplatinempfindlichkeit

Mit dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass durch eine Vorbehandlung mit dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ235 die Empfindlichkeit gegenüber CDDP gesteigert werden kann. Allerdings zeigte sich dieser Effekt nur für HPV-pos. und bis auf eine Ausnahme nicht für HPV-neg. Zellen (Abb. 8 und 9). Hierbei wurde BEZ235 2 h vor der CDDP-Behandlung gegeben, weil sich hier die größte Verstärkung zeigte (Abb. 7).

Für BEZ235 wurde in einer vorangehenden Arbeit aus dem Labor gezeigt, dass durch diesen Inhibitor die DSB-Reparatur unterdrückt wird, wobei dies aber nur für die Reparatur mittels NHEJ und nicht für die HR gilt (Schötz et al. 2020). D.h. bei einer Inkubation mit BEZ235 wird die Reparatur der durch CDDP-induzierten DSB mittels NHEJ unterdrückt.

Das NHEJ ist insbesondere an der Reparatur der DSB beteiligt, die durch die Intracrosslinks (ICL) induziert werden (Damia und Brogini 2019). Bei Unterdrückung des NHEJ durch BEZ235 sollten somit DSB vermehrt durch die HR erfasst werden. In HPV-pos. Zellen, in denen dieser Reparaturprozess defekt ist, könnte dies der Grund dafür sein, dass mehr Zellen durch CDDP abgetötet werden, so wie es auch beobachtet wurde. Dagegen sollte es in den HPV-neg. Zellen keine Steigerung geben, da diese DSB durch die kompetente HR repariert werden können.

Allein für die HPV-neg. Linie UM-SCC-11b wurde nach Behandlung mit BEZ235 eine Steigerung der CDDP-Empfindlichkeit festgestellt (Abb. 9). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass für diese Zellen eine reduzierte Expression von ATM, Mre11, und H2AX gemessen wurde (Wang et al. 2012), so dass in dieser Zelllinie eine insgesamt gestörte DSB-Reparatur vorliegen sollte.

Die Kombination von BEZ235 mit CDDP wurde auch in anderen Arbeiten untersucht (Fabi et al. 2021, Huang et al. 2018, Moon du et al. 2014). Hier zeigte sich jeweils eine verstärkende Wirkung für CDDP. Allerdings wurde nur die Wirkung auf die Proliferation bestimmt, so dass keine Aussage gemacht werden kann bezüglich des Zellüberlebens, so wie es in dieser Arbeit gemessen wurde.

4.3 Wirkung von BEZ235 auf die Kombination aus CDDP und Strahlung

Eine Behandlung mit CDDP, welche die Überlebensrate allein auf 50% reduziert (IC50), hatte für die zwei HPV-neg. sowie die beiden HPV-pos. HNSCC-Zelllinien nur einen sehr geringen oder sogar gar keinen Effekt bzw. im Falle der HPV-pos. Linie UD-

SCC-2 sogar einen leicht protektiven Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit (Abb. 10). Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten aus anderen Arbeiten mit HNSCC-Zellen gut überein (Busch et al. 2016, Ziemann et al. 2015), in denen ebenfalls nur eine sehr geringe oder sogar keine Steigerung der Strahlenempfindlichkeit beobachtet wurde. Auch für andere Entitäten wurden bei Kombination von CDDP mit Bestrahlung nur sehr moderate Verstärkungsfaktoren von 1,1-1,5 gemessen (Begg et al. 1986, Iwata et al. 2020, Raaphorst et al. 1995, Rühle et al. 2017, Zhang et al. 2009). Insgesamt kann damit durch CDDP nur eine sehr geringe Steigerung der Strahlenempfindlichkeit erzielt werden. Die deutliche Steigerung der Heilungsraten, wie sie für die klinischen Studien mit HNSCC gefunden wurden (Al-Sarraf et al. 1997, Bernier et al. 2004, Mendenhall et al. 2006), müssen daher vor allem auf die additive Wirkung von CDDP und Strahlung beruhen.

Im Gegensatz dazu wurde bei Vorbehandlung mit BEZ235 für die HPV-neg. und pos. Zellen eine sehr deutliche Steigerung der Strahlenempfindlichkeit gefunden (Abb. 11). BEZ235 allein bewirkt dabei nur eine sehr geringe Abnahme der Überlebensrate. Dieser Befund entspricht damit genau den Daten, wie sie diesbezüglich aus dieser Arbeitsgruppe bereits publiziert wurden (Schötz et al. 2020).

Das entscheidende Ergebnis dieser Arbeit aber ist, dass eine Vorbehandlung mit BEZ235 die Kombination aus CDDP mit Bestrahlung deutlich verstärkt (Abb. 12, Tab. 7). Diese zeigte sich selbst bei einer Bestrahlung mit nur 2 Gy sehr klar (Abb. 13). Ohne Vorbehandlung mit BEZ235 bewirkte CDDP keine oder nur eine sehr geringe Strahlensensibilisierung (siehe oben). Besonders deutlich ist dies bei den beiden untersuchten HPV-pos. Linien UD-SCC-2 und UM-SCC-104 (Tab. 7 und Abb.13). Damit deuten diese Daten an, dass bei Vorbehandlung mit BEZ235 vor allem in HPV-pos. Zellen die Wirkung von CDDP auf die Strahlenempfindlichkeit gesteigert wird. Ursache dafür könnte sein, dass in den HPV-pos. Zellen die Wirkung von CDDP durch eine Vorbehandlung mit BEZ235 besonders gesteigert wird (Abb. 9).

Eine Verstärkung der kombinierten Behandlung mit CDDP und Bestrahlung durch BEZ235 wurde auch für die NSCLC-Zelllinie H460 beschrieben, wobei allerdings nur die Wirkung bzgl. Proliferation bestimmt wurde (Kim et al. 2014). In zahlreichen weiteren Untersuchungen wurde ebenfalls überprüft, durch welche Substanzen bzw. Inhibitoren die kombinierte Wirkung von CDDP und Strahlung verstärkt werden kann. Für NSCLC-Zellen zeigte sich, dass dies durch das Antidiabetikum Metformin erreicht werden kann (Riaz et al. 2019) und für Zervixkarzinomzellen durch den PARP1-Inhibitor Olaparib (Ijff et al. 2021). Für HNSCC-Zellen war jedoch weder durch den CHK1/2-Inhibitor Prexasertib (Zeng et al. 2020) noch durch den RAF-Inhibitor Sorafenib (Möckelmann et al. 2016) eine klare Verstärkung möglich, anders als es in

dieser Arbeit für BEZ235 beobachtet wurde.

4.4 Klinische Relevanz und Ausblick

Aktuell werden in den USA allein 154 Studien mit HNSCC-Patienten gelistet, bei denen das Ziel verfolgt wird, die bisherige Standardtherapie aus Bestrahlung und Cisplatin durch zusätzliche Komponenten zu verbessern (<https://clinicaltrials.gov/>). Diese große Anzahl macht deutlich, wie sehr es als dringlich angesehen wird, beim HNSCC einen Ersatz für die Standardtherapie zu finden, um so vor allem die Nebenwirkungen der Therapie reduzieren zu können. Diesbezüglich stehen insbesondere die HPV-pos. HNSCC im Fokus, da für diese Entität zwar eine hohe Heilungsrate erreicht werden kann bei allerdings beachtlichen Nebenwirkungen. Von oben genannten Studien werden 18 allein mit HPV-pos. HNSCC durchgeführt. Getestet werden u.a. die PI3K-Inhibitoren BKM120 (Buparsilib) und BYL719 (Alpelisib).

Mit dem in dieser Arbeit gemachten Befund, dass die Wirkung der kombinierten Behandlung aus Strahlung und Cisplatin durch Gabe von BEZ235 deutlich verstärkt werden kann, ist ein weiterer, potentieller Ansatz für die Behandlung von HNSCC gefunden. Es deutet sich an, dass diese Verstärkung vor allem für HPV-pos. HNSCC-Zellen besonders ausgeprägt ist. Damit könnte sich ein Ansatz für eine de-eskalierte Therapie dieser Entität ergeben.

Die bisherigen Ergebnisse beruhen auf Messungen an jeweils zwei HPV-neg. und pos. HNSCC-Zelllinien. In einem ersten Schritt müssen diese Daten durch Untersuchungen an weiteren Zelllinien abgesichert werden. Darauf aufbauend sollten Untersuchungen an frischem Tumormaterial mittels des ex-vivo-Assays erfolgen, damit auch die Wirkung des Tumormilieus auf diese Kombination erfasst wird. Insbesondere muss geklärt werden, inwieweit die erforderliche CDDP-Konzentration reduziert werden kann, so dass zwar weiterhin ausreichend Tumorzellen abgetötet werden, aber gleichzeitig die Nebenwirkungen vermindert werden können, um so das Ziel einer de-eskalierten Therapie zu erreichen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) sind weltweit die sechs häufigste Tumorerkrankung. Ursachen für diese Erkrankung sind neben Alkohol- und Nikotinkonsum auch die Infektion mit Humanen Papillomaviren, weshalb zwischen HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC unterschieden wird.

Die multimodale Behandlung dieses Tumors beinhaltet im fortgeschrittenen Stadium in der Regel eine Radiochemotherapie mit Cisplatin. Während bei HPV-neg. HNSCC die Heilungsraten nach dieser Therapie bei etwa 50-60% stagnieren, werden für HPV-pos. HNSCC Raten bis 90% erreicht. Sehr häufig sind diese Ergebnisse allerdings mit erheblichen Nebenwirkungen und damit Einschränkungen in der Lebensqualität verbunden.

In vorangehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der in HNSCC häufig mutierte PI3K/Akt/mTOR-Signalweg sehr effektiv durch den spezifischen Inhibitor NVP-BEZ235 unterdrückt wird und dadurch unabhängig vom HPV-Status eine deutliche Strahlensensibilisierung erreicht werden kann. In der nachfolgenden Studie sollte geklärt werden, ob durch BEZ235 auch die in der Regel bei HNSCC verwendete Kombinationstherapie aus Strahlung und Cisplatin gesteigert werden kann. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt an sechs HPV-negativen (FaDu, UM-SCC-3, UM-SCC-6, UM-SCC-11b, UT-SCC-33, Cal33) sowie sechs HPV-positiven HNSCC-Linien (UD-SCC-2, UM-SCC-104, UM-SCC-47, 93VU-147T, UPCI:SCC-152, UPCI:SCC-154). Mit der großen Zahl an Zelllinien sollte der breiten Heterogenität der HNSCC-Zellen Rechnung getragen werden. Die Wirkung auf das Zellüberleben wurde mittels des Koloniebildungstests bestimmt.

Insgesamt konnten folgende wichtige Beobachtungen gemacht werden:

1. Auf das Überleben der HPV-pos. Zellen hat Cisplatin allein eine (wenn auch nicht signifikant) höhere Wirkung als bei den HPV-neg. Zellen.
2. Durch eine zweistündige Vorbehandlung mit 50 nM BEZ235 wird in allen sechs HPV-pos. Zelllinien die Wirkung von Cisplatin verstärkt. In den HPV-neg. Linien zeigt sich jedoch bis auf die Linie UM-SCC-11b kein Effekt.
3. In Übereinstimmung mit früheren Daten bewirkt Cisplatin allein keine oder nur eine sehr geringe Steigerung der Strahlenempfindlichkeit, bzw. führt im Falle der UD-SCC-2 Zellen sogar zu einer geringen Strahlenresistenz.
4. Unabhängig vom HPV-Status wird in Übereinstimmung mit früheren Daten durch eine Vorbehandlung mit BEZ235 eine deutliche Strahlensensibilisierung erreicht.
5. Bei einer Vorbehandlung mit BEZ235 bewirkt Cisplatin unabhängig vom HPV-Status stets eine signifikante Steigerung der Strahlenempfindlichkeit. Diese Signifikanz wird selbst für eine geringe Strahlendosis von 2 Gy beobachtet.

Damit zeigt diese Arbeit erstmalig, dass in HNSCC-Zellen bei Unterdrückung des PI3k/Akt/mTOR-Signalweges mittels BEZ235 durch Cisplatin stets eine deutliche Strahlensensibilisierung erreicht werden kann. Dieser Effekt ist dabei unabhängig vom HPV-Status. Ohne Vorbehandlung mit BEZ235 bewirkt Cisplatin keine oder nur eine sehr geringe Strahlensensibilisierung.

Langfristig ist daher zu untersuchen, ob bei Patienten mit einem HNSCC durch eine Vorbehandlung mit BEZ235 die Wirkung einer Radiochemotherapie mit Cisplatin gesteigert werden kann und damit die Heilungsraten erhöht werden mit einer möglichen Reduktion der Nebenwirkungen.

6 SUMMARY

Squamous cell carcinoma of the head and neck region (HNSCC) is the six most frequent malignant disease worldwide. Besides alcohol and nicotine consumption, local infection with human papilloma viruses (mainly HPV-16 and HPV-18) contributes to oncogenesis. Therefore, a distinction is made between HPV-neg. and HPV-pos. HNSCC.

This tumour is generally treated by a multi-modal concept, which - especially in case of an advanced stage – includes radio-chemotherapy with cisplatin. While for HPV-neg. HNSCC 5-years survival is still below 50-60%, for HPV-pos. HNSCC values above 90% are reached. Unfortunately, these results are often accompanied with severe side-effects causing a drastic reduction in quality of life.

It was shown in a previous report of this lab, that the PI3K/Akt/mTOR-pathway, which is often mutated in HNSCC, is strongly depressed, when using the specific inhibitor NVP-BEZ235 leading also to a pronounced radiosensitization, which is independent of the HPV status. It was now tested whether BEZ235 can also be used to enhance the effect of irradiation when combined with cisplatin. The experiments were carried in six HPV-neg. (FaDu, UM-SCC-3, UM-SCC-6, UM-SCC-11b, UT-SCC-33, Cal33) and six HPV-pos. lines (UD-SCC-2, UM-SCC-104, UM-SCC-47, 93VU-147T, UPCI:SCC-152, UPCI:SCC-154). This great number of cell lines was necessary to cover the broad heterogeneity of HNSCC cell lines. The effect on cell survival was determined via colony-forming-assay.

Overall, the following results are obtained:

1. There was a trend that the effect of cisplatin alone on cell survival was stronger for HPV-pos. cells.
2. Pretreatment by 50 nM BEZ235 for two hours strongly enhances the effect of cisplatin in all six HPV-pos. cell lines, while except for UM-SCC-11b cells no such effect is seen for HPV-neg lines.
3. In line with previous data cisplatin alone was found to have no or only a marginal effect on radiosensitivity. For UD-SCC-2 cells even a slight reduction in radiosensitivity was observed.
4. In contrast, for all cell lines tested pretreatment of BEZ235 was found to result in a strong radiosensitization as already reported previously.
5. Pretreatment with BEZ235 was also found to enhance the effect of cisplatin on radiosensitivity. Even for a small X-ray dose of 2 Gy cisplatin was found to result in a significant radiosensitization, when cells were pretreated by BEZ235.

It is shown for the first time for HNSCC-cells, that the suppression of the PI3K/Akt/mTOR-pathway by BEZ235 always results in significant enhancement of the

combined treatment with X-irradiation and cisplatin. This effect was independent of the HPV status. Without pretreatment by BEZ235 cisplatin has no or only a minor effect on radiosensitivity.

It needs to be investigated for HNSCC patients, whether such a pretreatment with BEZ235 can be used to enhance the effect of radiochemotherapy with cisplatin and thereby increasing the cure rate with a possible chance to reduce the side-effects for these patients.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Al-Sarraf M, Pajak TF, Byhardt RW, Beitler JJ, Salter MM, Cooper JS (1997) Postoperative radiotherapy with concurrent cisplatin appears to improve locoregional control of advanced, resectable head and neck cancers: RTOG 88-24. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 37(4):777-782.
- Al-Sarraf M, Pajak TF, Cooper JS, Mohiuddin M, Herskovic A, Ager PJ (1990) Chemoradiotherapy in patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma: a radiation therapy oncology group study. *J Clin Oncol.* 8(8):1342-1351.
- Alderden RA, Hall MD, Hambley TW (2006) The discovery and development of cisplatin. *J Chem Educ.* 83(5):728-734.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, et al. (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 363(1):24-35.
- Arenz A, Ziemann F, Mayer C, Wittig A, Dreffke K, Preising S, Wagner S, Klussmann JP, Engenhart-Cabillic R, Wittekindt C (2014) Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlenther Onkol.* 190(9):839-846.
- Begg AC, van der Kolk PJ, Dewit L, Bartelink H (1986) Radiosensitization by cisplatin of RIF1 tumour cells in vitro. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 50(5):871-884.
- Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, et al. (2004) Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 350(19):1945-1952.
- Birkelbach M, Ferraiolo N, Gheorghiu L, Pfäffle HN, Daly B, Ebricht MI, Spencer C, O'Hara C, Whetstine JR, Benes CH, et al. (2013) Detection of impaired homologous recombination repair in NSCLC cells and tissues. *J Thorac Oncol.* 8(3):279-286.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, et al. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 354(6):567-578.
- Bourhis J, Sire C, Graff P, Grégoire V, Maingon P, Calais G, Gery B, Martin L, Alfonsi M, Desprez P, et al. (2012) Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or without concomitant chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma (GORTEC 99-02): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 13(2):145-153.
- Budach W, Bölke E, Kammers K, Gerber PA, Orth K, Gripp S, Matuschek C (2016) Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials. *Radiother Oncol.* 118(2):238-243.
- Busch CJ, Becker B, Kriegs M, Gatzemeier F, Krüger K, Möckelmann N, Fritz G, Petersen C, Knecht R, Rothkamm K, et al. (2016) Similar cisplatin sensitivity of HPV-positive and -negative HNSCC cell lines. *Oncotarget.* 7(24):35832-35842.
- Carde P, Laval F (1981) Effect of cis-dichlorodiammine platinum II and X rays on mammalian cell survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 7(7):929-933.
- Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML (2013) Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol.* 31(36):4550-4559.
- Chen P, Li J, Chen YC, Qian H, Chen YJ, Su JY, Wu M, Lan T (2016) The functional status of DNA repair pathways determines the sensitization effect to cisplatin in non-small cell lung cancer cells. *Cell Oncol (Dordr).* 39(6):511-522.
- Chen YH, Wei MF, Wang CW, Lee HW, Pan SL, Gao M, Kuo SH, Cheng AL, Teng CM (2015) Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor is an effective radiosensitizer for colorectal cancer. *Cancer Lett.* 357(2):582-590.
- Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB (2004) Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg.* 57(7):595-602.
- Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, et al. (2004) Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 350(19):1937-1944.

- Damia G, Brogini M (2019) Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair. *Cancers* (Basel). 11(1).
- Deans AJ, West SC (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*. 11(7):467-480.
- Degenhardt S, Dreffke K, Schötz U, Petersen C, Engenhardt-Cabillic R, Rothkamm K, Dahm-Daphi J, Dikomey E, Mansour WY (2020) Establishment of a Transformation Coupled in vitro End Joining Assay to Estimate Radiosensitivity in Tumor Cells. *Front Oncol*. 101480.
- Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J (2014) Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 13(5):1021-1031.
- Dietz A, Wichmann G, Kuhnt T, Pfreundner L, Hagen R, Scheich M, Kölbl O, Hautmann MG, Strutz J, Schreiber F, et al. (2018) Induction chemotherapy (IC) followed by radiotherapy (RT) versus cetuximab plus IC and RT in advanced laryngeal/hypopharyngeal cancer resectable only by total laryngectomy-final results of the larynx organ preservation trial DeLOS-II. *Ann Oncol*. 29(10):2105-2114.
- Dikomey E, Borgmann K, Köcher S, Kriegs M, Mansour W, Parpys AC, Rieckmann T, Rothkamm K (2016). Radiation DNA damage and use in cancer/therapeutics-translation of radiation modifiers. In *DNA Repair in Cancer Therapy (Second Edition)*, M.R. Kelley, and M.L. Fishel, eds. (Boston: Academic Press), pp. 329-352.
- Dikomey E, Borgmann K, Kriegs M, Mansour W, Petersen C, Rieckmann T (2012). Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen. In *Allgemeine Tumorthherapie*, J. Zeller, and z.H. H., eds. (Heidelberg: ecomed Medizin), pp. 1-20.
- Dimanche-Boitrel MT, Pelletier H, Genne P, Petit JM, Le Grimellec C, Canal P, Ardiè C, Bastian G, Chauffert B (1992) Confluence-dependent resistance in human colon cancer cells: role of reduced drug accumulation and low intrinsic chemosensitivity of resting cells. *Int J Cancer*. 50(5):677-682.
- Donaldson KL, Goolsby GL, Wahl AF (1994) Cytotoxicity of the anticancer agents cisplatin and taxol during cell proliferation and the cell cycle. *Int J Cancer*. 57(6):847-855.
- Fabi F, Adam P, Parent S, Tardif L, Cadrin M, Asselin E (2021) Pharmacologic inhibition of Akt in combination with chemotherapeutic agents effectively induces apoptosis in ovarian and endometrial cancer cell lines. *Mol Oncol*. 15(8):2106-2119.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 127(12):2893-2917.
- Fernández-Mateos J, Pérez-García J, Seijas-Tamayo R, Mesía R, Rubió-Casadevall J, García-Girón C, Iglesias L, Carral Maseda A, Adansa Klain JC, Taberna M, et al. (2020) Oncogenic driver mutations predict outcome in a cohort of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients within a clinical trial. *Sci Rep*. 10(1):16634.
- Fokas E, Yoshimura M, Prevo R, Higgins G, Hackl W, Maira SM, Bernhard EJ, McKenna WG, Muschel RJ (2012) NVP-BEZ235 and NVP-BGT226, dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors, enhance tumor and endothelial cell radiosensitivity. *Radiat Oncol*. 748.
- Gil del Alcazar CR, Hardebeck MC, Mukherjee B, Tomimatsu N, Gao X, Yan J, Xie XJ, Bachoo R, Li L, Habib AA, et al. (2014) Inhibition of DNA double-strand break repair by the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 as a strategy for radiosensitization of glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 20(5):1235-1248.
- Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, Jordan RCK, Zhao W, Sturgis EM, Burtness B, et al. (2019) Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet*. 393(10166):40-50.
- Giralt J, Trigo J, Nuyts S, Ozsahin M, Skladowski K, Hatoum G, Daisne JF, Yunes Ancona AC, Cmelak A, Mesía R, et al. (2015) Panitumumab plus radiotherapy versus chemoradiotherapy in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-2): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 16(2):221-232.
- Hall E, Giaccia AJ (2006). *Radiobiology for the radiologist*, Vol 6.th edition (Philadelphia: Lippincott Wilkins & Williams).

- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-674.
- Hintelmann K, Kriegs M, Rothkamm K, Rieckmann T (2020) Improving the Efficacy of Tumor Radiosensitization Through Combined Molecular Targeting. *Front Oncol*. 10:1260.
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411(6835):366-374.
- Horn D, Hess J, Freier K, Hoffmann J, Freudsperger C (2015) Targeting EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Ther Targets*. 19(6):795-805.
- Huang JC, Cui ZF, Chen SM, Yang LJ, Lian HK, Liu B, Su ZH, Liu JS, Wang M, Hu ZB, et al. (2018) NVP-BEZ235 synergizes cisplatin sensitivity in osteosarcoma. *Oncotarget*. 9(12):10483-10496.
- Huang JW, Wang Y, Dhillon KK, Calses P, Villegas E, Mitchell PS, Tewari M, Kemp CJ, Taniguchi T (2013) Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity. *Mol Cancer Res*. 11(12):1564-1573.
- Iglesias-Bartolome R, Martin D, Gutkind JS (2013) Exploiting the head and neck cancer oncogenome: widespread PI3K-mTOR pathway alterations and novel molecular targets. *Cancer Discov*. 3(7):722-725.
- Iida M, Harari PM, Wheeler DL, Toulany M (2020) Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. *Mutat Res*. 819-820:11690.
- Ijff M, van Bochove GGW, Whitton D, Winiarczyk R, Honhoff C, Rodermond H, Crezee J, Stalpers LJA, Franken NAP, Oei AL (2021) PARP1-Inhibition Sensitizes Cervical Cancer Cell Lines for Chemoradiation and Thermoradiation. *Cancers (Basel)*. 13(9).
- Iliakis G, Murmann T, Soni A (2015) Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 793:166-175.
- Ito M, Yamamoto S, Nimura K, Hiraoka K, Tamai K, Kaneda Y (2005) Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *J Gene Med*. 7(8):1044-1052.
- Iwata H, Shuto T, Kamei S, Omachi K, Moriuchi M, Omachi C, Toshito T, Hashimoto S, Nakajima K, Sugie C, et al. (2020) Combined effects of cisplatin and photon or proton irradiation in cultured cells: radiosensitization, patterns of cell death and cell cycle distribution. *J Radiat Res*. 61(6):832-841.
- Kasten-Pisula U, Menegakis A, Brammer I, Borgmann K, Mansour WY, Degenhardt S, Krause M, Schreiber A, Dahm-Daphi J, Petersen C, et al. (2009) The extreme radiosensitivity of the squamous cell carcinoma SKX is due to a defect in double-strand break repair. *Radiother Oncol*. 90(2):257-264.
- Kasten-Pisula U, Saker J, Eicheler W, Krause M, Yaromina A, Meyer-Staeckling S, Scherkl B, Kriegs M, Brandt B, Grénman R, et al. (2011) Cellular and tumor radiosensitivity is correlated to epidermal growth factor receptor protein expression level in tumors without EGFR amplification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 80(4):1181-1188.
- Kim KW, Myers CJ, Jung DK, Lu B (2014) NVP-BEZ-235 enhances radiosensitization via blockade of the PI3K/mTOR pathway in cisplatin-resistant non-small cell lung carcinoma. *Genes Cancer*. 5(7-8):293-302.
- Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, Peet CR, Lorenz LD, Nickel KP, Klingelutz AJ, et al. (2013) Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res*. 73(15):4791-4800.
- Konstantinidou G, Bey EA, Rabellino A, Schuster K, Maira MS, Gazdar AF, Amici A, Boothman DA, Scaglioni PP (2009) Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin blockade is an effective radiosensitizing strategy for the treatment of non-small cell lung cancer harboring K-RAS mutations. *Cancer Res*. 69(19):7644-7652.
- Kuger S, Graus D, Brendtke R, Günther N, Katzer A, Lutyj P, Polat B, Chatterjee M, Sukhorukov VL, Flentje M, et al. (2013) Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Transl Oncol*. 6(2):169-179.

- Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J (2009) Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 27(12):1992-1998.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 11(1):9-22.
- Leitlinienprogramm Onkologie (2019) <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/> ; Zugriff: 2.01.2022
- Leonard BC, Lee ED, Bholra NE, Li H, Sogaard KK, Bakkenist CJ, Grandis JR, Johnson DE (2019) ATR inhibition sensitizes HPV(-) and HPV(+) head and neck squamous cell carcinoma to cisplatin. *Oral Oncol.* 95:35-42.
- Leersch S, Berthold S, Ziemann F, Dreffke K, Subtil FSB, Senger Y, Jensen A, Engenhart-Cabillic R, Dikomey E, Wittig A, et al. (2020) HPV-positive HNSCC cell lines show strongly enhanced radiosensitivity after photon but not after carbon ion irradiation. *Radiother Oncol.* 151:134-140.
- Linge A, Schötz U, Löck S, Lohaus F, von Neubeck C, Gudziol V, Nowak A, Tinhofer I, Budach V, Sak A, et al. (2018) Comparison of detection methods for HPV status as a prognostic marker for loco-regional control after radiochemotherapy in patients with HNSCC. *Radiother Oncol.* 127(1):27-35.
- Lohaus F, Linge A, Tinhofer I, Budach V, Gkika E, Stuschke M, Balermipas P, Rödel C, Avlar M, Grosu AL, et al. (2014) HPV16 DNA status is a strong prognosticator of loco-regional control after postoperative radiochemotherapy of locally advanced oropharyngeal carcinoma: results from a multicentre explorative study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Radiother Oncol.* 113(3):317-323.
- Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, Lu Y, Zhang Q, Du Y, Gilbert BR, et al. (2013) Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov.* 3(7):761-769.
- Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K, et al. (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 7(7):1851-1863.
- Martins RG, Parvathaneni U, Bauman JE, Sharma AK, Raez LE, Papagikos MA, Yunus F, Kurland BF, Eaton KD, Liao JJ, et al. (2013) Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol.* 31(11):1415-1421.
- Mazeron R, Tao Y, Lusinchi A, Bourhis J (2009) Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer. *Oral Oncol.* 45(4-5):402-408.
- Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S (2013) Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck.* 35(5):747-755.
- Mehanna H, Rischin D, Wong SJ, Gregoire V, Ferris R, Waldron J, Le QT, Forster M, Gillison M, Laskar S, et al. (2020) De-Escalation After DE-ESCALATE and RTOG 1016: A Head and Neck Cancer InterGroup Framework for Future De-Escalation Studies. *J Clin Oncol.* 38(22):2552-2557.
- Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, Dalby M, Mistry P, Sen M, O'Toole L, et al. (2019) Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet.* 393(10166):51-60.
- Mendenhall WM, Hinerman RW, Amdur RJ, Malyapa RS, Lansford CD, Werning JW, Villaret DB (2006) Postoperative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Med Res.* 4(3):200-208.
- Mesía R, Henke M, Fortin A, Minn H, Yunes Ancona AC, Cmelak A, Markowitz AB, Hotte SJ, Singh S, Chan AT, et al. (2015) Chemoradiotherapy with or without panitumumab in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-1): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 16(2):208-220.
- Meyn RE, Meistrich ML, White RA (1980) Cycle-dependent anticancer drug cytotoxicity in mammalian cells synchronized by centrifugal elutriation. *J Natl Cancer Inst.* 64(5):1215-1219.

- Möckelmann N, Rieckmann T, Busch CJ, Becker B, Gleißner L, Hoffer K, Omniczynski M, Steinmeister L, Laban S, Grénman R, et al. (2016) Effect of sorafenib on cisplatin-based chemoradiation in head and neck cancer cells. *Oncotarget*. 7(17):23542-23551.
- Moon du G, Lee SE, Oh MM, Lee SC, Jeong SJ, Hong SK, Yoon CY, Byun SS, Park HS, Cheon J (2014) NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor synergistically potentiates the antitumor effects of cisplatin in bladder cancer cells. *Int J Oncol*. 45(3):1027-1035.
- Mukherjee B, Tomimatsu N, Amancherla K, Camacho CV, Pichamoorthy N, Burma S (2012) The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses. *Neoplasia*. 14(1):34-43.
- Nagel R, Martens-de Kemp SR, Buijze M, Jacobs G, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2013) Treatment response of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*. 49(6):560-566.
- Nguyen-Tan PF, Zhang Q, Ang KK, Weber RS, Rosenthal DI, Soulieres D, Kim H, Silverman C, Raben A, Galloway TJ, et al. (2014) Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. *J Clin Oncol*. 32(34):3858-3866.
- Prevc A, Kranjc S, Cemazar M, Todorovic V, Zegura B, Novak M, Filipic M, Flezar MS, Kirbis IS, Rotter A, et al. (2018) Dose-Modifying Factor of Radiation Therapy with Concurrent Cisplatin Treatment in HPV-Positive Squamous Cell Carcinoma: A Preclinical Study. *Radiat Res*. 189(6):644-651.
- Puck TT, Marcus PI (1956) Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*. 103(5):653-666.
- Raaphorst G, Wang G, Ng C (1995) Radiosensitization by Cisplatin treatment in Cisplatin-resistant and sensitive human ovarian-carcinoma cell-lines. *Int J Oncol*. 7(2):325-330.
- Reuschenbach M, Tinhofer I, Wittekindt C, Wagner S, Klussmann JP (2019) A systematic review of the HPV-attributable fraction of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Germany. *Cancer Med*. 8(4):1908-1918.
- Riaz MA, Sak A, Erol YB, Groneberg M, Thomale J, Stuschke M (2019) Metformin enhances the radiosensitizing effect of cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines with different cisplatin sensitivities. *Sci Rep*. 9(1):1282.
- Rieckmann T, Kriegs M (2019) The failure of cetuximab-based de-intensified regimes for HPV-positive OPSCC: A radiobiologists perspective. *Clin Transl Radiat Oncol*. 1747-50.
- Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch CJ, Petersen C, Dikomey E, Kriegs M (2013) HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol*. 107(2):242-246.
- RKI (2019) Zentrum Für Krebsregisterdaten (Rober Koch Institut) https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/. Zugriff: 2.08.2019
- Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CFM (2018) DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)*. 73(suppl 1):e478s.
- Rodríguez A, D'Andrea A (2017) Fanconi anemia pathway. *Curr Biol*. 27(18):R986-r988.
- Rühle A, Grosu AL, Nicolay NH (2021) De-Escalation Strategies of (Chemo)Radiation for Head-and-Neck Squamous Cell Cancers-HPV and Beyond. *Cancers (Basel)*. 13(9).
- Rühle A, Perez RL, Glowa C, Weber KJ, Ho AD, Debus J, Saffrich R, Huber PE, Nicolay NH (2017) Cisplatin radiosensitizes radioresistant human mesenchymal stem cells. *Oncotarget*. 8(50):87809-87820.
- Saintigny P, Mitani Y, Pytynia KB, Ferrarotto R, Roberts DB, Weber RS, Kies MS, Maity SN, Lin SH, El-Naggar AK (2018) Frequent PTEN loss and differential HER2/PI3K signaling pathway alterations in salivary duct carcinoma: Implications for targeted therapy. *Cancer*. 124(18):3693-3705.
- Sano D, Oridate N (2016) The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 21(5):819-826.
- Schötz U, Balzer V, Brandt FW, Ziemann F, Subtil FSB, Rieckmann T, Köcher S, Engenhart-Cabillie R, Dikomey E, Wittig A, et al. (2020) Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Enhances Radiosensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Due to

- Suppressed Double-Strand Break (DSB) Repair by Non-Homologous End Joining. *Cancers (Basel)*. 12(2).
- Seltzsaam S, Ziemann F, Dreffke K, Preising S, Arenz A, Schötz U, Engenhardt-Cabillic R, Dikomey E, Wittig A (2019) In HPV-Positive HNSCC Cells, Functional Restoration of the p53/p21 Pathway by Proteasome Inhibitor Bortezomib Does Not Affect Radio- or Chemosensitivity. *Transl Oncol*. 12(3):417-425.
- Sheu JJ, Hua CH, Wan L, Lin YJ, Lai MT, Tseng HC, Jinawath N, Tsai MH, Chang NW, Lin CF, et al. (2009) Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 69(6):2568-2576.
- Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, McKenna A, et al. (2011) The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 333(6046):1157-1160.
- Tasoulas J, Lenze NR, Farquhar D, T PS, Shen C, Shazib MA, Singer B, Patel S, Grilley Olson JE, Hayes DN, et al. (2021) The addition of chemotherapy to adjuvant radiation is associated with inferior survival outcomes in intermediate-risk HPV-negative HNSCC. *Cancer Med*. 10(10):3231-3239.
- Tavecchio M, Simone M, Erba E, Chiolo I, Liberi G, Foiani M, D'Incalci M, Damia G (2008) Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur J Cancer*. 44(4):609-618.
- Tinhofer I, Jöhrens K, Keilholz U, Kaufmann A, Lehmann A, Weichert W, Stenzinger A, Stromberger C, Klinghammer K, Becker ET, et al. (2015) Contribution of human papilloma virus to the incidence of squamous cell carcinoma of the head and neck in a European population with high smoking prevalence. *Eur J Cancer*. 51(4):514-521.
- Tobias JS, Monson K, Gupta N, Macdougall H, Glaholm J, Hutchison I, Kadalayil L, Hackshaw A (2010) Chemoradiotherapy for locally advanced head and neck cancer: 10-year follow-up of the UK Head and Neck (UKHAN1) trial. *Lancet Oncol*. 11(1):66-74.
- Toulany M, Rodemann HP (2015) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling as a key mediator of tumor cell responsiveness to radiation. *Semin Cancer Biol*. 35180-190.
- Wang L, Mosel AJ, Oakley GG, Peng A (2012) Deficient DNA damage signaling leads to chemoresistance to cisplatin in oral cancer. *Mol Cancer Ther*. 11(11):2401-2409.
- Yu CC, Hung SK, Lin HY, Chiou WY, Lee MS, Liao HF, Huang HB, Ho HC, Su YC (2017) Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as an effectively radiosensitizing strategy for treating human oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 8(40):68641-68653.
- Zeller J (2016). *Grundlagen der Chemotherapie und der Hormontherapie maligner Tumoren*. In *Onkologie: Grundlagen- Diagnostik- Therapie- Entwicklung*, J. Zeller, and H. zur Hausen, eds. (Heidelberg: ecomed Medizin), pp. 1-16.
- Zeng L, Nikolaev A, Xing C, Della Manna DL, Yang ES (2020) CHK1/2 Inhibitor Prexasertib Suppresses NOTCH Signaling and Enhances Cytotoxicity of Cisplatin and Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 19(6):1279-1288.
- Zhang N, Erjala K, Kulmala J, Qiu X, Sundvall M, Elenius K, Grénman R (2009) Concurrent cetuximab, cisplatin, and radiation for squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Radiother Oncol*. 92(3):388-392.
- Ziemann F, Arenz A, Preising S, Wittekindt C, Klussmann JP, Engenhardt-Cabillic R, Wittig A (2015) Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation ± Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis. *Am J Cancer Res*. 5(3):1017-1031.
- Ziemann F, Seltzsaam S, Dreffke K, Preising S, Arenz A, Subtil FSB, Rieckmann T, Engenhardt-Cabillic R, Dikomey E, Wittig A (2017) Roscovitine strongly enhances the effect of olaparib on radiosensitivity for HPV neg. but not for HPV pos. HNSCC cell lines. *Oncotarget*. 8(62):105170-105183.

8 ANHANG

8.1 Curriculum Vitae

Die Seiten 53 und 54 (Curriculum Vitae) enthalten personenbezogene Daten und sind daher nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

8.2 Liste der Publikationen

Subtil FSB, Gröbner C, Recknagel N, Parplys AC, Kohl S, Arenz A, Eberle F, Dikomey E, Engenhardt-Cabillic R, Schötz U. Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Leads to a Synergistic Enhancement of Cisplatin and Radiation in Both HPV-Negative and - Positive HNSCC Cell Lines. *Cancers* (Basel). 2022 Jun 28;14(13):3160. DOI: 10.3390/cancers14133160. PMID: 35804930; PMCID: PMC9265133.

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Best, Bette, Brehm, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Damanakis, Donner-Banzhoff, Eickmann, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Figiel, Gress, Grundmann, Hertl, Hildebrandt, Hoffmann, Hoyer, Jaques, Jerrentrup, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, Knake, König, Koolmann, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maier-Giebing, Maisner, Menzler, Michl, Moll, Mutters, Müller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Nockher, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Ries, Ruchholtz, Sekundo, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schratt, Schu, Schulze, Schütz, Seifart, Seitz, Sevinc, Sommer, Stahl, Steiniger, Suske, Tackenberg, Thieme, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wittig, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin.

8.4 Danksagung

Disziplin und Durchhaltevermögen allein sind nicht die entscheidenden Faktoren um ein Ziel zu erreichen. Es sind die Menschen, die uns auf diesem Weg begleiten und unterstützen. Ohne die Unterstützung dieser Menschen wäre es für mich nicht möglich gewesen dieses Projekt abzuschließen. Diesen Menschen möchte ich hiermit meinen Dank aussprechen.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic dafür danken, dass Sie mir als Direktorin der Klinik für Strahlentherapie sowie als offizielle Betreuerin der Arbeit eine Promotion in der Strahlentherapie ermöglicht hat.

An nächster Stelle möchte ich Frau Dr. rer. nat. Andrea Arenz aus dem Labor der Klinik für Strahlentherapie danken, für die Möglichkeit dieses spannende Thema unter ihrer Anleitung zu bearbeiten, für die Betreuung, sowohl während der experimentellen Phase der Arbeit als auch während der Datenauswertung und für die Möglichkeit, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einem Kongress präsentieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey, Gastprofessor in der Klinik für Strahlentherapie in Marburg, danke ich für die ehrliche Kritik, die vielen Anregungen und die großartige Unterstützung bei der Datenauswertung. Ohne diese Unterstützung und Bestärkung meiner Arbeit wäre ein erfolgreicher Abschluss der Dissertation nicht möglich gewesen.

Ich danke weiterhin den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, namentlich insbesondere unserer Laborleiterin Dr. rer. nat. Ulrike Schötz, Frau Stefanie Preisung und Frau Dr. rer. nat. Kristin Dreffke für die freundliche Einarbeitung in die Arbeit im Labor sowie die stete Unterstützung in der Durchführung der experimentellen Arbeiten. Was diese Arbeitsgruppe, und letztendlich das gute Arbeitsklima ausmacht, ist die Verknüpfung aus Professionalität beim wissenschaftlichen Arbeiten und Herzlichkeit im Umgang miteinander. Ich danke allen für die schöne Zeit und die Unterstützung beim erfolgreichen Abschluss der Dissertation.

Zuletzt gilt ein großer Dank meinen Eltern, Jürgen und Sabine Gröbner und meinem Freund Benjamin Keil für die immerwährende persönliche Unterstützung und Begleitung während des gesamten Studiums. Ohne sie wäre es mir weder möglich gewesen, das Medizinstudium zu bestreiten noch diese Promotion zum erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Allen anderen, die mich während meiner Zeit im Labor für Strahlentherapie begleitet haben und die ich hier nicht persönlich erwähnt habe, danke ich ebenfalls.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Wirkung des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 auf die Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung bei HPV-negativen und -positiven Plattenepithelkarzinom-Zellen der Kopf-Hals-Region“ in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic mit Unterstützung durch Dr. rer. nat. Andrea Arenz, Prof. Dr. rer. nat. Dikomey und Dr. rer. nat. Ulrike Schötz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum, Unterschrift Referentin/Referent