



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

Vergleich des Ansprechens von Standardtherapien bei HPV positiven und negativen Zelllinien
aus dem Kopf- Halsbereich.

Konstantin Karl Wagner

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Anja C. Pickhard

2. Prof. Dr. Henning A. Bier

Die Dissertation wurde am 13.03.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 18.10.2017 angenommen.

1. Einführung	4
1.1. Problemdarstellung	4
1.2. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs	4
1.2.1. Epidemiologie	4
1.2.2. Ätiologie und Risikofaktoren	5
1.2.3. Klassifikation	6
1.2.4. Histopathologie	9
1.2.5. Molekularpathologie	10
1.2.6. Prognose	12
1.2.7. Therapie	13
1.3. Humane Papillomaviren (HPV)	15
1.3.1. Aufbau und Epidemiologie	15
1.3.2. Ätiologie HPV-induzierter Tumore im Kopf-Halsbereich	15
1.3.3. Molekularpathologie bei HPV-positiven Tumoren	16
1.3.4. Prognose	17
1.3.5. Therapie	18
1.4. Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Material	20
2.1.1. Geräte	20
2.1.2. Verbrauchsmaterial	21
2.1.3. Reagenzien und Chemikalien	21
2.1.4. Zelllinien	22
2.1.5. Medien und Reagenzien für die Zellkultur	22
2.1.6. Inhibitoren	23
2.2. Methoden	24
2.2.1. Zellkultur	24
2.2.1.1. Vorbemerkung	24
2.2.1.2. Auftauen der Zellen	24
2.2.1.3. Zellkulturpflege	24
2.2.1.4. Zellen splitten	24
2.2.1.5. Einfrieren von Zellen	25
2.2.1.6. Statistische Auswertungen	25
2.2.2. Behandlung der Zellen	26
2.2.2.1. Bestrahlung	26
2.2.2.2. Auszählen von Zellen	26

2.2.2.3. IC ₅₀ - Konzentrationskinetiken	26
2.2.2.4. Crystal-Violett-ELISA	27
2.2.2.5. Colony-Formation-Assay	27
3. Ergebnisse	28
3.1. IC ₅₀ - Konzentrationskinetik	28
3.1.1. IC ₅₀ Cisplatin	28
3.1.2. IC ₅₀ 5-FU	30
3.1.3. IC ₅₀ Cetuximab	31
3.1.4. IC ₅₀ Strahlenbehandlung	32
3.2. Proliferationsanalysen	34
3.2.1. Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Medikamentendosen	34
3.2.2. Ergebnisse Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Medikamentendosen und 2 Gy Bestrahlung	35
3.3. Kombinationsversuche für unterschiedliche Strahlendosen	38
3.3.1. Ergebnisse Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Strahlendosen	38
3.4. Colony-Formation- Assays	45
3.4.1. Einfluss von Cisplatin auf das klonogene Überleben der Zelllinien	45
3.4.2. Einfluss von 5-FU auf das klonogene Überleben der Zelllinien	46
3.4.3. Einfluss von Cetuximab auf das klonogene Überleben der Zelllinien	48
3.4.4. Einfluss von ionisierender Strahlung auf das klonogene Überleben der Zelllinien	49
3.4.5. Kombinationsversuche mit und ohne Strahlenbehandlung	51
4. Diskussion	54
4.1. Methodendiskussion	55
4.2. HPV-positive Zellen sind strahlensensibler	57
4.3. HPV-positive Zellen zeigen gutes Ansprechen auf Chemo- und Immuntherapeutika	58
4.3.1. Ansprechen auf Cisplatin	58
4.3.2. Ansprechen auf 5-FU	58
4.3.3. Ansprechen auf Cetuximab	59
4.3.4. Ansprechen auf Kombinationsbehandlungen	60
4.3.5. Ausblick	61
5. Zusammenfassung	63
6. Literaturverzeichnis	64
7. Abbildungsverzeichnis	74
8. Tabellenverzeichnis	75

9. Abkürzungsverzeichnis	76
10. Danksagung	77

1. Einführung

1.1. Problemdarstellung

Nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Statistisch gesehen entwickelt jeder dritte Europäer im Laufe seines Lebens Krebs.

So erkranken in Deutschland etwa 395.000 Menschen jährlich an Krebs, davon rund 195.000 Frauen und 200.000 Männer, was bedeutet, dass bei fast jedem vierten Sterbefall im Jahr 2006 eine bösartige Neubildung als Todesursache festgestellt werden konnte (Statistisches Bundesamt (Destatis)).

2006 lagen die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für alle Krebsentitäten in Deutschland für Frauen zwischen 61 % bis 62 %, für Männer zwischen 54 % und 57 % (insgesamt also rund 58,5 %). Verglichen dazu ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit Krebs von Mundhöhle und Rachen für Männer 36 % bis 45 % und für Frauen 50 % bis 63 % (Haddad & Shin, 2008). Warum die Prognose für Karzinome des Kopf-Halsbereichs schlechter ist als die kumulierte Prognose aller Krebsentitäten, wie diesem kausal entgegen gewirkt werden kann, sodass Patienten eine bessere Prognose und ein verträglicheres Maß an lebens einschränkenden Nebenwirkungen erlangen, ist grundlegender Bestandteil der Forschung auf diesem Gebiet.

1.2. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs

Krebserkrankungen des Kopf-Halsbereichs (head and neck squamous cell carcinomas, HNSCC) umfassen bösartige Neubildungen unterschiedlicher Lokalisation, Ätiologie, Histologie und Prognose. Häufige Karzinome im Bereich der Hals- Nasen- Ohrenheilkunde sind Karzinome der Mundhöhle, des Pharynx (Naso-, Oro- und Hypopharynx) und des Larynx. Es finden sich allerdings auch Tumore der Speicheldrüsen sowie Lymphome oder Hauttumore im Kopf-Halsbereich.

Mit über 90 % stellt das Plattenepithelkarzinom die häufigste Tumorentität in diesem Bereich dar. Es ist gekennzeichnet durch große Tumorumfänge und frühzeitiger regionärer Lymphknotenmetastasierung (Wenig, 2002) mit Ausnahme des glottischen Larynxkarzinoms.

Die World Health Organisation (WHO) definiert es als malignen epithelialen Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung, charakterisiert durch ein vom histologischen Malignitätsgrad abhängiges Ausmaß an Hornbildung und Vorhandensein von Interzellularbrücken (Streit et al., 2004).

1.2.1. Epidemiologie

Es gibt erhebliche geographische Unterschiede im Vorkommen der einzelnen Krebsentitäten des Aerodigestivtraktes.

So beträgt die Inzidenz für Mundhöhlenkarzinome in den westlichen Industrieländern beispielweise zwischen 2/100.000 in Finnland und

20/100.000 in Nordfrankreich, in bestimmten Regionen Indiens liegt sie um 12/100.000 und in Afrika bei nur 1,2/100.000 Einwohner und Jahr (Peters, Pritzkeleit, Beske, & Katalinic, 2010)

Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereichs zu erkranken beträgt in den westlichen Industrieländern circa 4 : 1 (Eliassen et al., 2013).

Laut Schätzungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut handelt es sich beim Mundhöhlen- und Rachenkarzinom mit jährlich 7900 Neuerkrankungen und einer altersstandardisierten Inzidenz in Europa von circa 16/100.000 Einwohner um die siebthäufigste Krebsneuerkrankung bei Männern. Bei Frauen hingegen stehen diese Tumore mit 2900 Neuerkrankungen und einer Inzidenz von circa 5/100.000 Einwohner im Jahre 2006 an 16. Stelle in Europa.

Frauen erkranken im Mittel im Alter von etwa 64 Jahren, Männer bereits mit 60 Jahren. Das Risiko, in den folgenden zehn Jahren daran zu erkranken, ist für Frauen und Männer ohne Risikofaktoren im Alter zwischen 50 und 70 Jahren am größten, lebenslang liegt es für Frauen bei 0,6 % und für Männer bei 1,4 %.

(Heroiu (Cataloiu), Danciu, & Pepescu, 2013).

1.2.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die wichtigsten Risikofaktoren für das Entstehen eines Plattenepithelkarzinoms im Aerosigestivbereich sind Tabak- und Alkoholkonsum, insbesondere eine Kombination hochprozentigen Alkohols mit übermäßigem Konsum von Tabak scheint das Risiko für ein Karzinom zu potenzieren (Maier, Dietz, Gewelke, Seitz, & Heller, 1990).

Weitere Risikofaktoren für bösartige Neubildungen der Mundhöhle und des Rachens sind unzureichende Mundhygiene. Besonders schlecht sitzende Zahnprothesen und scharfkantige Füllungen können das Gewebe mechanisch irritieren und so nach einiger Zeit ebenfalls zu malignen Neoplasien führen (Jané-Salas, López-López, Roselló-Llabrés, Rodríguez-Argueta, & Chimenos-Küstner, 2012).

Bei Tumoren der Lippe trägt Sonnenexposition in Form von UV-Strahlung zur Entstehung von Spinaliomen bei (Goldenberg et al., 2004). Auch das Kauen von Betelnüssen gilt als Risikofaktor (Jeng, Chang, & Hahn, 2001).

Daneben gelten mittlerweile auch bestimmte berufliche Noxen (u. a. Asbest, Kontakt zu Holzstäuben und einige Chemikalien in der Farben- und Lackindustrie) als krebserregend, was zur Anerkennung des Larynxkarzinoms als Berufskrankheit in verschiedenen Tätigkeitsbereichen geführt hat (Langevin et al., 2013).

Des Weiteren konnte das humane Papillomavirus (HPV) als ätiologisch bedeutend für die Karzinomentstehung identifiziert werden. Etwa 25 % der Plattenepithelkarzinome im Bereich der Mundhöhle und des Oropharynx sind mit humanen Papillomaviren (HPV) assoziiert. Ihre Prognose ist aufgrund ihres - im Vergleich zu den Tumoren ohne HPV Belastung - besseren Ansprechens auf Bestrahlung und eines jüngeren Patientenalters klinisch bedeutsam (Marur, D'Souza, Westra, & Forastiere, 2010; Paz, Cook, Odom-Maryon, Xie, & Wilczynski, 1997; Strome et al., 2002)

1.2.3. Klassifikation

Um eine individuelle und tumoradaptierte Therapie festlegen zu können, muss vor Beginn der Therapie durch eine Staging-Untersuchung die Größe, Ausdehnung und das Metastasierungsverhalten des Tumors festgestellt werden. Dazu werden eine Ultraschalluntersuchung und eine Computertomographie (CT) des Halses durchgeführt, eventuell muss zur Ergänzung auch eine Magnetresonanztomographie veranlasst werden. Zur Identifikation von Fernmetastasen oder Zweitkarzinomen sollte eine CT des Thorax oder eine Röntgenuntersuchung des Thorax und eine Sonographie des Abdomens angestrebt werden.

Zur genauen Ermittlung der Größenausdehnung und zum Ausschluss eines Zweitkarzinoms sollte immer auch eine Panendoskopie mit histologischer Sicherung des Tumors durch eine Biopsie erfolgen. Im Anschluss können im Detail die Befunde und die Behandlungsoptionen mit dem Patienten besprochen werden.

Kopf-Halstumore werden von der International Unit against Cancer (UICC) nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Diese Einteilung der Tumore ermöglicht eine Standardisierung nach internationalen Kriterien. Das Suffix „p“ beschreibt hierbei einen histologisch-pathologischen Befund, während „c“ die klinische Einstufung angibt.

Tabelle 1: pT-Klassifikation der UICC.

pT-Klassifikation (Primärtumor)	
pTX	Primärtumor kann histologisch nicht beurteilt werden.
pT0	Kein histologischer Anhalt für Primärtumor.
pTis	Carcinoma in situ.
pT1-4	Zunehmende Größe und/oder Ausdehnung des Primärtumors.

T bezeichnet die Ausdehnung des Primärtumors.

(Sobin, Gospodarowicz, & Wittekind, 2009)

Tabelle 2: pN-Klassifikation der UICC.

pN-Klassifikation	
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden.
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen.
pN1	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder kleiner.
pN2a	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, größer als 3 cm, kleiner als 6 cm.
pN2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm.
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm.
pN3	Metastase(n) in Lymphknoten größer als 6 cm.

N beschreibt das Vorhandensein bzw. das Fehlen von regionären Lymphknoten.

(Sobin et al., 2009)

Tabelle 3: pM-Klassifikation der UICC.

pM- Klassifikation	
pMX	Fernmetastasen können histologisch nicht beurteilt werden.
pM0	Histologisch keine Fernmetastasen.
pM1	Histologisch gesicherte Fernmetastase.

M bezeichnet das Vorhandensein bzw. das Fehlen von hämatogenen.

(Sobin et al., 2009)

Tabelle 4: Definition des R- Faktors.

R- Faktor	
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden.
R0	Kein Residualtumor.
R1	Mikroskopischer Residualtumor.
R2	Makroskopischer Residualtumor.

R beschreibt das Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumor.

(Sobin et al., 2009)

Die Einteilung der Tumoren erfolgt nach internationalen Kriterien der TNM Klassifikation (siehe unten). Dabei wird nach der World Health Organisation eine generelle Unterteilung zwischen den Stadien I/II (lokal begrenzt) und III/IV (fortgeschritten) vorgenommen, da sich hierdurch eine wesentliche prognostische und therapeutische Bedeutung ergibt.

Tabelle 5: Stadieneinteilung von Kopf-Halstumoren.

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2, T3	N1, N0 N1	M0 M0
Stadium IVA	T1, T2, T3 T4a	N2 N0, N1, N2	M0 M0
Stadium IVB	alle T T4b	N3 alle N	M0 M0
Stadium IVC	alle T	alle N	M1

(Sobin et al., 2009)

Vom histopathologischen Grading lassen sich gewisse Aussagen über den Malignitätsgrad des Tumors treffen.

Die UICC teilt Tumorgewebe in drei, in der erweiterten Variante in vier Grade ein.

Tabelle 6: Grading von Kopf-Halstumoren.

Grading	
GX	Der Grad der Differenzierung kann nicht bestimmt werden.
G1	Gut differenziert.
G2	Mäßig differenziert.
G3	Schlecht differenziert.
G4	Undifferenziert.

G gibt den Differenzierungsgrad des Krebsgewebes an.

(Sobin et al., 2009)

1.2.4. Histopathologie

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs gehen häufig aus nicht-invasiven Vorläuferläsionen sog. Präkanzerosen hervor. Sie imponieren als Leukoplakie, Erythroplakie oder Erythroleukoplakie und haben dieselben Risikofaktoren wie das invasive Karzinom (Wenig, 2002).

Die Übergänge von Vorläuferläsionen zum frühen Karzinom sind oft fließend.

Nach WHO werden diese präkanzerösen Vorstufen nach dem der squamösen intraepithelialen Neubildung (SIN) eingeteilt, was folgende Tabelle zeigt:

Tabelle 7: Klassifikationsschema zur Einteilung prämaligener Vorstufen von HNSCC.

Squamöse Intraepitheliale Neoplasie	Histopathologie
SIN I	Basale und parabasale Hyperplasie
SIN II	Atypische Hyperplasie (Risikoepithel) Carcinoma in situ
SIN III	

(Wenig, 2002)

Das Carcinoma in situ unterscheidet sich zum Karzinom lediglich dahingehend, dass es die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat und die Invasion und Infiltration tiefer gelegener Schichten noch nicht vorangeschritten ist.

Diese Präkanzerosen besitzen bereits solch erhebliche Epithelveränderungen, dass die Wahrscheinlichkeit zum invasiven Karzinom entarten zu können sehr hoch ist. Das Entartungsrisiko obligater Präkanzerosen liegt in etwa bei >10 % (Reichart, 2000).

1.2.5. Molekularpathologie

Die Entartung einer physiologisch funktionellen Zelle zu einer Tumorzelle entsteht durch eine Vielzahl molekulargenetisch ablaufender Prozesse. Diese kumulieren im Sinne einer mehrschrittigen Entartung mit Verlust der Zellzyklus-Kontrolle und Umgehung des Apoptose-Mechanismus der Zelle.

Maßgeblich beteiligt an diesen Prozessen sind aktivierte Onkogene und deaktivierte Tumorsuppressorgene, welche durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und reguliert werden können. So können zum Beispiel Wachstumsfaktoren wie EGF oder virale Proteine wie E6/E7 der Papillomaviren zu Genamplifikation und Überexpression von Onkogenen sowie Mutation und Deletion von Tumorsuppressorgenen führen, welches letztendlich zur Entartung, mangelnder Differenzierung und Enthemmung des Wachstums der Zelle führt.

Califano et al. haben 1996 ein mögliches Modell im Sinne einer Mehrschritt-Karzinogenese bei HNSCC erstellt, welches den Prozess von der physiologischen Zelle zur pathologischen Entartung darstellt.

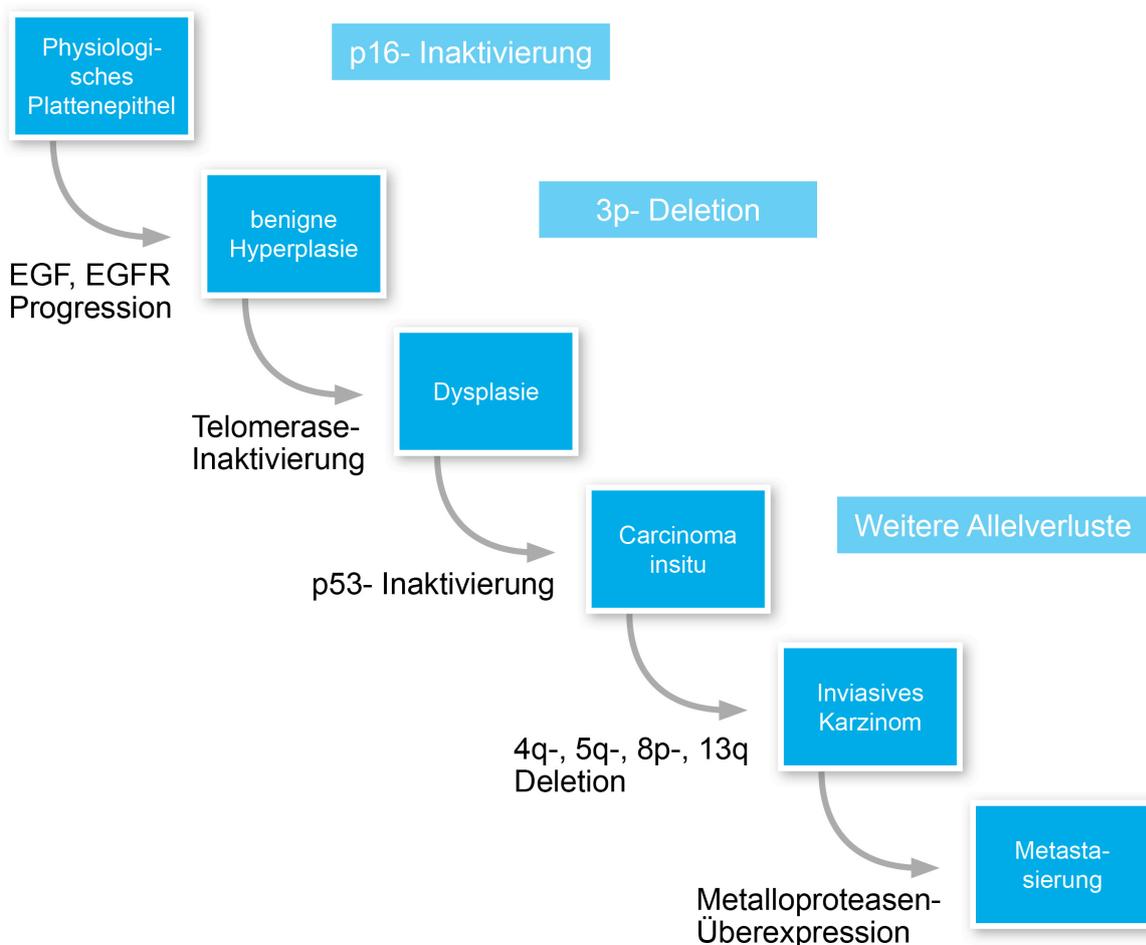


Abbildung 1: Modell zur Mehrschritt-Karzinogenese in HNSCC (Califano et al., 1996)

1.2.6. Prognose

Die Prognose des HNSCCs ist deutlich von der Lokalisation und dem Stadium des Tumors abhängig.

Dabei zeigt sich die beste Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von fast 100 % bei den kleineren glottischen Karzinomen der Stadien Tis und T1, sowie 90 % bei Lippenkarzinomen. Mit zunehmender Größe des Tumors sinkt die Prognose bis zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von 50 % bei transglottischen Tumoren im Stadium T4 und sogar nur 23 % beim Hypopharynxkarzinom (Guntinas-Lichius et al., 2010).

Anatomische Unterschiede im Lymphgefäßsystem machen den Lymphknotenstatus und somit die Prognose eines Patienten abhängig von der Lokalisation des Primärtumors. So beobachtet man für das Glottiskarzinom im Stadium T1 kaum Lymphknotenmetastasen, da es durch die dort fehlenden Lymphbahnen kaum Metastasierungswege gibt. Entsprechend ist auch die Prognose dieser Tumorentität sehr gut.

Für das supraglottische Karzinom werden hingegen häufig (bis zu 60 %) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Lymphknotenmetastasen beobachtet. Dies liegt zum einen am ausgeprägten Lymphabflussweg, zum anderen am häufig bereits fortgeschrittenen Wachstum des Primärtumors.

Aufgrund ihres symptomarmen Verlaufs werden Hypopharynxkarzinome häufig erst im T3 oder T4 Stadium diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung werden oft bereits zu 80 % regionale Metastasen beobachtet.

Bei diesen beiden Tumorentitäten ist die Prognose erheblich schlechter und die Wahrscheinlichkeit der 5-Jahres-Überlebensrate halbiert sich (Milisavljevic, Stankovic, Zivic, Popovic, & Radovanović, 2009).

Allen Lokalisationen gleich ist hingegen die schlechte Prognose bei einem T3/T4 Tumor im Vergleich zu einem T1 Tumor.

Auch die Invasion und Infiltration tumorösen Gewebes in Blut (V1) und Lymphgefäße (L1) spielt eine erhebliche Rolle für die Prognose und das Outcome der Patienten. Ein kapselüberschreitendes Wachstum von Lymphknotenmetastasen verursacht einerseits eine erhöhte Rate an lokoregionären Rezidiven und andererseits eine höhere Wahrscheinlichkeit Fernmetastasen zu setzen (Califano et al., 1996).

Ein weiterer, erst in den letzten Jahren besser erforschter Prognosefaktor, dessen Bedeutung auch durch seine steigende Inzidenz bekräftigt wird, ist ein positiver HPV Status. Zwei wesentliche Faktoren lassen sich dabei immer mehr ins Zentrum alternativer Überlegungen rücken.

Zum einen die beobachtete inzidentelle Relevanz. Die Inzidenz des HPV-positiven Oropharynxkarzinoms stieg in den letzten Jahren stark an (siehe auch Kapitel 2.3.1.). Zum anderen die klinisch-therapeutische Relevanz. HPV-positive Patienten sind im Mittel etwa zehn Jahre jünger und haben in der Konsequenz auch eine bessere Prognose (30 % höhere Heilungschancen) und Überlebenszeit. Das signifikant längere mediane Gesamtüberleben im Vergleich zu HPV-negativen Patienten (131 versus 20 Monate; $p < 0,001$; Hazard Ratio 0,31) macht Überlegungen über alternative

Therapieansätze und oder eine De-Intensivierung der jetzigen Therapie notwendig (Höer & Klein, 2013).

1.2.7. Therapie

Es stehen heutzutage vier konstitutive Maßnahmen für die Behandlung von Kopf-Halstumoren zur Verfügung. Die chirurgische Resektion, die Radiotherapie, die Chemotherapie und die Target Therapie. Dabei ist es möglich und auch klinisch praktiziert, alle Modalitäten untereinander zu kombinieren. Das therapeutische Vorgehen richtet sich individuell tumorbezogen nach der Lokalisation, Metastasierung und dem histopathologischen Grading des Tumors und multidisziplinär nach möglichen Risikofaktoren, Morbidität und Prognose des Patienten.

Da sich etwa 30 bis 40 % aller Plattenepithelkarzinome im HNO-Bereich in Frühstadien (Stadium I und II) manifestieren, werden diese Tumore in der Regel entweder primär operiert (mit einer eventuellen anschließenden adjuvanten Radiotherapie), oder in kurativer Absicht radio-(chemo-)therapiert. Bei HPV-positiven Tumoren liegt der Anteil der früherkannten Manifestation zwar prozentual höher, dafür scheinen sie jedoch auch früher zu metastasieren. Beide Modalitäten zeigen vergleichbare Raten an einer lokalen Kontrollen und Gesamtüberleben (Timothy, Collen et al., 2001).

Bei lokoregionär höheren Stadien wird die primär chirurgische Resektion mit einer postoperativen Radiotherapie kombiniert. Liegt eine weitere Risikokonstellation mit R1-Resektion, Perineuralscheiden- oder Gefäßinvasion, sowie kapselüberschreitendem Wachstum der Lymphknotenmetastasen vor, wird eine postoperative Radiochemotherapie mit Cisplatin/ 5-FU empfohlen (Pignon, Maître, Maillard, & Bourhis, 2009).

Bei zwar resektablen Tumoren, aber zu erwartender mutilierender Chirurgie oder aber nicht resektablen Tumoren wird eine primäre Radio-Chemotherapie bevorzugt, wobei alternativ zur platinhaltigen Chemotherapie eine konkomittierende Gabe von Cetuximab zur Radiotherapie in Frage kommt.

Die Strahlentherapie erfolgt in erster Linie als perkutane Therapie mit Linearbeschleunigern und wie bereits beschrieben zumeist in Kombination mit einer simultanen Chemotherapie, die eine radiosensibilisierende Wirkung und somit einen Überlebensvorteil bewirken soll (Berger et al., 2010).

Das progressionsfreie Überleben wird durch eine solche simultane Radiochemotherapie signifikant verbessert (Boetz, 2008).

Die Strahlendosis wird mit Einzeldosen von 2 Gy auf eine Gesamtdosis von 66-70 Gy summiert. Wird die Radiotherapie bei lokal fortgeschrittenen Befunden eingesetzt, weil etwaige Komorbiditäten einen großen Eingriff nicht zulassen, kann durch eine Hyperfraktionierung versucht werden, den Strahleneffekt zu steigern.

Die alleinige Strahlentherapie war lange Zeit Standard in der nicht operativen Behandlung bei Patienten mit Kopf-Halstumoren. Heute wird sie meist nur noch bei frühen Kehlkopfkarcinomen in kurativer Absicht eingesetzt.

So ermittelten Al-Sarraf et al. 1998 bei alleiniger Strahlentherapie nach Operation bei Hochrisikopatienten fünf Jahre nach der Therapie Lokalrezidivraten von 27 % bis 61 % sowie Fernmetastasierungsraten von 18 % bis 21 % und ein 5-Jahres-Überleben von 27 % bis 34 % (Al-Sarraf et

al., 1998).

Neoadjuvant werden Dosen von 50 Gy eingesetzt. Bei einer postoperativen Strahlentherapie werden aufgrund des veränderten Gefäßstatus und der dadurch bedingten relativen Hypoxie mit Strahlenresistenz Dosen von 50-60 Gy benötigt.

Dank der 3-D-konformierenden Bestrahlung intensitätsmodulierter Radiotherapie (IMRT) können benachbarte Strukturen wie zum Beispiel Risikoorgane bestmöglich geschont werden. Die IMRT ermöglicht die Applikation unterschiedlich definierter Zielvolumina mit unterschiedlichen Einzeldosen. So werden beim simultan integrierten Boost (SIB) eine hohe Einzeldosis auf den makroskopischen Primärtumor gerichtet und gleichzeitig angrenzende, gefährdete Strukturen durch eine niedrigere Einzeldosis geschont sowie Risikoregionen ebenfalls mit einer tieferen Einzeldosis bestrahlt werden.

Eine alleinige zytostatische Chemotherapie findet überwiegend in palliativen Situationen Verwendung. Primäres Ziel dieser Behandlung ist es, die Lebensqualität dieser Patienten möglichst wenig zu beeinträchtigen und langfristig zu erhalten. Für die Behandlung können verschiedene Zytostatika als Mono- oder Kombinationstherapien eingesetzt werden. Der monoklonale Antikörper Cetuximab in Kombination mit Cisplatin und 5-FU verlängert das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben dieser Patienten deutlich im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie (Vermorken, Remenar, et al., 2007). Große Phase-III-Studien konnten mittlerweile eine deutliche Reduzierung der Lokalrezidivrate um 10 % bis 17 % sowie eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens durch die zusätzliche simultane Chemotherapie nachweisen (Bernier et al., 2005).

Ein weiterer Therapieansatz besteht in der sogenannten, weiter oben bereits erwähnten, Target Therapie, in der ein spezifischer Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Antikörper verwendet wird. Unter dem Namen Cetuximab wurde erstmals seit 30 Jahren – in Kombination mit der platinbasierten Chemotherapie – ein längeres medianes Gesamtüberleben (etwa drei Monate) erzielt (Gerber & Choy, 2010).

Das Ansprechen des Tumors auf Cetuximab kann durch die entsprechend hervorgerufenen kutanen Nebenwirkungen zwar abgeschätzt und als günstig angesehen werden, stellen aber auch einen erheblichen Verlust an Lebensqualität der Betroffenen dar (Segaert et al., 2005).

Bemerkenswert ist, dass trotz des signifikant besseren Überlebens und Ansprechens von HPV-positiven HNO-Tumoren auf diese Therapie es bis dato noch keinen Einfluss auf das therapeutische Regime dieser Tumorentität hat.

1.3. Humane Papillomaviren (HPV)

1.3.1. Aufbau und Epidemiologie

Die letzten Jahrzehnte klinischer Beobachtung und Untersuchung haben gesichert, dass Tumore im Kopf-Halsbereich neben Nikotin- und Alkoholabusus auch durch das Humane Papillomavirus verursacht werden können und somit eventuell eine eigene Tumorentität darstellen. Heutzutage gelten in den USA humane Papillomaviren als wahrscheinliche Auslöser jedes zweiten Oropharynx- und jedes vierten Mundhöhlenkarzinoms. Bis 2020 wird eine Verdopplung HPV-positiver Tumoren vorausgesagt. Die Inzidenz des HPV-positiven Oropharynxkarzinoms stieg von 1988 bis 2004 um 225 % an (von 0,8/100.000 auf 2,6/100.000). Gleichzeitig nahm die Inzidenz der HPV-negativen Oropharynxkarzinome im selben Zeitraum um 50 % ab (von 2,0/100.000 auf 1,0/100.000) (Wolff, Follmann, & Nast, 2013).

Nicht nur die steigende Inzidenz dieser Tumorerkrankung als vielmehr auch das bessere Therapieansprechen gegenüber HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen lässt die HPV-positiven Plattenepithelkarzinome zum Gegenstand der heutigen Forschung im Bereich der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde werden.

HPV ist ein zirkuläres, nacktes dsDNA (5–8 Kb) Virus, dessen Kapsidtyp ein Ikosaeder ist und dessen Größe 45–55 nm beträgt.

Von den mehr als 70 bekannten Serotypen führen die Meisten in der Regel zu gutartigen Haut- und Schleimhauttumoren (Warzen). Einige dieser 70 Serotypen sind jedoch als high-risk-Typen (HR-HPV) an molekularpathologischen Transformationsprozessen beteiligt, welche schließlich zur Tumorentstehung beitragen.

Vor allem bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx lässt sich häufig eine HPV Assoziation – besonders Typ 16 – nachweisen (Ringström et al., 2002).

So weisen Tumoren der Zungengrund- und Gaumenmandeln eine Präsenz des Virus zu 45 bis 64 % auf. Seltener sind Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Hypopharynx und des Larynx mit der Präsenz von HPV-Viren zu beobachten (Strome et al., 2002).

1.3.2. Ätiologie HPV-induzierter Tumore im Kopf-Halsbereich

Die Erklärungen des Infektionswegs eines HPV-induzierten Tumors basieren zum großen Teil auf Vermutungen und Hypothesen. Tatsache ist, dass die perorale HPV-Infektion nicht selten ist und bei immunkompetenten Empfängern oft ereignislos abheilt.

Die orale Autoinokulation scheint demnach nicht sehr wahrscheinlich, zumal bei Frauen mit HPV-positivem Zervixkarzinom keine erhöhte orale HPV Rate festgestellt werden konnte (Smith et al., 2004).

Die Beobachtung, dass eine hohe Promiskuität oder mehr als sechs Oralsexpartner mit einem erhöhten Risiko eines Plattenepithelkarzinoms im HNO-Bereich einhergehen (D'Souza et al., 2007), spricht hingegen für die Annahme, dass die sexuelle Übertragung auch für oropharyngeale HPV-

induzierte Tumore angenommen werden kann. Verifiziert wird diese Annahme auch durch die Beobachtung, dass bei Frauen mit bekanntem HPV-assoziierten Anogenitalkarzinom und deren Ehemännern das Risiko für ein HPV-assoziiertes Plattenepithelkarzinom im HNO-Bereich erhöht ist (Hemminki, Dong, & Frisch, 2000).

Diese Erkenntnis stützt die Vermutung des Einflusses sexuellen Verhaltens auf die Entstehung HPV-assoziiierter Karzinome im HNO-Bereich (L. G. Morris, Sikora, Patel, Hayes, & Ganly, 2011).

1.3.3. Molekularpathologie bei HPV-positiven Tumoren

Der Weg zur tumorösen Zelle ist immer ein Weg über akkumulierende molekulare Ereignisse, eine Summation von DNA-Schäden, die schließlich zur genetischen Instabilität führen. Ein solch frühes Ereignis ist dabei beispielsweise eine Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 9, das in der Konsequenz zur Inaktivierung des p16-Gens und somit zur Behinderung im Zellzyklus führt. Das bereits dargestellte Tumorprogressionsmodell von Califano et al. aus Abbildung 1 veranschaulicht die stattfindenden Prozesse.

Die Pathogenität von HP-Viren resultiert ebenfalls auf einer Störung des physiologisch ablaufenden Zellzyklus, jedoch auf einem alternativen Weg. HP-Viren führen durch Integration ihrer viralen DNA in die Wirtszell-DNA und einer Expression viraler Proteine E6 und E7 zur Inaktivierung der zellulären Tumorsuppressorproteine p53 und Rb, wodurch eine zunehmende chromosomale Instabilität entsteht und schließlich die Transformation zur tumorös proliferierenden Zelle wahrscheinlicher wird.

E7 hemmt dabei spezifisch Rb, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F aktiviert, das zelluläre Tumorsuppressorgen p16^{INK4a} hochreguliert und die Transkription proliferativer S-Phase Gene vorangetrieben wird. Dies ermöglicht der Zelle einen ungehemmten Eintritt in die S-Phase.

Es ist bekannt, dass transkriptionell aktive HPV16-E7-positive Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich in 90 % der Fälle p16 koexprimieren. P16 wird deshalb als ein, der HR-HPV-Typisierung äquivalenter Marker, der für die routinemäßige histopathologische Diagnostik geeignet ist, angesehen (Reimers et al., 2007).

E6 hemmt p53, indem es dessen proteolytischen Abbau durch Ubiquitylierung (durch mdm2) vorantreibt. Dies verhindert einen durch p53 erzwungenen Zellzyklusarrest und die durch p53 gesteuerte Apoptose.

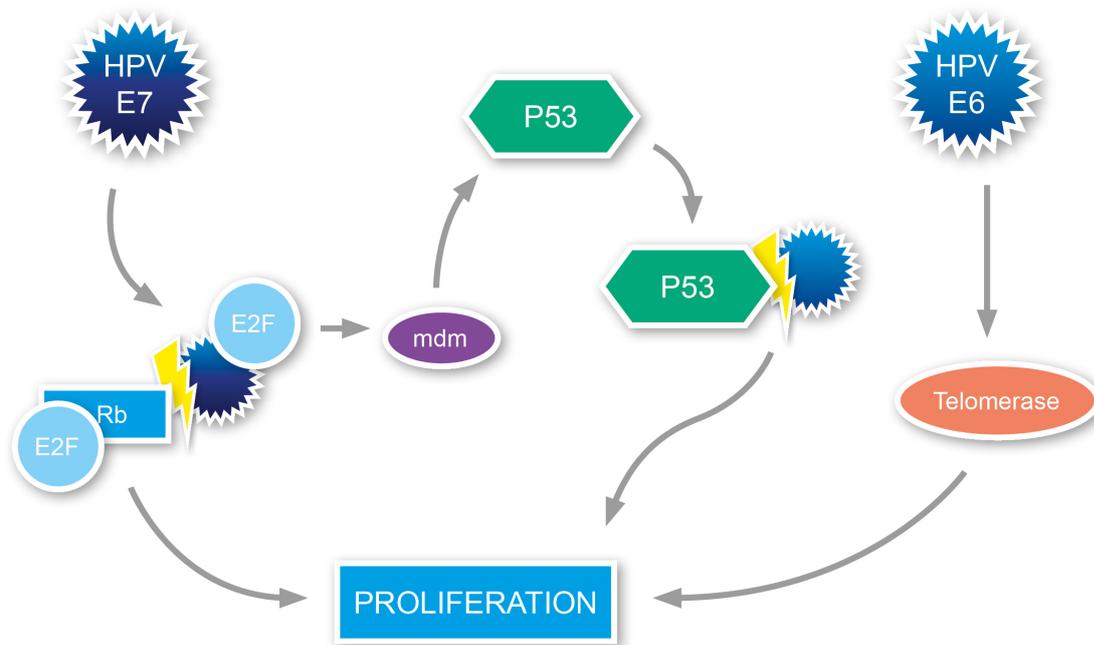


Abbildung 3: Molekularpathologie bei HNSCC mit HPV.-Assoziation

(Vinokurova & von Knebel Doeberitz, 2011)

1.3.4. Prognose

Neben bekannten Prognosefaktoren wie Tumorgöße bzw. das Tumorstadium, Fernmetastasierung, Grading, Alter der Patienten und deren Karnofsky Index und diversen Biomarkern wie EGFR, VEGFR etc., kommt dem Nachweis einer HPV-Assoziation ebenfalls prognostische Relevanz zu. Sie übersteigt eventuell viele bekannte Risikofaktoren, beispielsweise eine regionäre Metastasierung.

Bis heute ist die Ursache für das signifikant bessere Therapieansprechen HPV-positiver Oropharynxkarzinome und demzufolge auch das verbesserte Überleben nicht gänzlich geklärt.

Fest steht, dass prospektiv randomisierte Studien retrospektiv beobachtete Daten bestätigen konnten, nämlich dass das mediane Gesamtüberleben bei HPV und p16-Positivität bei diesen Tumoren mit einer besseren Prognose verbunden ist (Chaturvedi et al., 2011).

Diese Patienten hatten dabei nach einer Induktions-Chemotherapie und anschließender Radiochemotherapie bessere Ansprechraten und ein signifikant längeres medianes Gesamtüberleben als HPV-negative (131 versus 20 Monate; $p < 0,001$; Hazard Ratio 0,31), was eine Abgrenzung zu den ätiologisch unterschiedlichen, noxeninduzierten Oropharynxkarzinomen klinisch bedeutsam macht (Klussmann et al., 2004).

HPV und p16-Positivität bei diesen Tumoren sind demnach mit einer besseren Prognose verbunden. So konnte bei nachgewiesener p16-Expression und gleichzeitigem Nachweis onkogener HPV-DNA eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für ein 5-Jahres-Überleben als bei für diese Marker negativen Karzinomen nachgewiesen werden (84 % versus 49 %) (Fakhry & Gillison, 2006).

Ein Teilaspekt, welcher das bessere Gesamtüberleben mitbegründet ist damit zu erklären, dass bei Positivität in der Anamnese zusätzliche Noxen wie Alkohol und Nikotin fehlen und betroffene Patienten im Mittel etwa zehn Jahre jünger sind (30 % höhere Heilungschancen) (Fakhry & Gillison, 2006).

1.3.5. Therapie

Trotz des signifikant besseren Ansprechens auf die Therapie von HPV-positiven HNO-Tumoren hat dies bis heute jedoch keinen Einfluss auf das therapeutische Regime. Es entspricht dem der noxeninduzierten Tumorentitäten. Auf die Überlegung einer Deintensivierung oder alternativen Therapien wird im Anschluss an die Ergebnisse der unten aufgeführten Untersuchungen eingegangen.

1.4. Zielsetzung

Unabhängig der großen Fortschritte bei den Behandlungsmöglichkeiten bei HNSCC haben sich die Überlebensraten bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich in den letzten 30 Jahren nicht signifikant verbessert (Greenlee, Hill-Harmon, Murray, & Thun, 2001).

Vor allem die operative Resektion des Tumors, aber auch Radio- (Chemo-) therapie sind trotz guter plastisch-chirurgischer Rekonstruktion und moderner Epithetik sowie neuen Innovationen in der Strahlentherapie aufgrund der engen anatomischen Gegebenheiten mit erheblichen postoperativen und postradiogenen Belastungen für den Patienten verbunden. Besonders der Funktionserhalt von Sprech- und Schluckorganen ist stark gefährdet, sodass eine de-intensivierende Therapie bei einer Tumorentität wie den HPV-positiven Karzinomen die Chance auf eine optimierte post-therapeutische Lebensqualität für die Patienten wäre.

Dieser Chance möchte die vorliegende Arbeit in diversen Versuchen nachgehen und prüfen, ob und inwieweit HPV-positive Tumore alternativ und nachhaltig therapiert werden können.

Dabei galt es zum einen die Frage zu beantworten ob und inwiefern HPV-positive Zellen im Vergleich zu HPV-negativen Zellen unterschiedlich auf die entsprechenden Therapiemodalitäten ansprechen. Zum anderen wurden Chemo-, Radio- und Antikörpertherapie untereinander kombiniert, um mögliche Summationseffekte der verschiedenen Therapien aufzudecken. Eine an das HPV-positive Karzinom adaptierte Therapie würde einen post-therapeutischen Benefit und somit ein besseres Outcome der Patienten bedeuten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 8: Geräte

Geräte	Firma und Firmensitz
Absaugpumpe Vacuubrand LE2	Vacuubrand, Wertheim
Bestrahlungsgerät C1000 Thermo Cycler	Gulmay Medicals, Chertsey, England Biorad, München
Cleanbench: Hera safe KS	Thermo Scientific, Langenselbold
Cellometer Auto T4	PeqLab, Erlangen
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 150i	Thermo Scientific, Langenselbold
Eppendorf Research-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Gilson Pipetman	Gilson, Middletown USA
Laborabzug	Köttermann, Uetze
Liebherr Gefrierschrank no frost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Liebherr Kühlschranks comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Leica DMI 6000B	Leica Microsystems, Wetzlar
MS2 Minishaker NanoDrop 1000	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Pipettus-akku Accu-jet Pro	Brand, Wertheim
Power Pac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH,
Scaltec Rezeptureinwaage	Scaltec, Göttingen
Schüttler/ MischerVibrax VXR	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma und Firmensitz
15 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
50 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Biosphere Micro Tubes	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Distainingbags	Amresco, Solon, USA
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Pipetten-Spitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
25 ml, 10 ml, 5 ml	
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg

2.1.3. Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 10: Reagenzien

Reagenz	Firma und Firmensitz
Crystal violett	Aldrich Chemie, Steinheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate	GE Healthcare, München

2.1.4. Zelllinien

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Lokalisation	TNM	Grading	HPV	Alter	Geschlecht
Cal27	Zunge	TXNXMX	G3	neg.	56	m
UD-SCC-2	Hypopharynx	T1N2M0		pos.		m
UD-SCC-5	Supraglottisches Larynxkarzinom	T1N1M1	G3	neg.	44	m

2.1.5. Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 12: Zellkultur Supplements

Reagenzien für die Zellkultur

Accutase

Dimethylsulfoxid (DMSO)

RPMI 1640 Medium

Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM)

Fetal Bovine Serum (FBS)

L-Glutamin 200 mM

Phosphatgepufferte Salzlösung (1xPBS)

Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 Units/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin)

Firma und Firmensitz

PAA Laboratories, Pasching

Austria Carl Roth GmbH

GIBCO, Invitrogen, Darmstadt

GIBCO, Invitrogen, Darmstadt

Biochrom AG, Berlin

Biochrom AG, Berlin

PAA Laboratories, Pasching, Austria

Biochrom AG, Berlin

2.1.6. Inhibitoren

Tabelle 13: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller	Verwendete Konzentration
Cetuximab	Merck, Darmstadt	140 nM
Cisplatin	Medac GmbH, Wedel	2,5 μ M, 0,25 μ M
5-FU	Medac GmbH, Wedel	2,5 μ M, 0,25 μ M

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Vorbemerkung

Vor Beginn der Arbeiten wurden alle Reagenzien und Medien im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Als Medien wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) für die Zelllinien Cal27 und UD-SCC-5 und Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 640 für die Zelllinie UD-SCC-2 verwendet. Beiden Medien wurden 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer entsprechenden Arbeitsbank durchgeführt.

Vor und nach den Arbeiten wurden Hände und Arbeitsflächen mit 70 % Ethanol gründlich gereinigt. Zusätzlich wurden alle an der Sterilbank verwendeten Geräte ebenfalls entsprechend desinfiziert.

2.2.1.2. Auftauen der Zellen

Die Medien wurden auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt.

Es wurden 7 ml Medium in eine Kulturschale und 5 ml Medium in ein 15 ml Zellkulturröhrchen vorgelegt.

Anschließend wurde ein Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C angetaut.

Die angetauten Zellen wurden in die vorbereiteten Zellkulturröhrchen gegeben und ausreichend mit der Pipette durchmischt.

Die so entstandene Zellsuspension wurde in die jeweilige Kulturschale überführt, leicht geschwenkt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Ein Mediumwechsel erfolgte am darauf folgenden Tag.

2.2.1.3. Zellkulturpflege

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage, indem das alte Medium abgesaugt und durch 7 ml frisches Medium ersetzt wurde.

2.2.1.4. Zellen splitten

Der Zeitpunkt des Splittens war abhängig vom Proliferationsverhalten der Zellen. Optimal war ein Splitten der Zellen beim Erreichen einer Konfluenz zwischen 70-80 %.

Das Medium wurde komplett abgesaugt und einmalig mit 5-6 ml PBS gespült.

Anschließend wurden 2 ml Accutase pro 10 cm Kulturschale hinzugegeben und die Zellen 5-10 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen von der Schale abgelöst waren wurde 4 ml frisches Medium hinzupipettiert und die entstandene Zellsuspension in einen 15 ml Falcon überführt. Hierauf wurden die Zellen gründlich vereinzelt und anschließend 1 ml der Suspension auf eine neue 10 cm Kulturschale verteilt.

2.2.1.5. Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beim Splitting mittels Accutase abgelöst und in ein 15 ml Zellkulturröhrchen überführt. Die Zellkulturröhrchen wurden bei 1500rpm 2 min zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde komplett abgesaugt und das Zellpellet in Freezing Medium (DMEM bzw. RPMI + 20 % FCS + 5 % DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in vorbereitete Kryoröhrchen überführt.

Die Kryoröhrchen wurden kurz auf Eis gestellt und anschließend bei -20°C über Nacht eingefroren.

Die Langzeitaufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.1.5. Statistische Auswertungen

Auswertungen zur statistischen Überprüfung von signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungen wurden mit der Software GraphPad Prism 6 von GraphPad durchgeführt. Unter der Annahme einer Normalverteilung der gemessenen Werte wurden dabei unpaired t-tests zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen unter dem Signifikanzniveau $p < 0.05$ verwendet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mittels Prism 6. Alle Versuche wurden $n = 3$ durchgeführt, Invasionsversuche $n = 4$.

2.2.2. Behandlung der Zellen

2.2.2.1. Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen wurde mit einem Strahlengerät der Firma Gulmay Medicals und Cumbs in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Michael Molls durchgeführt.

Tabelle 14: Standardeinstellung Strahlengerät

Spannung	Stromstärke	Tischhöhe	Filter
70 kV	10 mA	466 mm	3

Anmerkung:

Zu Beginn der Experimente galten noch die alten Standardeinstellung mit folgenden Werten: Spannung von 70 kV, eine Stromstärke von 10 mA, eine Tischhöhe von 490 mm und der Filter #3. Diese wurden im Laufe der Experimente auf oben genannte geändert. Im Folgenden stehen die *alten* Werte in Klammern.

Die gewünschte Strahlendosis wurde durch die jeweilige zeitliche Strahlenexposition erreicht. Eine Dosis von 2 Gy wurde mit 2 min (1 min 42sec) Bestrahlung erreicht, eine Dosis von 10 Gy erreichte man mit einer 10 minütigen Bestrahlung usw.

Die Zellen wurden stets in der Kulturschale mit Medium und Deckel bestrahlt.

2.2.2.2. Auszählen von Zellen

Für den Crystal-Violett-ELISA-Assay und den Colony-Formation-Assay mussten die Zellen vorher ausgezählt werden. Die Zellen wurden von der 80 % konfluenten Kulturschalen abgelöst, gepoolt und mittels dem Zellzähler Cellometer AutoT4 von PeqLab gezählt und auf 1×10^4 Zellen eingestellt. Anschließend wurden aus diesem Pool 100 μ l in einen mit 5 ml Medium vorgelegten 6-Well überführt, sodass sich in jedem 6-Well 5×10^3 Zellen befanden. Wurde diese Suspension 1:10 verdünnt erhielt man 5×10^2 Zellen, die für den Colony-Formation-Assay nötig waren. Die Ansätze wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank über Nacht kultiviert und am nächsten Tag mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt.

2.2.2.3. IC₅₀- Konzentrationskinetiken

Um die aussagekräftigste Konzentration und den somit bestmöglichen Effekt nachweisen zu können, wurde in zahlreichen Versuchen die mittlere inhibitorische Konzentration der einzelnen Wirkstoffe ermittelt.

Hierbei wurden jeweils 5×10^3 bzw. 5×10^2 Zellen in einen mit 5 ml Medium vorgelegten 6-Well überführt und in aufsteigender Konzentration der Inhibitor hinzugegeben. Nach 10 tägiger Inkubation konnte die Kinetik ausgewertet werden.

2.2.2.4. Crystal-Violett-ELISA

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde durch Crystal-Violett-ELISA-Assays beurteilt. Hierbei wurden die Zellen wie bereits beschrieben ausgezählt und über Nacht angesetzt. Am Behandlungstag wurden die Inhibitoren angesetzt und die durch zahlreiche Vorversuche festgelegten Konzentrationen hinzugegeben.

Es wurden bestrahlte und unbestrahlte, Einzel- und Kombinationsansätze miteinander verglichen, wobei die Bestrahlung eine Stunde nach Inhibitorzugabe erfolgte.

Behandelt wurden die Zellen mit Cisplatin (0,25 μM und 2,5 μM), 5-FU (0,25 μM und 2,5 μM) und Cetuximab (100 nM), bestrahlt und unbestrahlt.

2.2.2.5. Colony-Formation-Assay

Das klonogene Überleben der Zellen wurde durch das Colony-Formation-Assay festgestellt. Auch hier wurden die Zellen mit Cisplatin, 5-FU, Cetuximab, deren Kombinationen miteinander, bestrahlt sowie unbestrahlt verglichen.

Die Zellen wurden wie beim Crystal-Violett-ELISA von 80 % konfluenten Kulturschalen mittels Accutase abgelöst und in einem Kulturröhrchen gründlich suspendiert. Anschließend wurden die Zellen ausgezählt und 5×10^2 Zellen pro 6-Well in 5 ml Medium ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurden die Inhibitoren hinzugegeben und eine Stunde später bestrahlt. Die Zellen verblieben im Anschluss für 10 Tage im Brutschrank.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gespült, für 20 min mit 4 % Formaldehyd/PBS Lösung bei Raumtemperatur fixiert, wiederum mit PBS gespült und anschließend mit Crystal-Violett 20 min angefärbt. Die gefärbten Kolonien wurden per Hand ausgezählt.

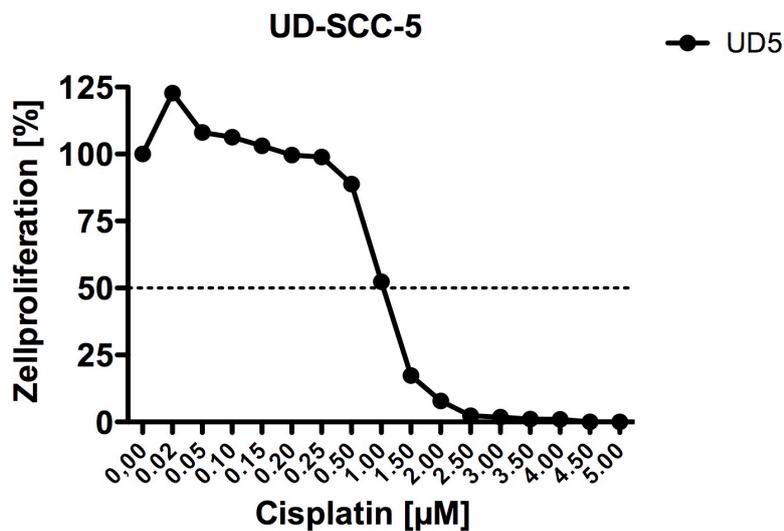
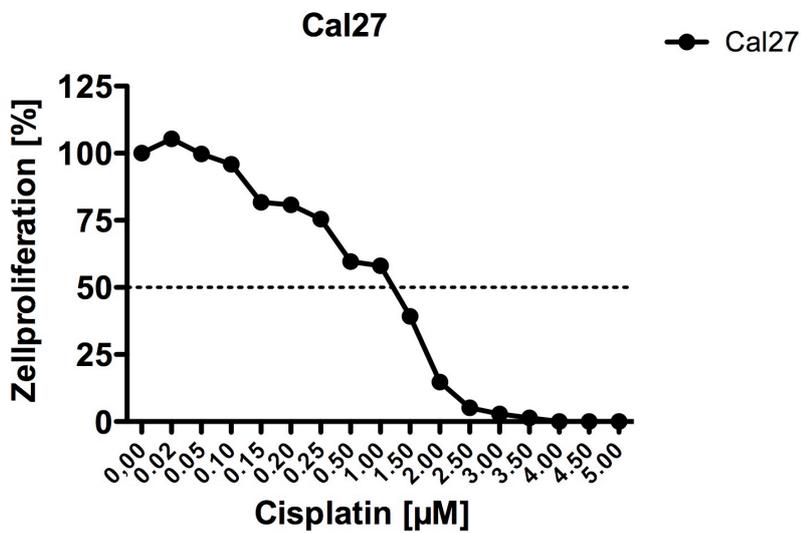
3. Ergebnisse

3.1. IC₅₀- Konzentrationskinetik

Mit der Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration der einzelnen Wirkstoffe und deren Kombinationen auf die jeweiligen Zelllinien wurde die Basis für die weiteren Versuche geschaffen.

3.1.1. IC₅₀ Cisplatin

Für Cisplatin fand sich bei der Zelllinien Cal27 eine IC₅₀ von 1,25 µM, bei UD-SCC-5 von 1 µM und bei UD-SCC-2 von 0,85 µM.



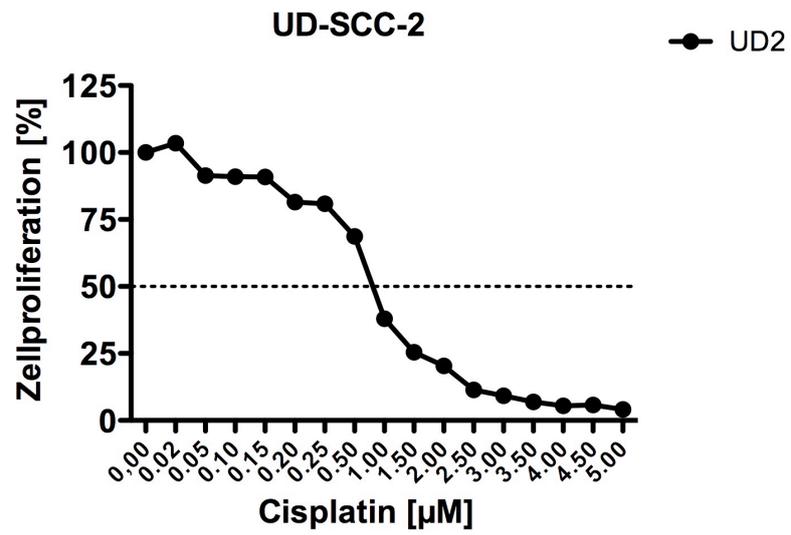


Abbildung 4: IC_{50} Bestimmung für Cisplatin.

3.1.2. IC₅₀ 5-FU

Für 5-FU fand sich bei der Zelllinien Cal27 eine IC₅₀ von 1,4 µM, bei UD-SCC-5 von 1,25 µM und bei UD-SCC-2 von 0,75 µM.

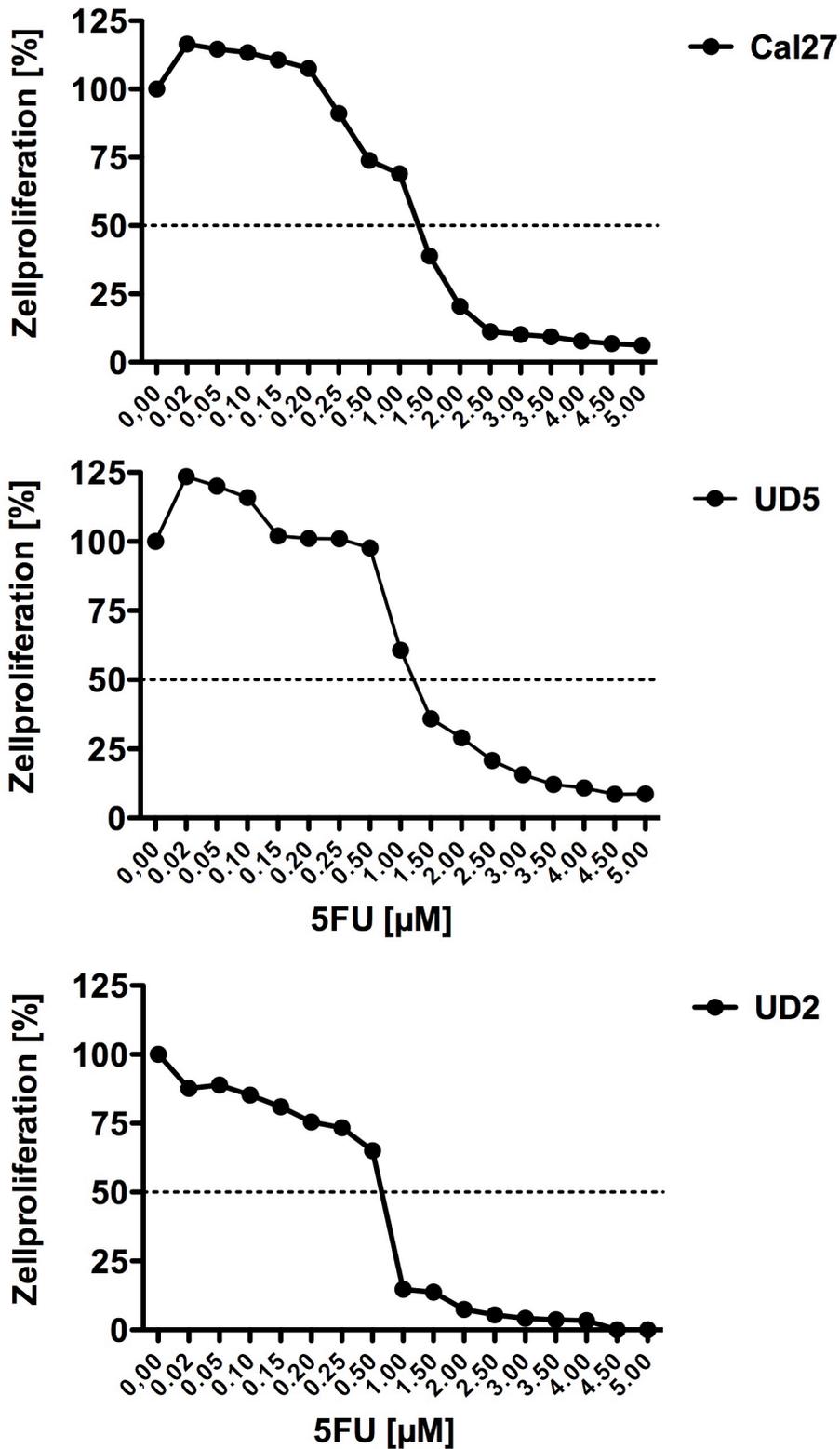
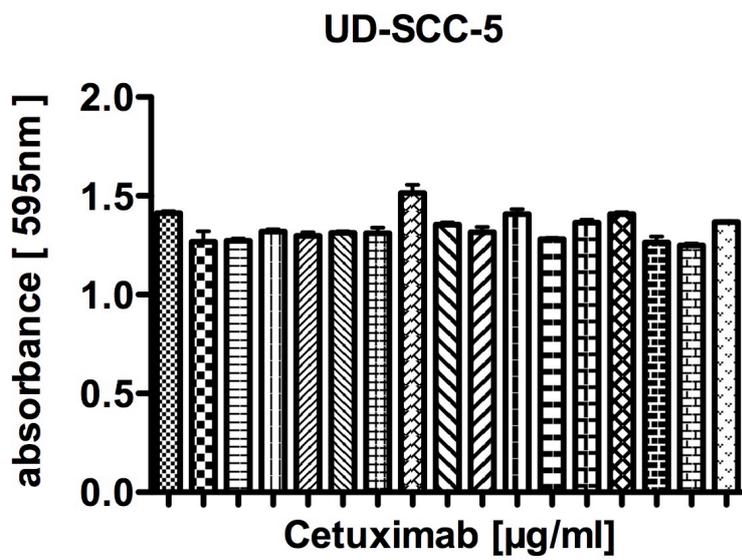
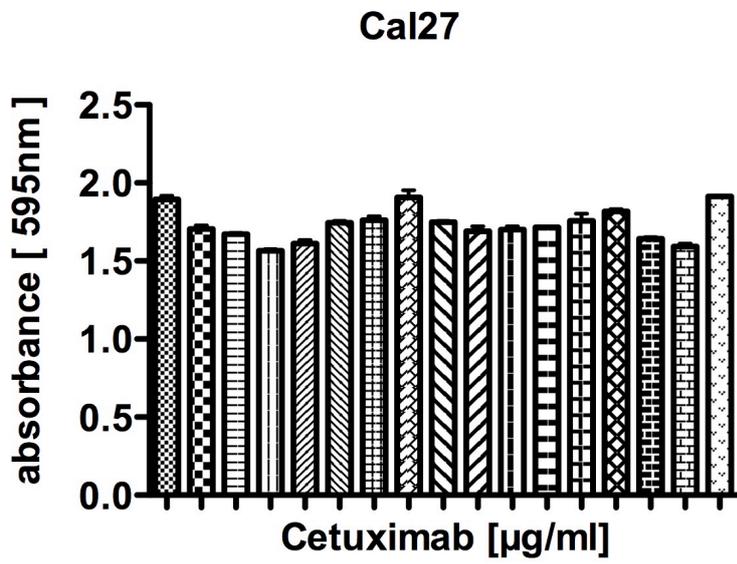


Abbildung 5: IC₅₀ Bestimmung für 5-FU.

3.1.3. IC₅₀ Cetuximab



UD-SCC-2

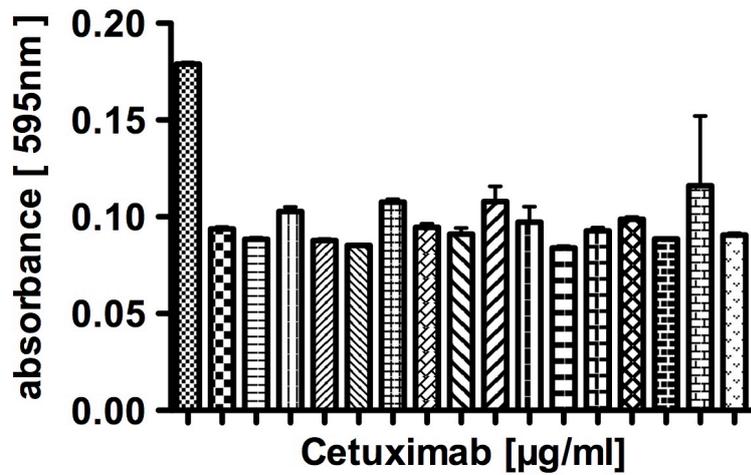
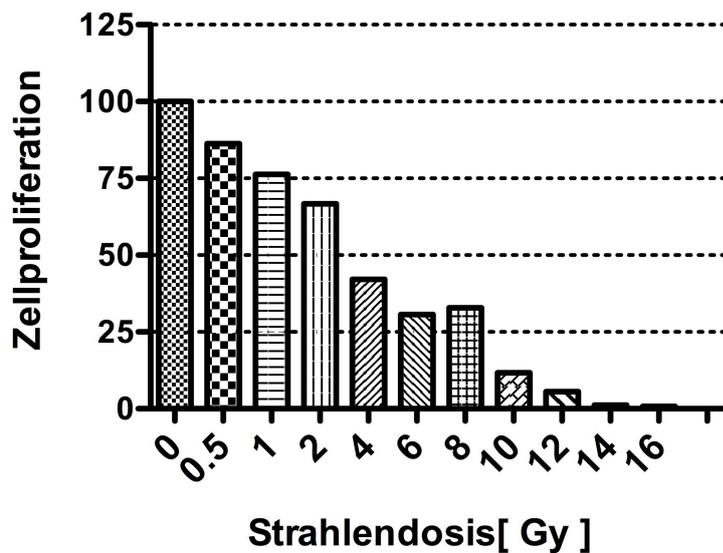


Abbildung 6: IC₅₀ Bestimmung für Cetuximab

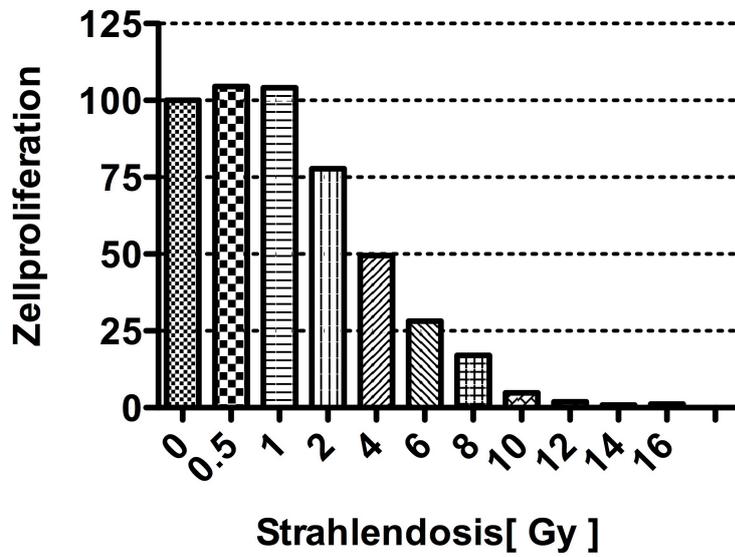
3.1.4. IC₅₀ Strahlenbehandlung

Die jeweilige Zelllinie wurde steigender Strahlenbelastung von 0 - 16 Gy ausgesetzt, um somit das Verhalten der Zellen auf ionisierende Strahlung zu dokumentieren. Anschließend wurde der IC₅₀-Wert für die einzelnen Zelllinien ermittelt. Der IC₅₀-Wert betrug hierbei für die Zelllinie Cal27 3,6 Gy, bei UD-SCC-5 4,1 Gy und bei UD-SCC-2 1,2 Gy.

Cal27



UD-SCC-5



UD-SCC-2

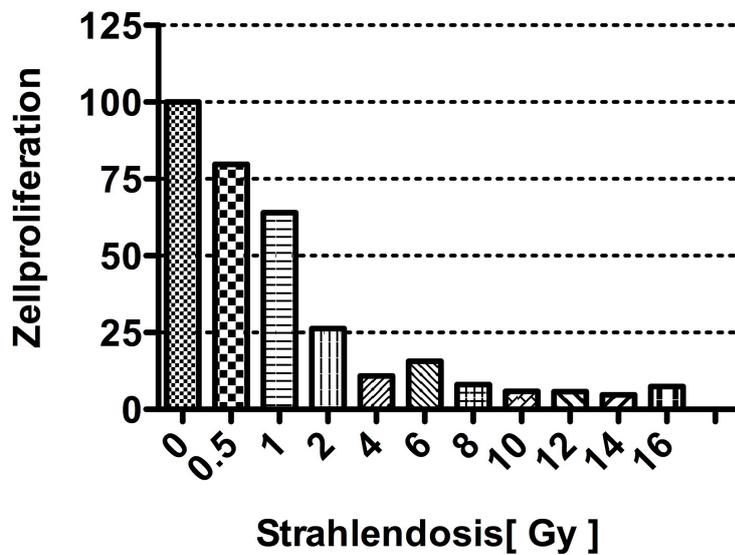


Abbildung 7: Strahlenkinetik aller Zelllinien

3.2. Proliferationsanalysen

3.2.1. Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Medikamentendosen

Basierend auf den Ergebnissen der Kinetiken wurden die Konzentrationen 0,25 μM und 2,5 μM für Cisplatin und 5-FU und 5 mg/ml für Cetuximab ausgewählt um Proliferationsanalysen in Form von Crystal-Violett-ELISA-Assays durchzuführen.

Hierfür wurden die Inhibitoren jeweils einzeln und in Kombination, mit und ohne Bestrahlung für die jeweiligen Zelllinien eingesetzt, um den bestmöglichen Vergleich des Ansprechens auf die unterschiedlichen Behandlungen zu erhalten. Besonderes Interesse galt dabei dem Verhalten von der HPV-positiven Zelllinie im Gegensatz zu den HPV-negativen Zelllinien auf welches die folgenden Ergebnisse weiter eingehen werden.

Die Versuche wurden in einem dreifachen Ansatz angelegt.

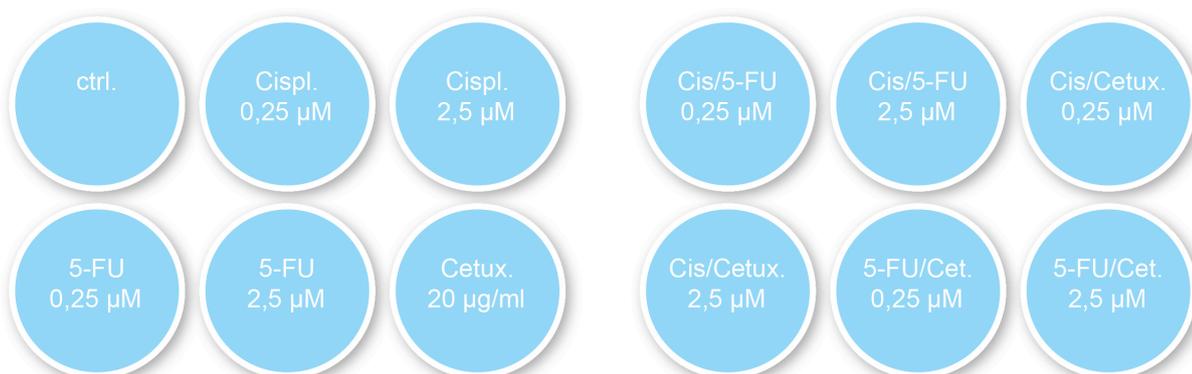


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kombinationsansätze der Crystal-Violett ELISA-Assays.

3.2.2. Ergebnisse Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Medikamentendosen und 2 Gy Bestrahlung

Betrachtet man die Ergebnisse der Kombinationsversuche unter dem Gesichtspunkt, dass die Zelllinien Cal27 und UDSCC-5 HPV negativ- und UDSCC-2 eine HPV-positive Zelllinie ist, lassen sich diverse Unterschiede im Ansprechen eruieren.

Für Cal27 und UDSCC-5 zeigte sich insgesamt eine Proliferationshemmung in allen kombinierten Ansätzen. Ohne Bestrahlung stellten sich 2,5 µM Cisplatin und 5-FU als singuläre Therapeutika am wirksamsten dar. Bei den Kombinationen war deren Kombination, also 2,5 µM Cisplatin + 5-FU stark proliferationshemmend, sodass ein auf die Kontrolle bezogenes Überleben von 5,51 % (Cal27) und 2,56 % (UDSCC-5) festzustellen war.

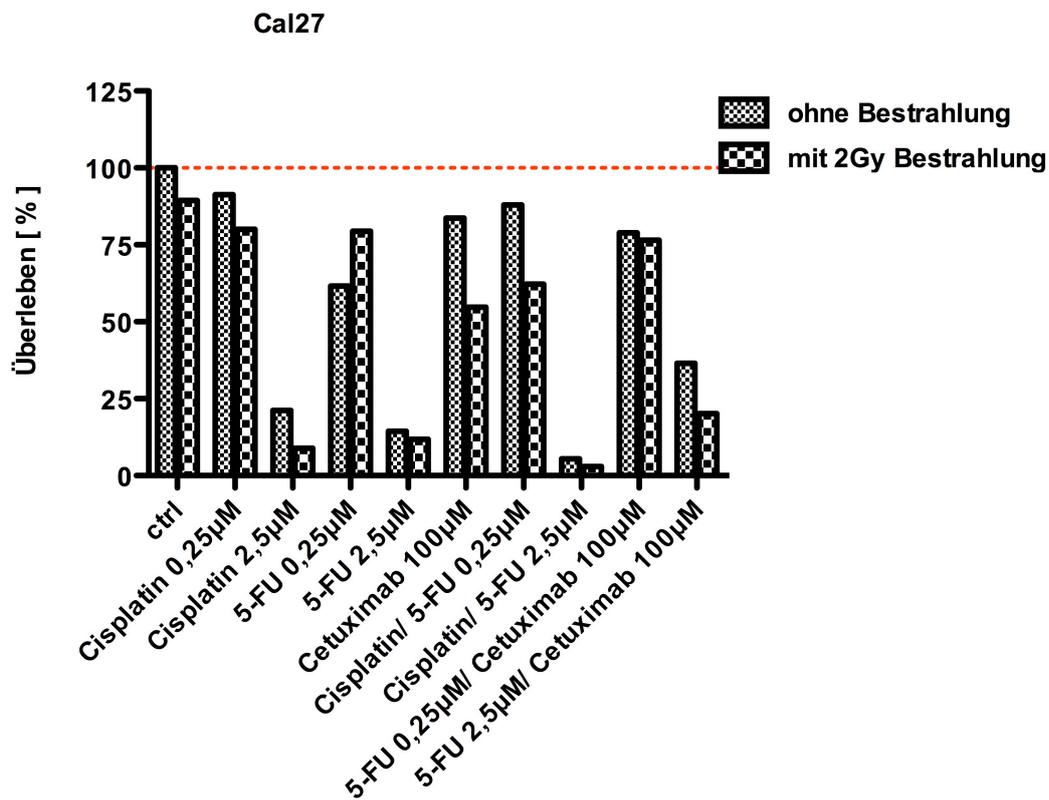
Der monoklonale Antikörper Cetuximab allein ließ zwar bei Cal27 mit $p = 0,0065$ einen signifikanten Proliferationsrückgang erkennen, das Überleben mit 83,72 % war jedoch vergleichsweise hoch. Bei UDSCC-5 war das Ansprechen auf die Kombination Cetuximab + 2,5 µM 5-FU mit einem Überleben von lediglich 8,93 % einhergegangen, wobei beachtet werden sollte, dass 2,5 µM 5-FU bei dieser Zelllinie auch zu einem Gesamtüberleben von 8,54 % führte.

Bestrahlte man die HPV-negativen Zelllinien zeigte sich für manche Kombinationen ein paradoxer, antagonistischer Effekt, der sogar mit einem besseren bzw. vergleichbaren Überleben wie mit alleiniger medikamentöser Therapie einherging. So war vor allem für UDSCC-5 bei den Kombinationen 0,25 µM 5-FU + 2 Gy, Cetuximab + 2 Gy und 0,25 µM Cisplatin/ 5-FU + 2 Gy ein verbessertes Wachstum im Vergleich zur Therapie ohne Bestrahlung zu beobachten. Cal27 zeigte diesen Effekt bei der Kombination 2 Gy Bestrahlung mit 0,25 µM 5-FU.

Vergleicht man nun die negativen Zelllinien mit der positiven UDSCC-2 Zelllinie zeigten sich in den unbestrahlten Ansätzen zunächst ähnliche Überlebensraten wie bei den negativen Zelllinien. 0,25 µM 5-FU war mit einem Überleben von 65,5 % Cisplatin in selber Konzentration mit einem Überleben von 73,95 % überlegen. Kombiniert in niedriger Konzentration zeigt sich kaum ein additiver Effekt (64,58 %). In hohen Konzentrationen fällt auf, dass zwar allgemein eine gute Proliferationshemmung zu beobachten war, die Kombination aus 2,5 µM Cisplatin + 5-FU wies jedoch nicht die fulminante Wachstumshemmung nach, die bei Cal27 und UDSCC-5 zu beobachten war. Das Überleben lag bei diesem Ansatz bei 15,59 % (2,5 µM Cisplatin = 16,78 % und 2,5 5-FU = 15,05 %).

Cetuximab zeigte wohl eine signifikante Wachstumshemmung ($p = 0,0008$), das Gesamtüberleben von 79,23 % war jedoch eher hoch. In niedriger Kombination mit 5-FU war diese deutlich niedriger (60,53 %) und bei hoher Konzentration von 5-FU mit einem Überleben von 20,09 % ähnlich gut wirksam wie Cisplatin 2,5 µM.

In den bestrahlten Ansätzen viel sofort auf, dass bereits die alleinige Bestrahlung den größten Effekt im Vergleich zu den negativen Zelllinien zeigte. Das Überleben reduzierte sich durch 2 Gy Bestrahlung auf 68,41 %. Dieser Wert lag bei Cal27 bei 89,39 % und bei UDSCC-5 bei 81,86 %. Eine deutliche Strahlensensibilität der HPV-positiven Zelllinien war demnach denkbar. Dies wurde auch durch die Kombinationsansätze bestätigt, wie bereits weiter oben beschrieben wurde.



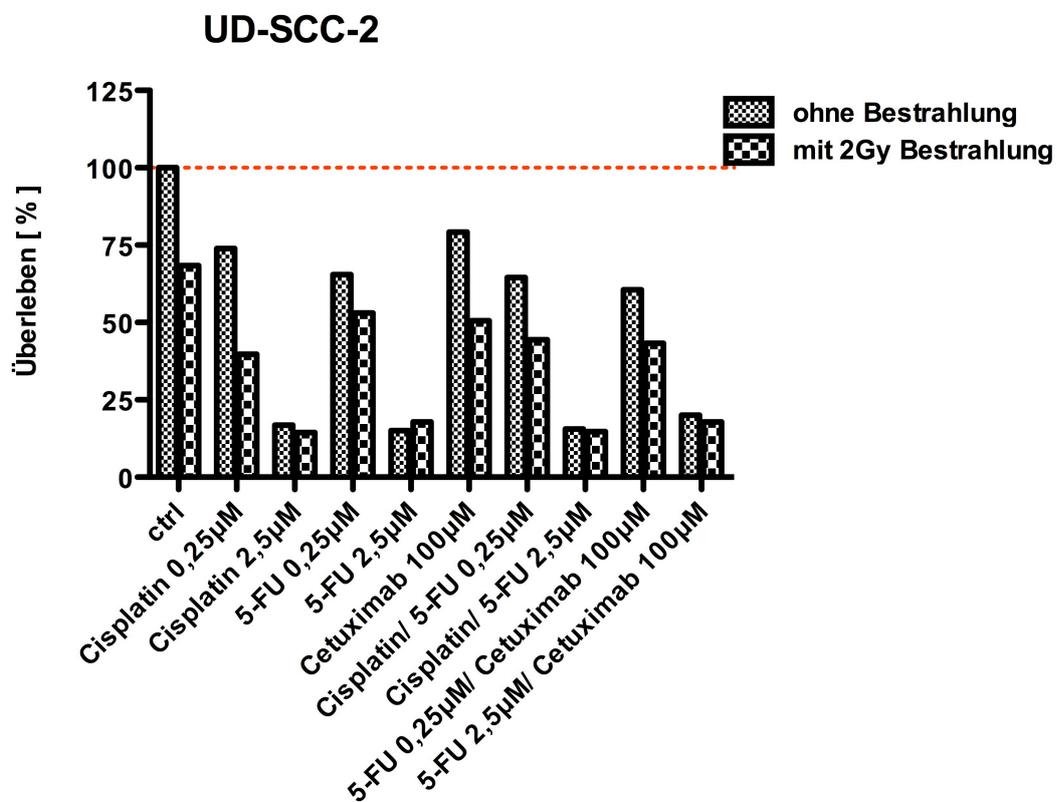
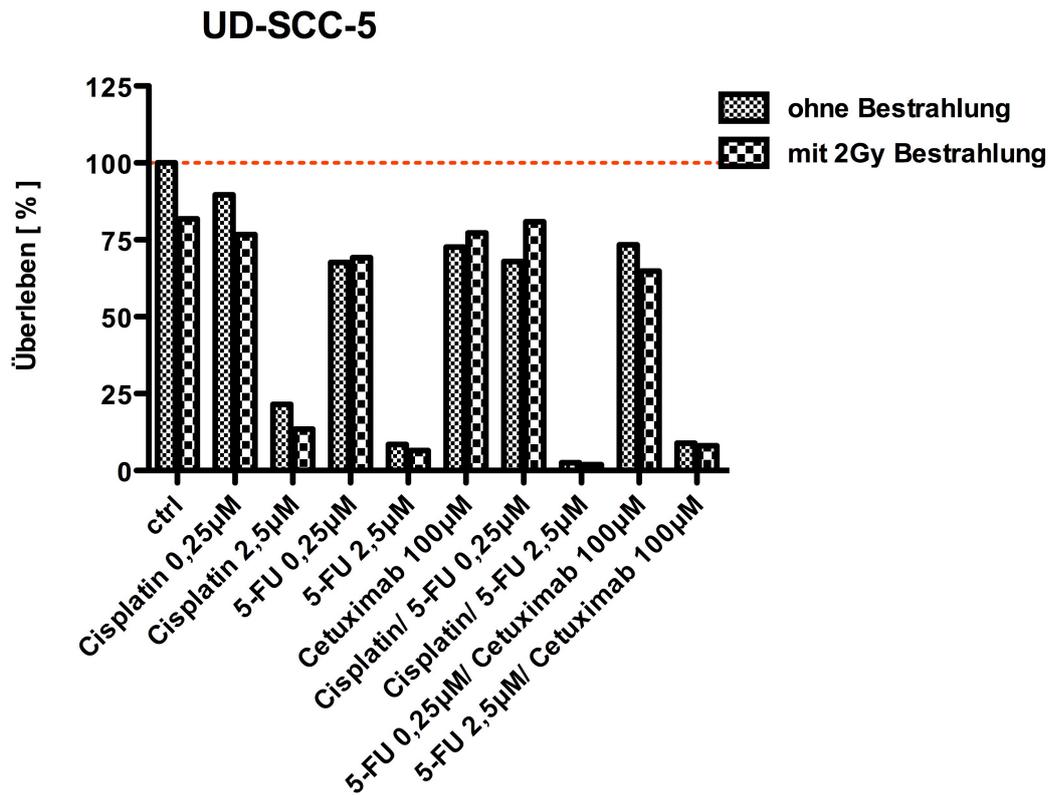


Abbildung 9: Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Medikamentendosen.

3.3. Kombinationsversuche für unterschiedliche Strahlendosen

Die Kombinationsversuche zeigten besonders im Bereich der höheren Konzentrationen der unterschiedlichen Therapeutika zum Teil eine starke Wachstumshemmung der Zellen, die vereinzelt sogar unter 5 % lag. Als Folge dieser Beobachtung wurde der gleiche Ansatz nochmals durchgeführt, aber mit der niedrigeren Konzentration 0,25 µM für Cisplatin und 5-FU und mit einer zusätzlichen Strahlendosis von 10 Gy. Die Überlegung die Inhibitoren entsprechend anzupassen begründete sich darin, die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen zu verifizieren, besser beurteilbare Überlebensraten im 50 % Bereich zu halten um so mögliche Summationseffekte deutlicher darstellen zu können und besonders im Hinblick auf die HPV-positive Zelllinie den Effekt der Bestrahlung beobachten und analysieren zu können.



Abbildung 10: Schematische Darstellung der Kombinationsansätze der Crystal-Violett ELISA Assays für unterschiedliche Strahlendosen.

3.3.1. Ergebnisse Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Strahlendosen

Auch in dieser Versuchsreihe wurden vor allem die Unterschiede zwischen HPV Negativität und HPV-Positivität eruiert.

Die Kontrolluntersuchungen zeigten die schon zu erwartenden Ergebnisse. Für UD-SCC-5 zeigte sich in der Kontrolle ein besseres Ansprechen auf Bestrahlung im Vergleich zu Cal27. Während das Gesamtüberleben der Cal27 Zelllinie bei ungefähr der Hälfte lag, beobachtete man bei UDSCC-5 sogar einen Rückgang auf 32,40 %, also fast ein Drittel. UD-SCC-2 zeigte wie zu erwarten ein vergleichsweise gutes Ansprechen auf Bestrahlung. In der Kontrolle lag das Überleben der Zellen mit 2 Gy Behandlung bei 67,37 % und

mit 10 Gy Bestrahlung sogar bei 31,47 %, also eine Reduktion auf ungefähr ein Drittel des Ausgangswerts.

Tabelle 15: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: Kontrolle

Behandlung	HPV-negativ		HPV-positiv
	Cal27	UD-SCC-5	UD-SCC-2
Kontrolle	100	100	100
Kontrolle + 2 Gy	86,02	75,4	67,37
Kontrolle + 10 Gy	52,78	32,4	31,47

Bei Behandlung mit alleinigem 0,25 µM Cisplatin ließ sich für alle Zelllinien ein ähnliches Ergebnis erzielen. Bestrahlt man diesen Ansatz jedoch zeigte sich im Gegensatz zu den HPV-negativen Zelllinien ein starker Effekt von Bestrahlung und Inhibitor bei UD-SCC-2. Den größten Effekt zeigte dabei eine Bestrahlung mit geringer Intensität von 2 Gy, bei der das Gesamtüberleben um circa ein Viertel (52,65) vergleichsweise stark gesenkt wurde.

Tabelle 16: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 0,25 µM Cisplatin

Behandlung	HPV-negativ		HPV-positiv
	Cal27	UD-SCC-5	UD-SCC-2
Cisplatin	87,64	87,17	77,01
Cisplatin + 2 Gy	76,2	78,17	52,65
Cisplatin + 10 Gy	40,97	32,44	25,28

Einen ähnlichen Effekt zeigte die Behandlung mit 5-FU. Die unbestrahlten Ansätze der HPV-negativen Zelllinien erbrachten ähnliche Ergebnisse wie bei UD-SCC-2. Bestrahlt man diesen Ansatz wiederum mit 2 Gy änderte sich auch dies zu Gunsten des Ansprechens HPV-positiver Zellen. Mit einem Überleben von 53,88 % der Zellen war diese Kombination ähnlich wirksam wie Cisplatin + Bestrahlung.

Tabelle 17: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 0,25 µM 5-FU

Behandlung	HPV-negativ		HPV-positiv
	Cal27	UD-SCC-5	UD-SCC-2
5-FU	61,72	63,90	60,36
5-FU + 2 Gy	63,99	68,66	53,88
5-FU + 10 Gy	36,81	29,66	27,50

Bereits in diesem Stadium der Versuche ließ sich für HPV-positive Zellen eine Art Sensibilisierungsreaktion der Inhibitoren feststellen. Ionisierende Strahlung hatte einen positiven Effekt in Kombination mit Inhibitoren.

Die Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers Cetuximab fiel für UD-SCC-2 im Vergleich zu Cal27 und UDSCC-5 zwar zum Teil besser aus, addierende oder sich ergänzende Effekte der beiden Behandlungsmodalitäten blieben jedoch aus. Mit Bestrahlung war der Effekt zwar signifikant proliferationshemmend (für 2 Gy $p = 0,0011$, 50,60 % Gesamtüberleben, für 10 Gy $p = 0,0017$, 31,50 % Gesamtüberleben), aber im Vergleich nicht so bedeutsam wie bei der Kombination mit Cisplatin, 5-FU oder deren Kombination.

Angesprochen werden sollte das vergleichsweise gute Ansprechen von Cal27 auf den monoklonalen Antikörper + Bestrahlung mit einer Proliferations-einschränkung von beinahe 50 %.

Tabelle 18: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 100 µM Cetuximab

Behandlung	HPV negativ		HPV-positiv
	Cal27	UD-SCC-5	UD-SCC-2
Cetuximab	83,95	67,20	75,48
Cetuximab + 2 Gy	55,47	70,80	59,49
Cetuximab + 10 Gy	36,56	38,68	31,50

Eindrücklich ist das unterschiedliche Ansprechen der HPV-negativen und -positiven Zellen bei der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und 5-FU. Nach den Beobachtungen das 5-FU und Cisplatin ohne weiteres Adjuvanz und mit Bestrahlung sehr wirksam waren, war die Vermutung naheliegend, dass die Kombination der beiden mit Bestrahlung besonders wirksam sein könnte. Während die alleinige Behandlung der einzelnen Inhibitoren wie bereits beschrieben ein differierendes Ansprechen von UD-SCC-2 zu den beiden HPV-

negativen Zelllinien zeigte, ist die Kombination beider sowohl unbestrahlt als auch bestrahlt überlegen.

So stellte sich heraus, dass Cisplatin+ 5-FU in jedweder Kombination bei HPV-positiven Zellen besser anspricht als bei beiden HPV-negativen Zelllinien. Für UD-SCC-2 betrug das Überleben unbestrahlt 59,84 %, bestrahlt mit 2 Gy 43,90 % und für die Bestrahlung mit 10 Gy 24,47 %. Zuletzt genannte Kombination war somit auch gleichzeitig die wirkungsvollste Therapie der gesamten Arbeit.

Tabelle 19: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 0,25 µM Cisplatin + 0,25 µM 5-FU

Behandlung	HPV-negativ		HPV-positiv
	Cal27	UD-SCC-5	UD-SCC-2
Cis/ 5-FU	84,92	70,75	59,84
Cis/ 5-FU + 2 Gy	62,65	74,68	43,90
Cis/ 5-FU + 10 Gy	32,68	29,30	24,47

Die Kombination von 5-FU und Cetuximab war bei allen Zelllinien insgesamt weniger wirksam. Sowohl ohne, als auch mit Bestrahlung von jeweils 2 Gy beziehungsweise 10 Gy wurde zwar eine signifikante, aber weniger effektive Wachstumshemmung erzielt.

Trotzdem zeigte sich wiederum ein insgesamt gesehen besseres Ansprechen der HPV-positiven Zelllinie.

Tabelle 20: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 100 µM Cetuximab + 0,25 µM 5-FU

Behandlung	HPV-negativ		HPV-positiv
	Cal27	UD-SCC-5	UD-SCC-2
Cetuximab/ 5-FU	73,15	69,05	71,16
Cetuximab/ 5-FU + 2 Gy	71,96	61,76	53,44
Cetuximab/ 5-FU + 10 Gy	35,91	37,11	25,63

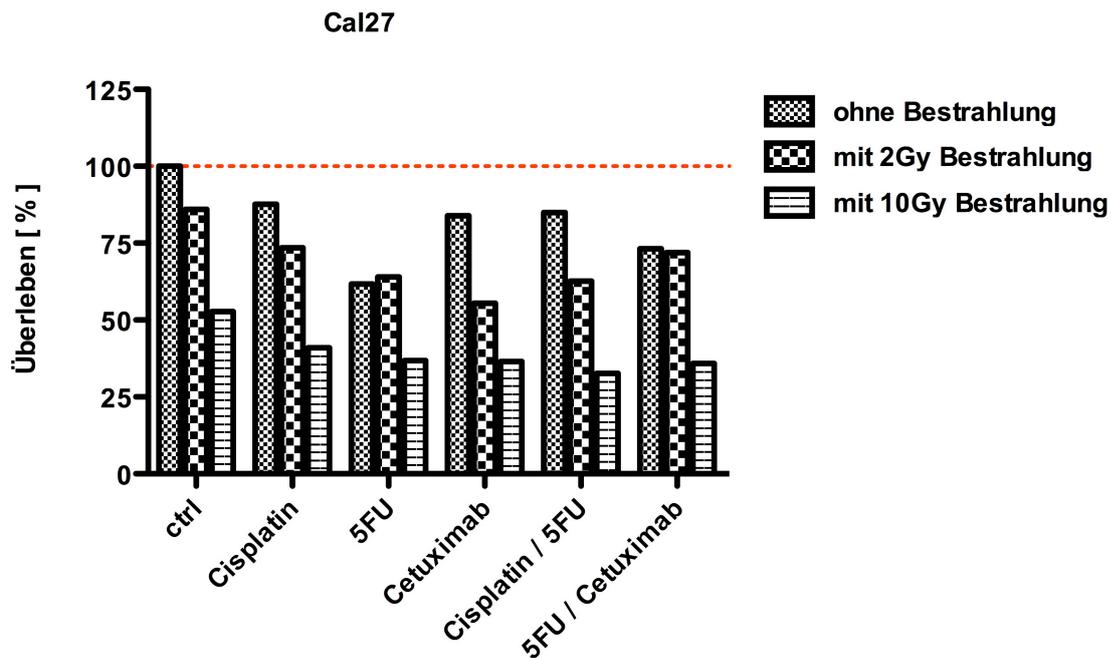


Abbildung 11: Kombinationsversuche mit 0,25 µM und 2 Gy/ 10 Gy Bestrahlung bei Cal27

Tabelle 21: Gesamtüberleben (in %) der Zelllinie Cal27

	Kontrolle	Cisplatin	5-FU	Cetuximab	Cis/ 5-FU	Cetux/ 5-FU
unbestrahlt	100	87,64	61,72	83,95	84,92	73,15
2 Gy	86,02	76,2	63,99	55,47	62,65	71,96
10 Gy	52,78	40,97	36,81	36,56	32,68	35,91

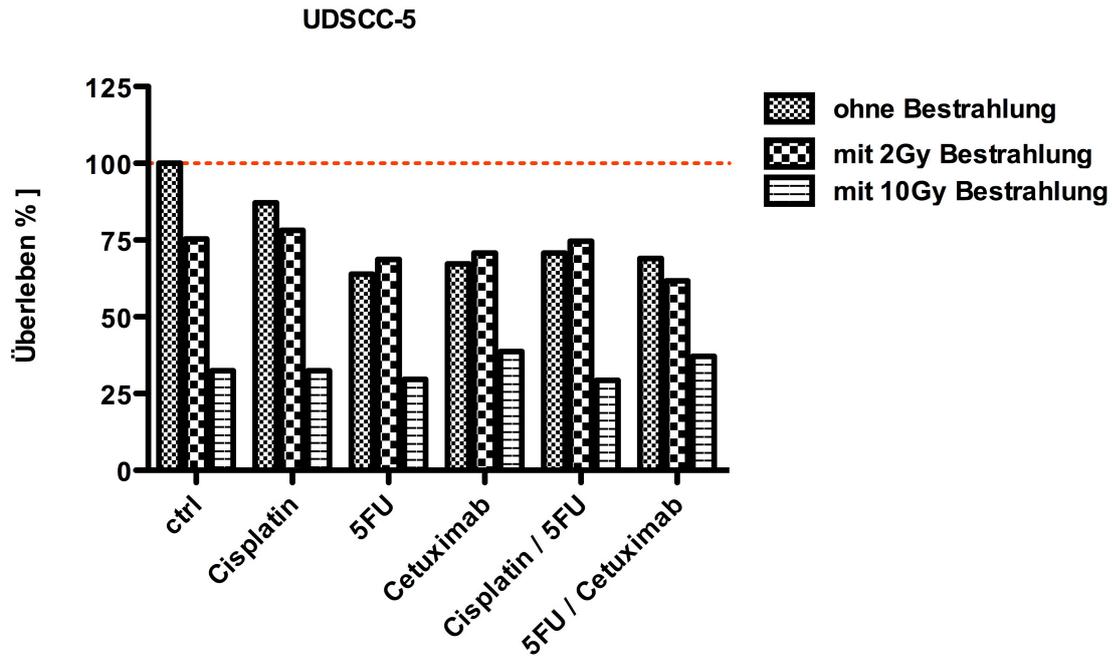


Abbildung 12: Kombinationsversuche mit 0,25 µM und 2 Gy/ 10 Gy Bestrahlung bei UD-SCC-5

Tabelle 22: Gesamtüberleben (in %) der Zelllinie UD-SCC5.

	Kontrolle	Cisplatin	5-FU	Cetuximab	Cis/ 5-FU	Cetux/ 5-FU
unbestrahlt	100	87,17	63,90	67,20	70,75	69,05
2 Gy	75,40	78,17	68,66	70,80	74,68	61,76
10 Gy	32,40	32,44	29,66	38,68	29,30	37,11

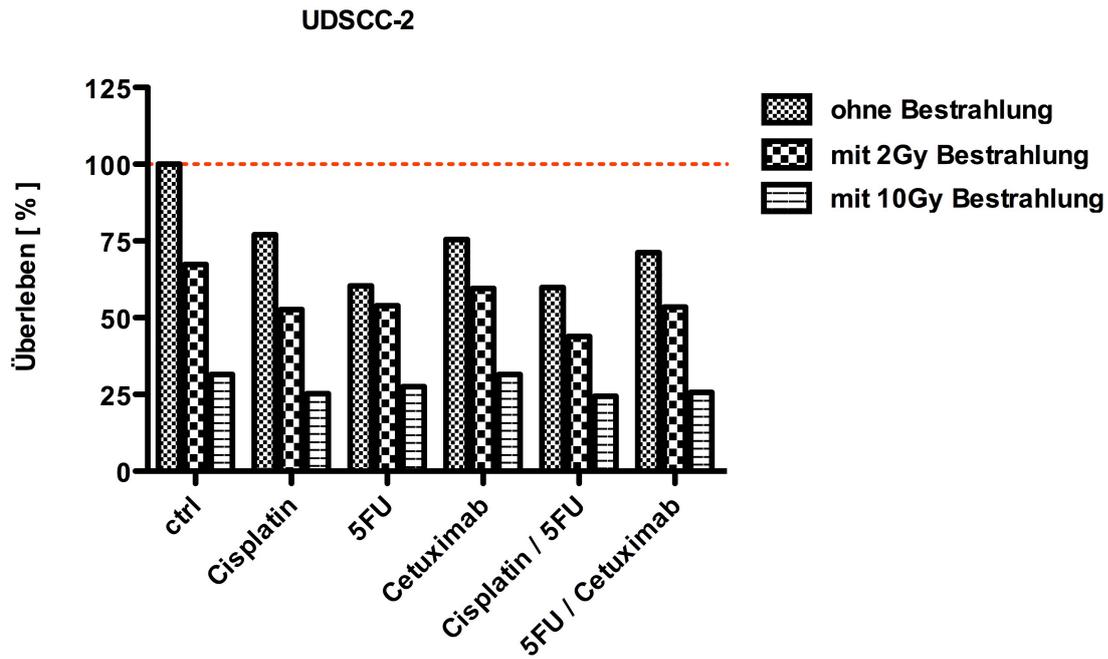


Abbildung 13: Kombinationsversuche mit 0,25 μ M und 2 Gy/ 10 Gy Bestrahlung bei UD-SCC-2

Tabelle 23: Gesamtüberleben (in %) der Zelllinie UD-SCC2

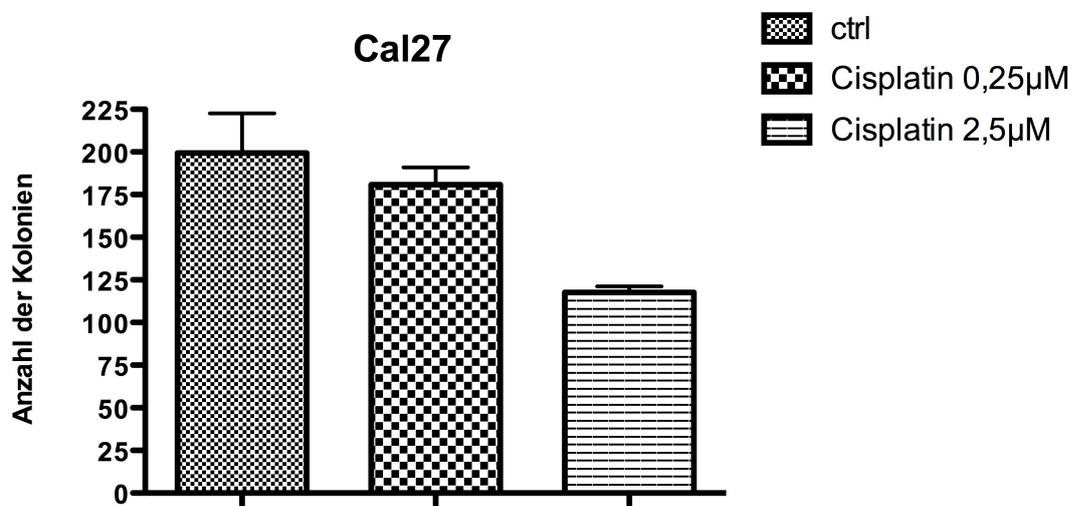
	Kontrolle	Cisplatin	5-FU	Cetuximab	Cis/ 5-FU	Cetux/ 5-FU
unbestrahlt	100	77,01	60,36	75,48	59,84	71,16
2 Gy	67,37	52,65	53,88	59,49	43,90	53,44
10 Gy	31,47	25,28	27,50	31,50	24,47	25,63

3.4. Colony-Formation-Assays

Mit Hilfe eines Colony-Formation-Assays lassen sich Rückschlüsse auf das klonogene Überleben ziehen und so die Effizienz verschiedener Therapiemodalitäten bestimmen.

3.4.1. Einfluss von Cisplatin auf das klonogene Überleben der Zelllinien

Cisplatin führte bei allen Zelllinien zu einem Rückgang des klonogenen Überlebens. Die hohe Dosierung zeigte einen entsprechend signifikanten Wachstumsstopp.



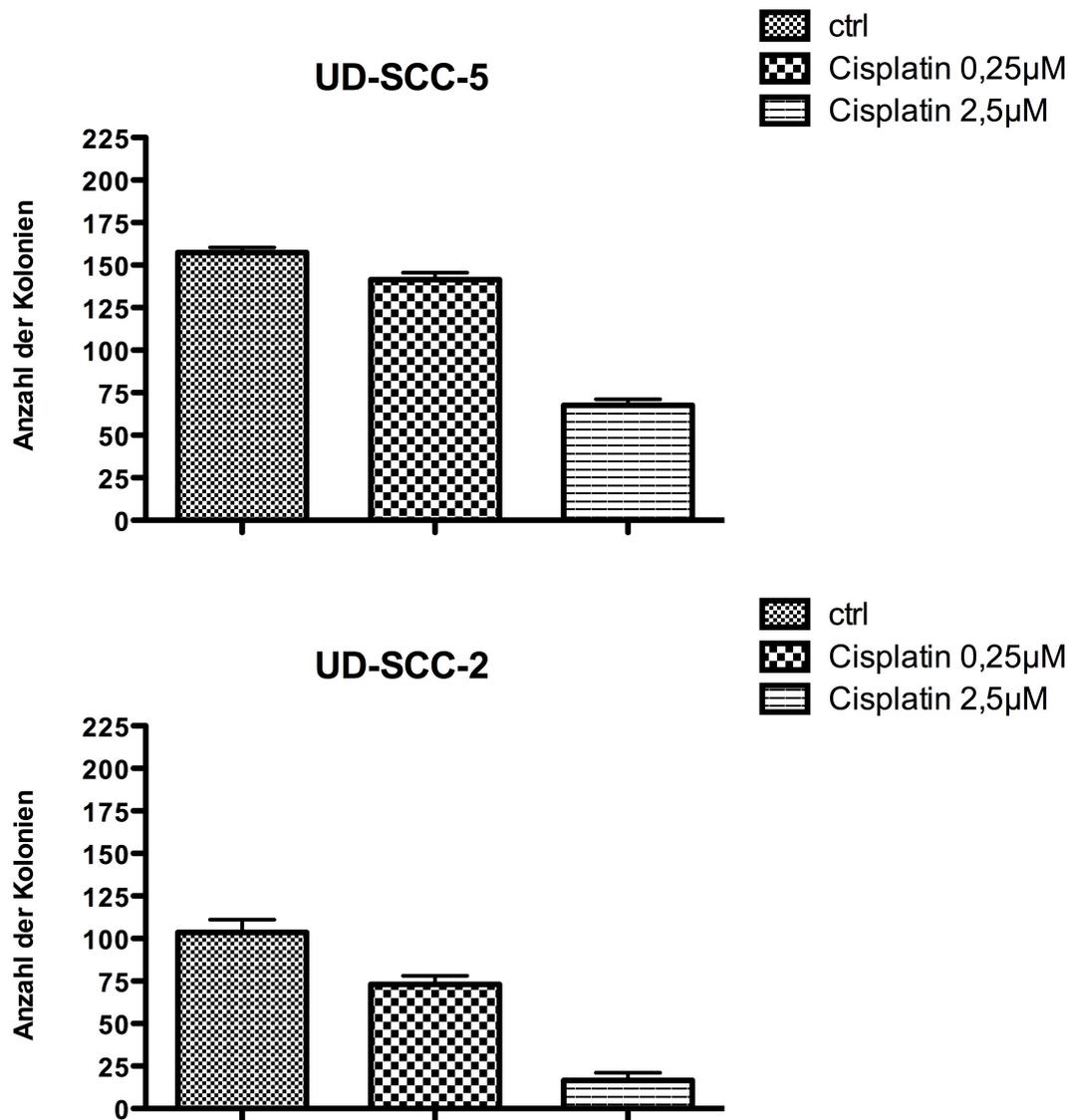


Abbildung 14: Einfluss von Cisplatin auf das klonogene Überleben

3.4.2. Einfluss von 5-FU auf das klonogene Überleben der Zelllinien

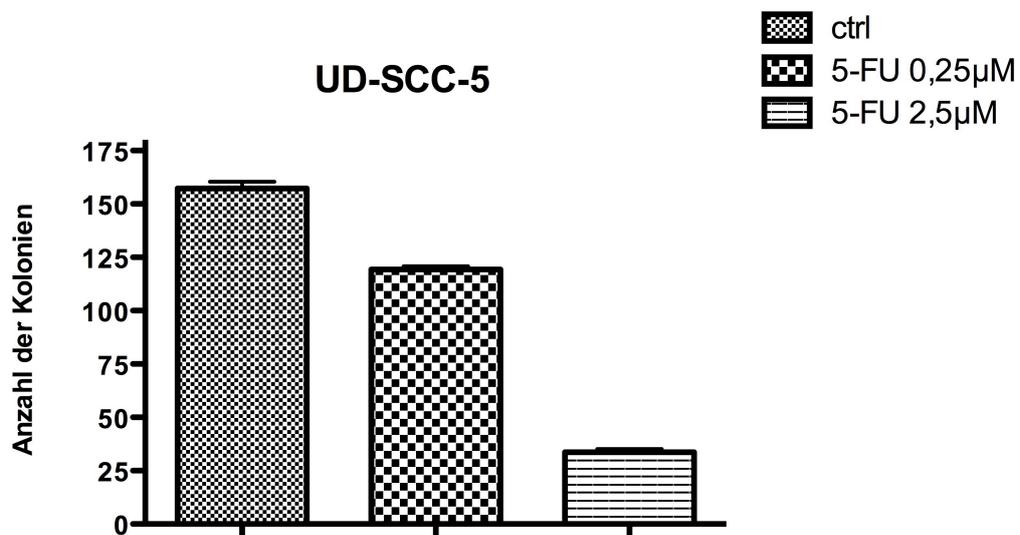
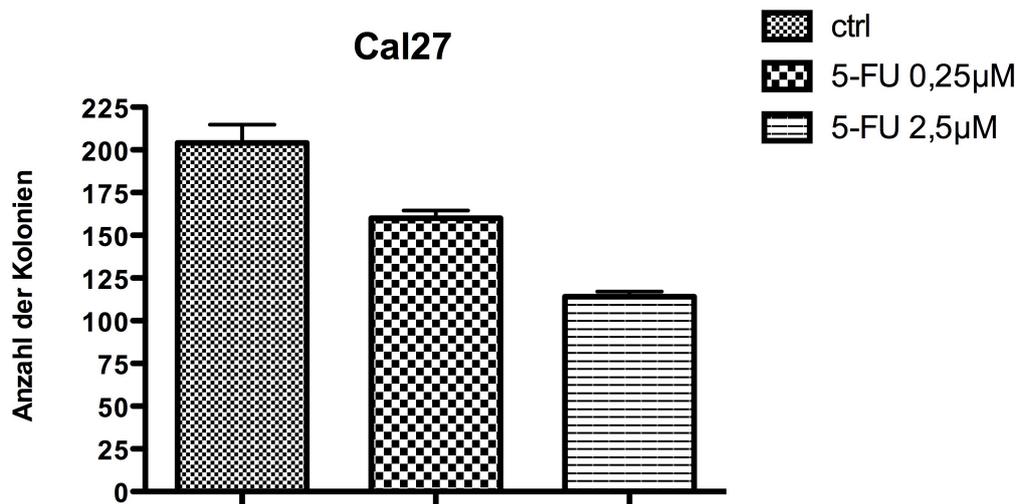
Der Inhibitor 5-FU zeigt auch im Zusammenhang des klonogenen Überlebens der Zelllinien entsprechende Proliferations- und Wachstumshemmung der einzelnen Zelllinien.

Das klonogene Überleben von Cal27 halbierte sich für die Konzentration 2,5 µM nahezu. Auch die geringere Konzentration zeigte eine Reduzierung der Zellkolonien.

UD-SCC-5 sprach gut auf 2,5 µM 5-FU an. Die Reduzierung des klonogenen Überlebens bezogen auf die Kontrolle entsprach für die hohe Konzentration 5-

FU nahezu 79 %, wobei die geringere Konzentration Einbußen des Überlebens der Kolonien von ca. 23 % bewirkte.

Wie bereits bei den Proliferationsanalysen zeigte UD-SCC-2 auch eine signifikante Hemmung des klonogenen Überlebens sowohl für die geringe Konzentration 5-FU ($p = 0,0003$), als auch für $2,5 \mu\text{M}$ ($p = 0,0001$). Prozentual verringerte es sich um 33 % für $0,25 \mu\text{M}$ und 84 % für $2,5 \mu\text{M}$.



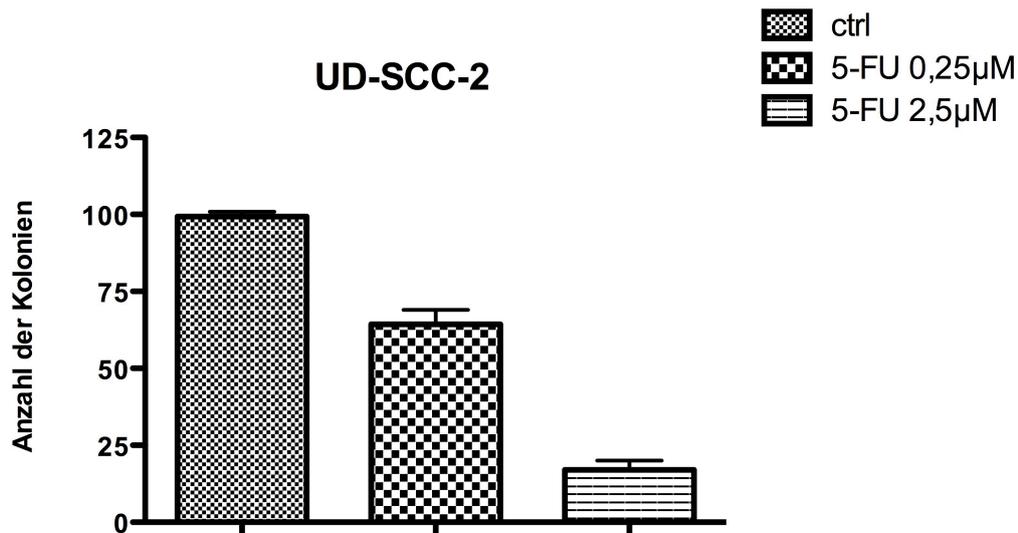
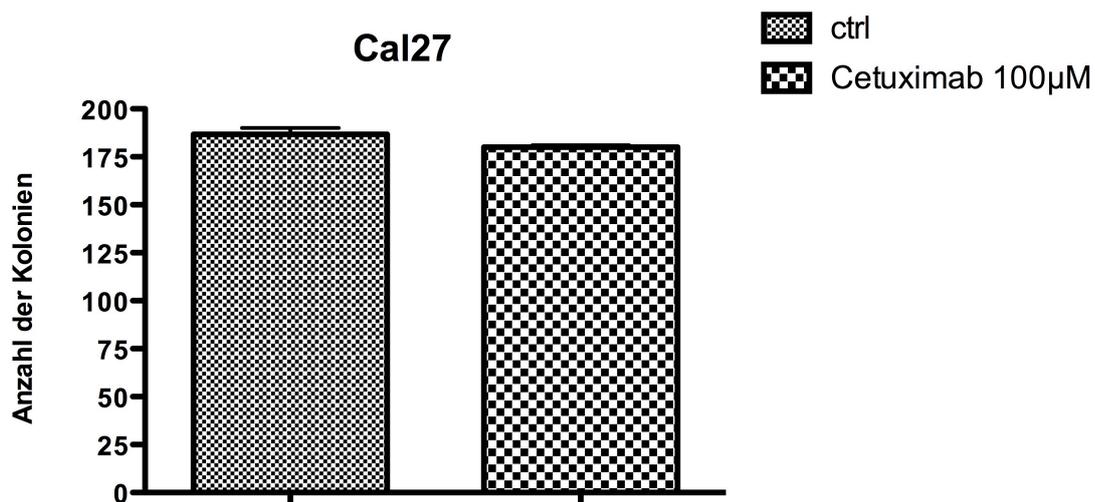


Abbildung 15: Einfluss von 5-FU auf das klonogene Überleben

3.4.3. Einfluss von Cetuximab auf das klonogene Überleben der Zelllinien

Unter dem Einfluss des Antikörpers Cetuximab und somit der Blockierung des EGFR Signalwegs zeigten sich für die jeweiligen Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse. Während Cal27 kaum auf den Inhibitor ansprach und fast kein Rückgang der Kolonien zu beobachten war, sprach UD-SCC-5 mit über 50 % Einbuße an Kolonien recht gut an. Auch bei den Zellen der Linie UD-SCC-2 stellte sich ein inhibierender Effekt, wenn auch geringer als bei UD-SCC-5, ein.



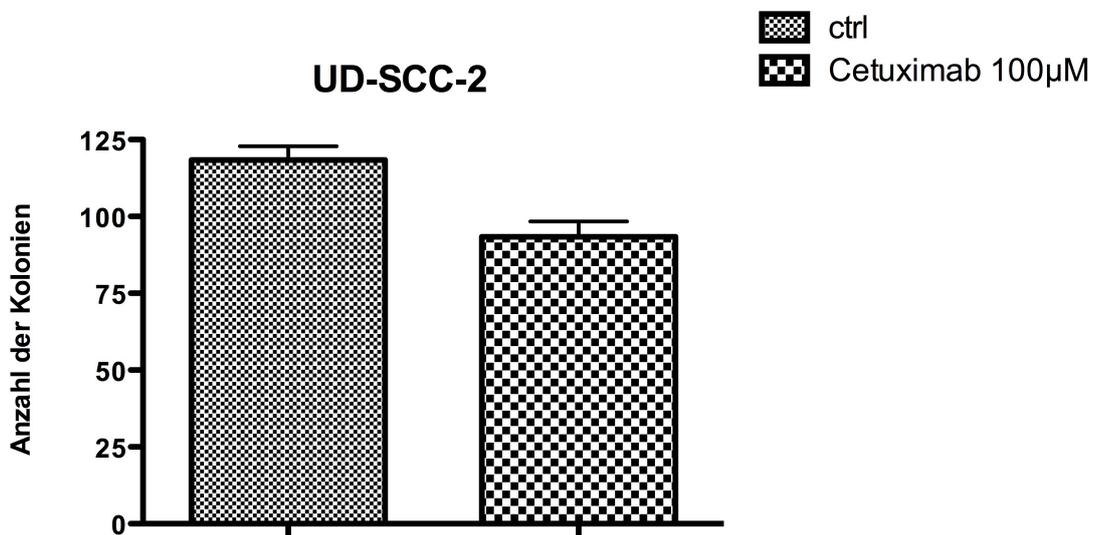
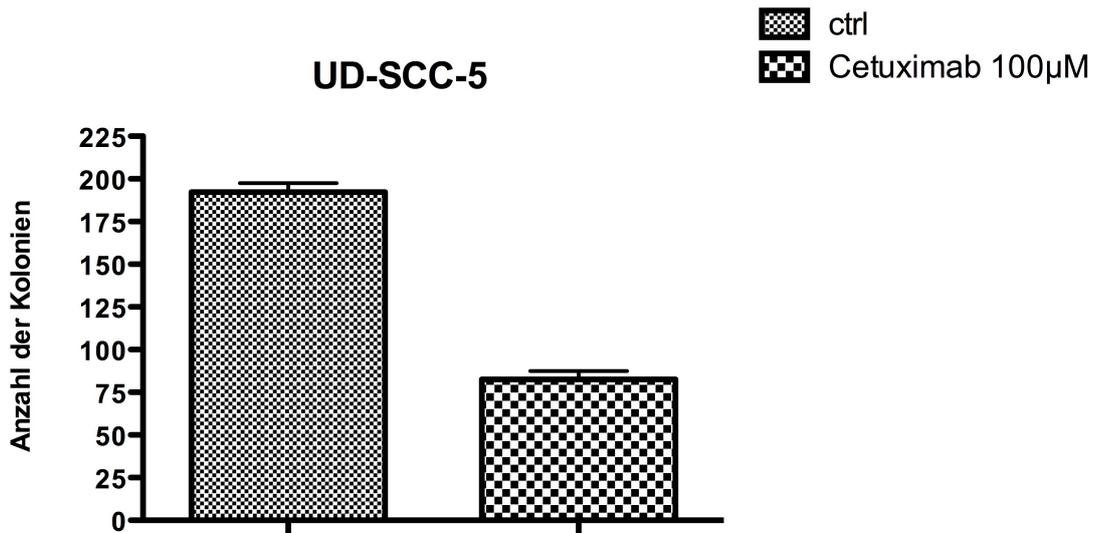


Abbildung 16: Einfluss von Cetuximab auf das klonogene Überleben

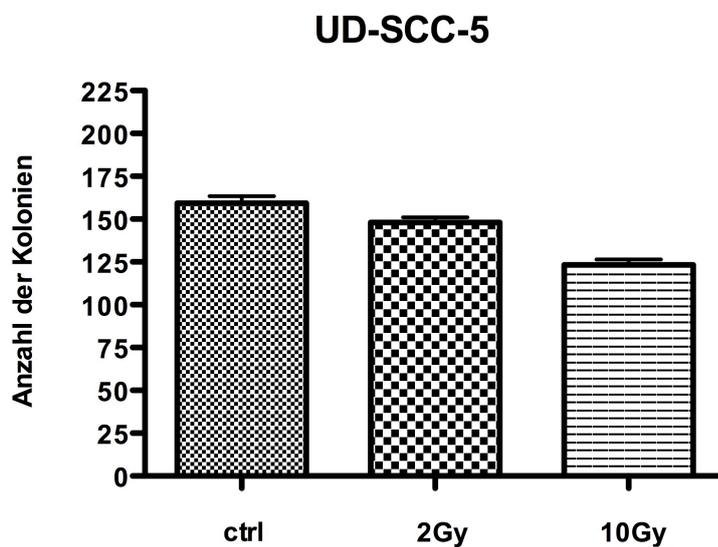
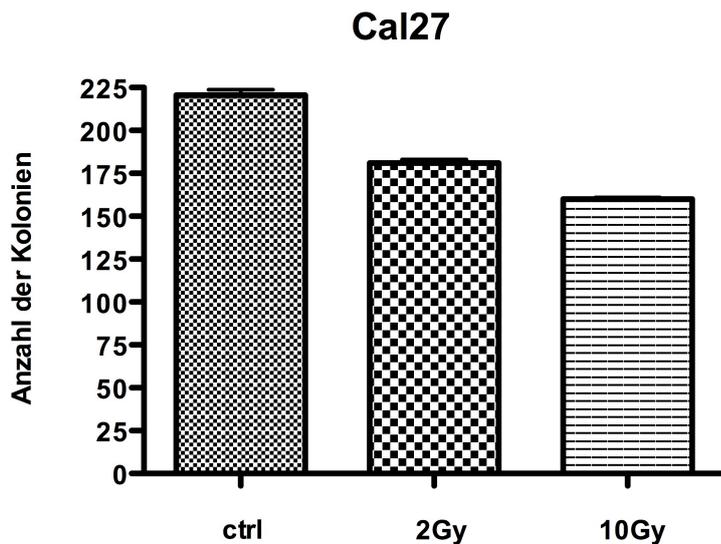
3.4.4. Einfluss von ionisierender Strahlung auf das klonogene Überleben der Zelllinien

Der Einfluss ionisierender Bestrahlung von 2 Gy und 10 Gy auf das klonogene Überleben der jeweiligen Zelllinien zeigte unter Berücksichtigung einer unbestrahlten Kontrolle folgende Ergebnisse:

Cal27 stellte sich bereits bei einer Bestrahlung von 2 Gy strahlensensibel dar. Die Koloniezahlen zeigten einen Rückgang um 36,5 % ($p = 0,0049$) und bei 10 Gy sogar eine Wachstumshemmung von 56,3 % ($p = 0,0004$).

Im Gegensatz dazu war UDSCC-5 nahezu strahlenresistent bei 2 Gy Bestrahlung ($p = 0,1285$). Eine Strahlendosis von 10 Gy zeigte schließlich eine Minderung der Koloniezahlen um 36,6 % ($p = 0,0014$).

Für die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 zeigte sich eine starke Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung in den Colony-Formation-Assays. Während in der Kontrolle 107 Kolonien zu zählen waren, zeigte sich schon bei einer Bestrahlung von 2 Gy ein Abfall der Koloniezahl auf 65, was einer Einbuße von ca. 40 % entspricht ($p < 0,0001$). Bestrahlt man UDSCC-2 mit 10 Gy zeigt sich sogar eine Hemmung von über 80 % ($p = 0,0002$).



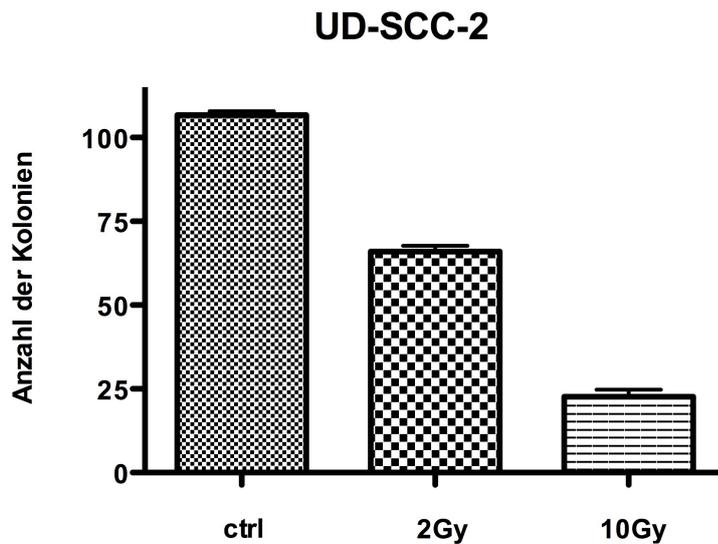


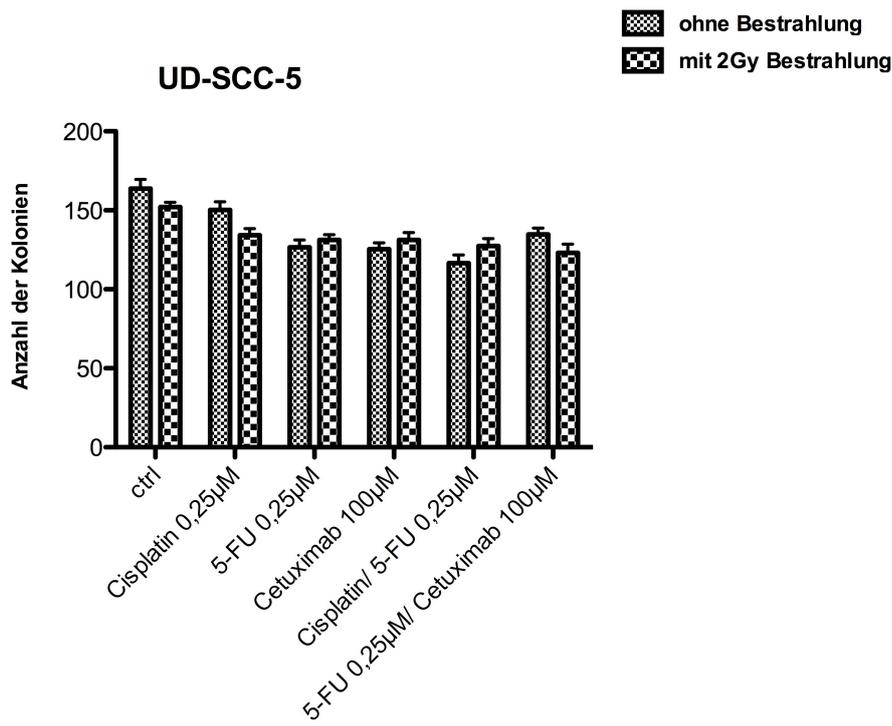
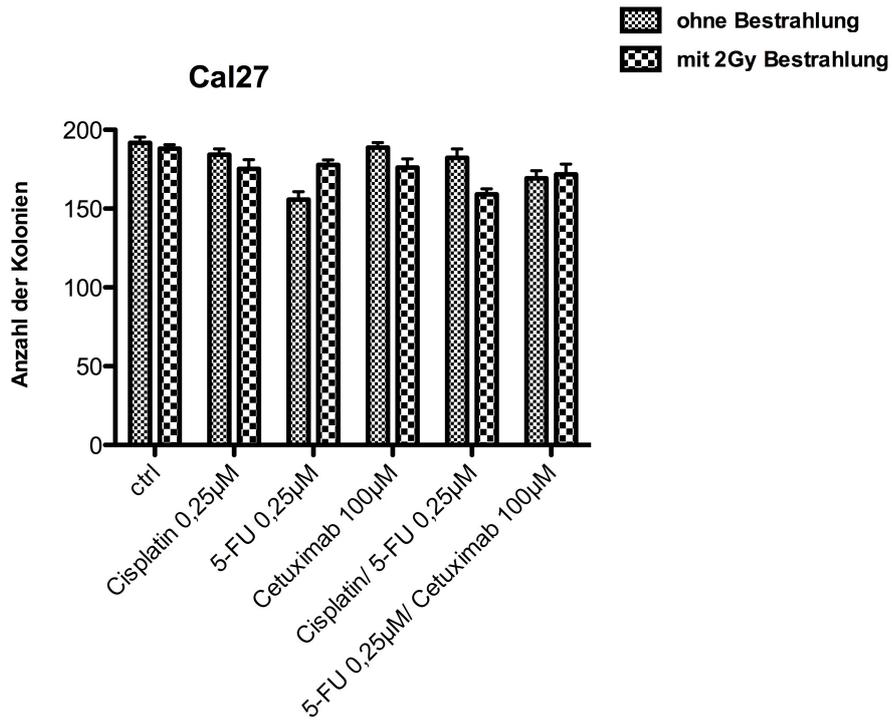
Abbildung 17: Einfluss ionisierender Strahlung auf das klonogene Überleben

3.4.5. Kombinationsversuche mit und ohne Strahlenbehandlung

Wie schon in den Vorversuchen zu beobachten war, reagierten die HPV-negativen Zelllinien Cal27 und UD-SCC-5 mäßig gut auf alleinige Bestrahlung. Sowohl die Monotherapie mit den jeweiligen Inhibitoren, als auch die Kombination mit einer Strahlenbehandlung zeigten zwar Einbußen in der Kolonienzahl, ein nennenswerter additiver Effekt blieb jedoch aus.

Die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 hingegen zeigte bis auf die Monotherapie mit Cetuximab sehr gute Effekte. Vor allem die bestrahlten Ansätze wiesen einen deutlichen Abfall des klonogenen Überlebens nach.

So reduzierte vor allem die bestrahlte Kombination mit 0,25 μ M Cisplatin das klonogene Überleben um circa 50 % gegenüber alleiniger Bestrahlung, so dass im Vergleich zur Kontrolle lediglich noch 35 % der Kolonien zu finden waren.



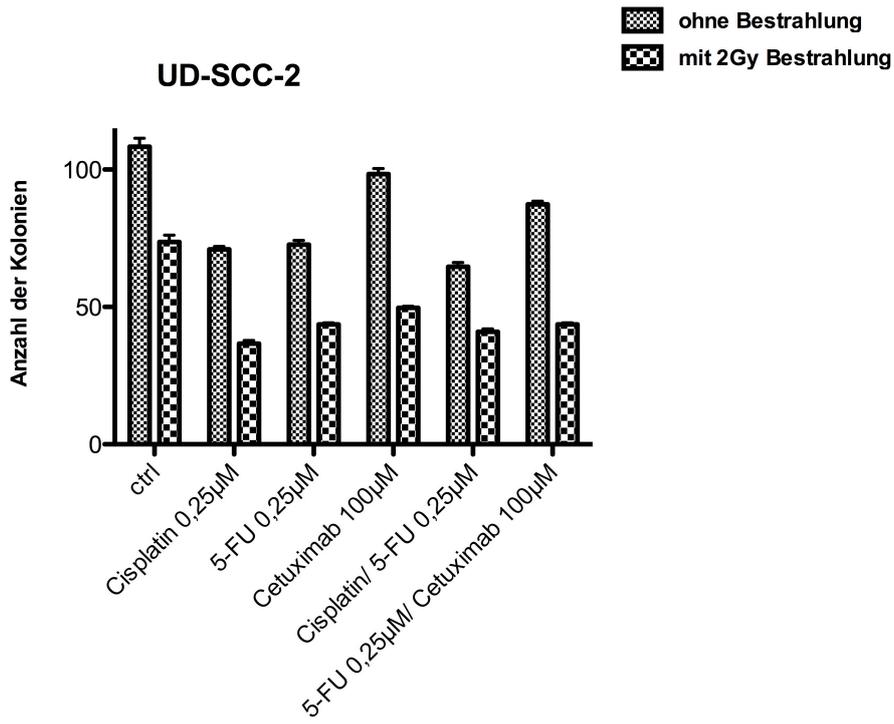


Abbildung 18: Einfluss kombinierter Inhibitoren auf das klonogene Überleben

4. Diskussion

Kopf-Halstumore sind die vierthäufigste Tumorentität in Deutschland (Guntinas-Lichius et al., 2010). Aufgrund ihrer Lokalisation ist eine Resektion häufig nur eingeschränkt möglich, auch mit einer adjuvanten Radio(chemo)therapie bleiben nur 47 % der Patienten langfristig tumorfrei (Guntinas-Lichius et al., 2010).

Trotz des Fortschritts und der Weiterentwicklung neuer Therapieoptionen und Behandlungsmöglichkeiten haben sich die Überlebensraten bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich in den letzten 30 Jahren nicht signifikant verbessert. Eine relativ neu erforschte Tumorentität, das HPV induzierte Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereichs scheint aber das Potenzial zu besitzen, diese Statistik zu Gunsten der Patienten ändern zu können.

Die letzten Jahrzehnte klinischer Beobachtung und Forschung haben gezeigt, dass aufgrund des klinischen Ansprechens HPV-positiver Tumoren diese eventuell als eine eigene Tumorentität angesehen werden könnten.

Die Besonderheit der viral induzierten Tumore ist, dass HPV aber auch p16-positive Tumorpatienten zum einen im Schnitt zehn Jahre jünger sind und zum anderen die üblichen Noxen wie Alkohol und Nikotin fehlen. So steht bis heute zur Diskussion ob das jüngere Alter der Patienten oder aber ein besseres Therapieansprechen HPV-positiver Tumoren Einfluss auf die bessere Prognose und ein besseres medianes Gesamtüberleben im Gegensatz zu HPV-negativen Tumoren hat (Fakhry et al., 2008).

Die Inzidenz von HPV 16 wird in der Literatur mit 38,2 % angegeben. HPV-16-Positivität ist zudem signifikant häufiger mit einer Ko-Infektion anderer HPV-Subtypen assoziiert ($p = 0,001$). Es zeigt sich eine signifikante Koinzidenz zwischen HPV 35 und HPV 59. Alkohol- und Tabakkonsum sind signifikant geringer ausgeprägt bei HPV-16-positiven Tumoren ($p < 0,001$), und das Tumorstadium ist signifikant fortgeschrittener ($p = 0,041$). HPV-Positivität geht in dieser Studie außerdem mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben sowie einem verbesserten krankheitsfreien Überleben einher ($p = 0,001$ vs. $p = 0,002$) (Timothy, Collen et al., 2001).

Die beiden zuvor genannten Aspekte, bessere Prognose und besseres klinisches Ansprechen, machen den HPV induzierten Tumor im Kopf-Halsbereich zum Gegenstand des klinischen Interesses, gegenwärtiger Forschung und dieser Arbeit.

Bislang gibt es keine zufriedenstellenden Erklärungsmodelle warum HPV-positive Tumoren besser auf die Therapiemodalitäten Chemo-, Immun- oder Strahlentherapie ansprechen. So werden bis dato viral induzierte Tumore äquivalent zu den noxeninduzierten Tumoren des Kopf-Hals Bereichs behandelt.

Bisher ist noch ungeklärt, ob HPV-positive Tumore sensibler auf Therapien mit Fluorpyrimiden wie 5-FU, platinhaltigen Zytostatika wie Cisplatin oder dem monoklonalen Antikörper Cetuximab reagieren, oder ob die Kombination mit einer Strahlentherapie dies bewirkt. Ziel dieser Arbeit war es das Ansprechen auf die genannten Therapien bei HPV-negativen und positiven Zelllinien näher zu untersuchen.

Der vorliegenden Arbeit lagen die drei Zelllinien Cal27, UD-SCC-5 und UD-SCC-2 zu Grunde, die hinsichtlich ihres Verhaltens auf unterschiedliche Chemo- und Immuntherapeutika untersucht wurden. Die drei Zelllinien wurden dabei äquivalent behandelt um einen größtmöglichen Vergleich zu erlangen. Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Verhalten der HPV-positiven Zelllinie UD-SCC-2, die den Fokus des Interesses darstellte.

Da die Charakteristika und das Verhalten auf Chemotherapie bei den Zelllinien Cal27 und UDSCC-5 weitestgehend bekannt sind, war der Vergleich zur HPV-positiven Zelllinie interessant. Das humane Papillomavirus baut seinen viralen DNA Strang in die Wirts-DNA ein. Die anschließende Expression der viralen Proteine E6 und E7 führen zur Inaktivierung der zellulären Tumorsuppressorproteine p53 und Rb, wodurch eine zunehmende chromosomale Instabilität entsteht und schließlich der Weg zur Transformation ungehemmt proliferierender Zellklone geebnet wird.

Ob und inwiefern dieser Prozess durch die bei der Chemotherapie von Kopf-Halstumoren gängigen Inhibitoren Cisplatin, 5-FU, Cetuximab und ionisierender Strahlung in und ohne Kombination unterbunden oder gestört wurde, wird im Folgenden diskutiert.

4.1. Methodendiskussion

Um eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllinien untereinander zu erlangen wurden in Vorversuchen Konzentrationskinetiken zur IC_{50} -Bestimmung erstellt. Wie schon erwähnt handelt es sich hierbei um die mittlere inhibitorische Konzentration des jeweiligen Inhibitors. Die Konzentrationskinetik ist ein gutes Maß um einen ersten Hinweis auf spezielle Charakteristika der einzelnen Zelllinien und deren Ansprechraten auf unterschiedliche Inhibitoren zu erlangen.

Anhand von Crystal-Violett-ELISA-Assays lassen sich Aussagen über die Wachstumsgeschwindigkeit maligner Zellen treffen. Es werden wie bereits beschrieben alle vitalen Zellen angefärbt, lysiert und anschließend die optische Dichte der entstandenen Lösung ermittelt. Im Gegensatz dazu werden bei üblichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assays (MTT-Assays) Rückschlüsse auf das Überleben vitaler Zellen geschlossen, indem die katalytische Aktivität der Zellen gemessen wird. Da diese katalytische Aktivität Schwankungen unterzogen sein kann, stellt der Crystal-Violett-ELISA-Assays sich in dieser Hinsicht als vorteilhaft dar.

Die Colony-Formation-Assays geben Auskunft über das klonogene Überleben der Zellen. Demnach ist mittels dieser Methode ersichtlich, wie effizient sich die zytotoxische Wirkung des Inhibitors auswirkt. Der Colony-Formation-Assay ist

schließlich eine geeignete und unkomplizierte Methode um Aussagen über die Effizienz und das klonogene Überleben von Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen zu treffen.

4.2. HPV-positive Zellen sind strahlensensibler

Die alleinige Bestrahlung führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einem Rückgang der Proliferation. Dies ist begründet in der Tatsache, dass es durch ionisierende Strahlung zu Einzelstrangbrüchen und Micronuclei-Formationen kommt. Der nachfolgende Zellzyklusarrest und die daraus resultierende Hemmung der mitotischen Aktivität führen somit zu einem Rückgang der Proliferation (Okada, Kashino, Nishiura, Tano, & Watanabe, 2012).

Am wenigsten sensibel auf ionisierende Strahlung war die Zelllinie UD-SCC-5. Gründe für unterschiedliches Ansprechen auf Bestrahlung *in vivo* kann z. B. Hypoxie (Harrison & Blackwell, 2004) sein aber auch EGFR- (Hatanpaa, Burma, Zhao, & Habib, 2010) und SphK1-Überexpression (Shida, Takabe, Kapitonov, Milstien, & Spiegel, 2008) werden in diesem Zusammenhang diskutiert.

Vergleichbar mit den Daten aus dem Proliferationstest war UD-SCC-5 auch im Colony-Formation-Assay resistenter gegenüber ionisierender Strahlung als die anderen Zelllinien.

UD-SCC-2 reagierte wie bereits oben dargestellt am Besten auf die Bestrahlung. Dies konnte auch in der Literatur bereits bestätigt werden (Ziemann et al., 2015).

Als Gründe für eine Resistenzentwicklung gegenüber der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlung werden mehrere Thesen diskutiert. Hier muss bei Kopf-Halstumoren sicherlich als erstes der EGFR genannt werden. In Diskussion steht hierbei, ob eine Strahlen- und Cetuximabinduzierte Translokation des EGFR in den Nucleus zu einer Resistenzentwicklung beitragen kann (Dittmann, Mayer, & Rodemann, 2010; Hatanpaa et al., 2010), denn dass diese Translokation des EGFR bei Kopf-Halstumoren mit einem schlechten klinischen Outcome korreliert, konnte bereits nachgewiesen werden (Psyrrri et al., 2005).

Autophagie wird als weiterer Grund für Resistenzen gegenüber ionisierender Strahlung diskutiert. Chaachouay konnte zum Beispiel an Mammakarzinomzelllinien zeigen, dass bei strahlenresistenten Zelllinien unter ionisierender Strahlung Autophagie induziert wird und dass dieser Effekt bei strahlensensiblen Zelllinien ausbleibt (Chaachouay et al., 2011).

Inwiefern die HPV induzierten onkogenen Proteine E6 und E7 Einfluss auf solche Prozesse nehmen, bleibt weiter ein zu untersuchender Aspekt (Pedroza-Torres et al., 2014).

4.3. HPV-positive Zellen zeigen ein gutes Ansprechen auf Chemo- und Immuntherapeutika

4.3.1. Ansprechen auf Cisplatin

Cisplatin gehört heutzutage zu den gängigen Chemotherapeutika. Es führt sowohl zu Intra- als auch zu Interstrang-Quervernetzungen der DNA, wodurch es zum Arrest des Zellzyklus kommt. Durch seine Wirkweise nimmt es demnach nicht nur auf schnell proliferierende, sondern auch auf gesunde Zellen Einfluss.

In dieser Arbeit fand sich ein Ansprechen aller Zelllinien auf Cisplatin, wobei zu sagen bleibt, dass auch hier Unterschiede im Ansprechen zu beobachten waren. Cal27 und UD-SCC-5 sprachen sowohl in den Proliferationsanalysen als auch im klonogenen Überleben vergleichbar gut an. Sehr gute Ergebnisse erzielte Cisplatin jedoch bei UD-SCC-2, da es schon bei geringeren Konzentrationen gute Proliferationshemmung zeigte, was vor allem bei diesem nebenwirkungsreichen Chemotherapeutikum als äußerst vorteilhaft anzusehen ist. Auch das klonogene Überleben der Zellen zeigte bei bereits geringerer Konzentration stärkere Einbußen als bei den HPV-negativen Zelllinien. Diese Beobachtung lässt sich vergleichen mit den Ergebnissen aus der Literatur, wo eine Behandlung mit Cisplatin alleine und in Kombination mit Cetuximab, Docetaxel oder 5-FU ein überschaubares Nebenwirkungsprofil und guten Effekt auf die Proliferation der HNSCC Tumorzellen nachweisen konnte (Massarelli et al., 2015), (Hitt et al., 2014).

Auf welcher Grundlage dieses vergleichbar gute Ansprechen HPV-positiver Zellen basiert, bleibt bislang Spekulation. Wahrscheinlich lassen sich diese Unterschiede durch metabolische Prozesse erklären. Zum einen spielt die intrazelluläre Konzentrationen an Glutathion und zahlreiche SH-Gruppen tragende Metalloproteine eine Rolle, welche platinhaltige Verbindungen binden und inaktivieren können (T. Morris, 2014), (Banci et al., 2012). Zum anderen kommt speziellen Transportproteinen, wie z. B. CTR1 (copper transport protein) eine wichtige Rolle zuteil (Kuo, Gybina, Pyatskowitz, Gitschier, & Prohaska, 2006). Auch eine vermehrte DNA-Reparatur kann zu niedrigen Ansprechraten führen (Basu, Krishnamurthy, Basu, & Krishnamurthy, 2010).

Ob das gute Ansprechen HPV-positiver Zellen mit diesen Erklärungsmodelle einhergeht bleibt abzuwarten.

4.3.2. Ansprechen auf 5-FU

5-Fluoruracil ist aufgrund seiner Wirkungsweise als Antimetabolit bei der Zellteilung und seiner Strukturähnlichkeit zu den DNA Nukleotiden Cytosin und Thymin, oder den RNA Nukleotid Uracil besonders bei dem doppelsträngigem DNA Virus HPV interessant.

Es greift als Antimetabolit während der Proteinbiosynthese von den durch HPV induzierten Onkogenen E6 und E7 ein. Das Enzym UMP-Pyrophosphorylase

wandelt 5-Fluoruracil in 5-Fluor-UMP um, welches anschließend zu 5-Fluor-UTP phosphoryliert und in RNA eingebaut wird. Dieser Mechanismus hat die Synthese fehlerhafter RNA zur Folge wodurch die Proteinbiosynthese – und somit die Produktion der Onkogene – gehemmt wird. Außerdem führt 5-Fluor-dUMP zur Inhibierung der DNA Synthese durch Hemmung der Thymidylat-Synthase (Nabeya et al., 2011). All diese Effekte machen 5-FU interessant für die Behandlung HPV-positiver Tumorzellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl im Proliferationsassay als auch im Colony-Formation-Assay in allen Zelllinien ein gutes Ansprechen zu verzeichnen war.

Große Unterschiede zwischen HPV-positiven und negativen Zellen konnten nicht gefunden werden. Es zeigt sich also, dass 5-FU als Monotherapie, welches aufgrund seiner Wirkungsweise Hoffnungen auf sehr gutes Ansprechen hegte, letztendlich enttäuschte. Zwar reagieren alle Zelllinien bei der Behandlung mit 5-FU mit einem Rückgang ihrer Proliferation (vor allem Cal27) und auch das klonogene Überleben zeigte Einbußen, jedoch blieb vor allem bei der HPV-positiven Zelllinien ein herausragendes Ansprechen aus.

Auch in der Literatur finden sich Daten, die einen gewünschten Effekt von 5-FU auf Proliferation und Überleben nachweisen können, wenngleich auch mit moderaten Remissionsraten von 15 % (Al-Sarraf, 1987). Außerdem ist unter dem klinischen Aspekt weiterhin zu erwähnen, dass das Nebenwirkungsprofil von 5-FU mit erheblichen unerwünschten Wirkungen wie Beschwerden des Magen-Darm-Trakts (Stomatitis, Ulzera, Diarrhö), Augengewebsschäden (Blepharitis, Konjunktivitis, Tränenkanal- Stenose) und Hautproblemen wie beispielsweise Dermatitis behaftet ist (Hoffmann, 2012).

4.3.3. Ansprechen auf Cetuximab

Ein großer Anteil solider Tumore exprimiert den Wachstumsfaktor EGFR (Epidermal Growth Factor Rezeptor). Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs findet sich sogar eine starke Überexpression von ca. 90 % (Kalyankrishna & Grandis, 2006).

Er ist ein 170kDa großes, der HER- (oder erb-B) Familie angehöriges Glykoprotein, welches eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, ein transmembranären lipophilen Abschnitt sowie eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase-Funktion besitzt. Kommt es zur Bindung eines passenden Liganden (z. B. EGF oder TGF- α (Transforming Growth Factor alpha)) und auch das von HPV induzierte E5/ E6, dimerisiert dieser und bringt somit eine Reaktionskaskade in Gang, welche zur Folge hat, dass bestimmte Proteine phosphoryliert und somit aktiviert werden, die dann als Signaltransduktoren wirken. Folglich werden Transkription und DNA-Replikation im Zellkern aktiviert, was zur Reifung und Proliferation, Angiogenese und Metastasierung führt (Herbst, 2004), (Reimers et al., 2007).

Vor allem das von dem humanen Papillomavirus gebildete Onkogen E5 aktiviert den EGF Rezeptor durch Bindung an seine 16kDa- Untereinheit der Protein ATPase und hemmt somit unter anderem die Expression des

Tumorsuppressorgens p21 und fördert gleichzeitig EGFR vermittelte mitogene Signale (Kim et al., 2006).

Cetuximab ist ein monoklonaler, chimärer Antikörper, der sich an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet und damit die Bindung des Epidermal Growth Faktor sowie die intrazelluläre Signalweiterleitung unterbindet. Es stellt somit einen effektiven Inhibitor für EGFR positive Tumorentitäten dar und ist seit dem Jahr 2006 in Kombination mit Bestrahlung für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen HNSCC registriert. 2008 wurde es auch in Kombination mit einer Chemotherapie als Erstlinientherapie bei Patienten mit rezidivierendem- oder metastasiertem HNSCC zugelassen. In der Literatur wird ebenfalls eine Cetuximab-Monotherapie als second oder third line Therapie bei Cisplatin-resistenten Patienten beschrieben (Vermorken, Trigo, et al., 2007).

Dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls verifiziert werden. Alle Zelllinien sprachen, wenn auch nur mäßig gut, auf eine Monotherapie mit Cetuximab an. Auch hier war der molekularbiologisch erhoffte Effekt bei HPV-positiven Zellen eher enttäuschend.

Die Wirksamkeit einer Cetuximab Therapie lässt sich mitunter am Nebenwirkungsprofil dieses Wirkstoffs abschätzen. Dermatologische Effloreszenzen wie akneiforme, pustulöse oder makulopapilläre hyperkeratotische Exantheme sprechen im Umkehrschluss für gute Wirksamkeit von Cetuximab (Bonner et al., 2006).

4.3.4. Ansprechen auf Kombinationsbehandlungen

Wie bereits erwähnt ist die Effektivität einer Behandlung maßgeblich an die Wirksamkeit und das Ansprechen der Tumorzellen auf entsprechende Therapie gebunden. Diese Arbeit zeigt deutlich, dass sowohl Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien, als auch Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsstrategien herrscht. Um mögliche additive, oder sich ergänzende Effekte darstellen zu können, wurde die Kombination der einzelnen Modalitäten bei jeder Zelllinie durchgeführt.

Die Kombination zytostatischer Wirkstoffe wird seit den 1990er Jahren erforscht und dokumentiert. Obwohl die Monotherapie in der Regel eine Ansprechraten von 10 – 30 % nachzuweisen hat, zeigt die Kombination der Wirkstoffe sowohl in dieser Arbeit, als auch in der Literatur bessere Ergebnisse (Hoffmann, 2012). Laccourreya et al. wies auf, dass bei Patienten mit nicht-metastasiertem Kehlkopfkrebs (T1-3(4)) eine kombinierte Chemotherapie mit einer 5-Jahres-Überlebensraten von über 85 % kurativ eingesetzt werden konnte (Laccourreya et al., 1996), (Laccourreya et al., 2001).

Eine Studie von Holsinger et al. zeigte, dass 30 % der 31 Patienten mit T2-T4a, N0-N1-Tumore, welche 3 – 4 Zyklen kombinierter Chemotherapie erhielten, dauerhafte Remissionsraten ohne Anzeichen eines Rezidivs über eine mediane Follow-up-Zeit von 5 Jahren erreicht haben. Auch in dieser Arbeit wurde bei der

Kombination zytostatischer Wirkstoffe, auch im Hinblick auf HPV-positive Zelllinien, gute Ergebnisse erzielt.

Im Allgemeinen muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Wirksamkeit der zytostatischen Therapie deutlich von dem Stadium der Erkrankung abhängt. Auch muss bedacht werden, dass eine intensive alleinige Chemotherapie mit deutlich höherer Toxizität einhergeht (Hitt et al., 2014).

Eine Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie profitiert von der lokal verstärkten Wirkung der Strahlentherapie und der systemischen Wirkung einer Chemotherapie. Man erhofft sich eine Erradikation von Mikrometastasen und einen synergistischen strahlentherapeutischen Effekt durch z. B. die Hemmung der Reparatur subletaler Läsionen (Vokes & Weichselbaum, 1990).

Gerade im Hinblick auf eine mögliche Strahlensensibilität HPV-positiver Zellen muss diesem Behandlungsregime große Bedeutung beigemessen werden. Diese Arbeit zeigt, dass eine Behandlung von HPV-positiven Tumoren im Kopf-Halsbereich effektiver ist, wenn zusätzlich eine Strahlentherapie angewandt wurde. UD-SCC-2 zeigt in jeder bestrahlten Kombination bessere Ansprechraten als ohne Bestrahlung. Die Literatur bestätigte diese Beobachtung (Ziemann et al., 2015).

Eine mögliche Erklärung könnte eine höhere zelluläre Radiosensitivität aufgrund von Zellzyklus Dysregulation sein, welche im Verlauf die DNA Doppelstrangbruch-Reparatur beeinträchtigt (Arenz et al., 2014).

Eine Meta-Analyse von Munro et al. ergab, dass bei Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC und durchgeführter Radiochemotherapie die Überlebenszeit um 12 % verbessert wurde verglichen mit einer alleinigen Bestrahlung (Munro, 1995).

Diese Überlegenheit wurde in mehreren randomisierten Studien bestätigt und entfällt im Wesentlichen auf die verbesserte lokoregionale Kontrolle (Bonner et al., 2006; Calais et al., 1999; Jeremic et al., 2000)

Eine kombinierte Radiochemotherapie stellt bei primär inoperablem HNSCC und einem organerhaltende Regime für fortgeschrittene Tumorstadien eine wichtiges Therapieregime dar (Wang & Knecht, 2011). Dennoch bleibt kritisch anzumerken, dass die späteren strahleninduzierten, dysfunktionalen Organschäden noch nicht ausreichend untersucht und ausgewertet wurden (Wang & Knecht, 2011).

4.3.5. Ausblick

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit verifizieren die klinischen Beobachtungen, dass HPV-positive Tumore im Kopf-Halsbereich besser auf eine Radiochemo- bzw. Radioimmuntherapie ansprechen als noxeninduzierte Tumore. Besonders die bereits genannte Kombination aus platinhaltigen Chemotherapeutika und Bestrahlung stellen für HPV-positive Tumore eine signifikant wirksamere Behandlungsoption dar. Dennoch sind die Mechanismen, die zu diesem besseren Ansprechen führen noch nicht eindeutig verstanden. Neue Hypothesen vermuten die durch virale Proteine induzierte und zusätzlich positiv wirkende eigene Immunantwort der Patienten (Bol & Grégoire, 2014).

Da besonders bei HPV-positiven Tumoren die Genprodukte E5 und E6 maßgeblich an der Störung der antiproliferativen Mechanismen der Zelle beteiligt zu sein scheinen, ist es naheliegend auf dieser Ebene einzugreifen und weitere Forschung zu investieren. Ein Begriff, welcher sich in der Literatur unter diesem Aspekt immer häufiger findet, ist die Immuntherapie (Hoffmann, Bier, & Whiteside, 2004; Whiteside, 2001).

Das Konzept einer Immuntherapie ist es den Aufbau einer effektiven Immunantwort gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) zu fördern. Dies geschieht in dem Versuch, die Antigenität und/oder Immunogenität von TAAs zu stärken und die hemmenden Mechanismen zu korrigieren.

Aktuelle Antitumor-Immuntherapie-Techniken umfassen unter anderem die unspezifische Immunstimulation, genetische Veränderungen des Tumors oder der Immunzellen, die Verwendung von monoklonalen Antikörpern und Immunisierungsprozesse im Sinne von Impfungen. Die Therapie mit monoklonalen Antikörpern wie z. B. Cetuximab ist bereits etabliert und war Bestandteil dieser Arbeit.

Xie et al. stellte 2012 ein small molecule Inhibitor namens „CH1iB“ vor, welches das Wirtprotein p300 bindet, das physiologisch p53 bindet und reguliert. CH1iB verhindert die Bindung des viralen Proteins E6 an p300, sodass p53 regeneriert und unbeeinflusst bleibt. Eine Kombination aus CH1iB und platinhaltigen Substanzen führe so zu einem potenzierenden Effekt von Cisplatin.

Die Kombination von CH1iB und Cisplatin eliminierte 91 % der HPV-positiven Tumorzellen. Außerdem erhöhte sich die Apoptoserate um ein Vielfaches. Ob und inwiefern sich andere Kombinationsbehandlungen mit solchen small molecules als potenzierend oder additiv auswirken bleibt abzuwarten (Xie et al., 2014).

HPV-Impfstoffe (Gardasil[®], Cervarix[®]) stehen für die Prävention von Gebärmutterhalskrebs für junge Frauen seit 2006 zur Verfügung. Seit 2009 wurden diese Impfstoffe ebenfalls bei Männern zur Prävention ano-rektaler HPV Infektionen im Rahmen großer Studien zugelassen (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2010).

Da es sich bei HPV-positiven HNSCC Patienten in den meisten Fällen um Männer handelt sollte auch im Hinblick auf die Prävention HPV-positiver Kopf-Halstumore untersucht werden. Ob diese Impfungen zu einem Rückgang der HPV-assoziierten HNSCC führt ist noch nicht verifiziert worden. Bei HNSCC Patienten mit bestehender Tumorlast muss darauf hingewiesen werden, dass Gardasil[®] und Cervarix[®] keine therapeutischen Impfstoffe sondern Prophylaxe-Impfungen sind. Ob und inwieweit sie auch therapeutisch wirksam sind, muss weiter untersucht werden.

Fest steht jedoch, dass dies einen neuen Ansatz bei der Therapie von HPV-positiven Tumoren im Kopf-Halsbereich darstellt und neue Möglichkeiten in der Behandlung dieser Tumorentität birgt.

5. Zusammenfassung

Die Prävalenz und Inzidenz von HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs wächst in den letzten Jahrzehnten stetig an. Bisher gibt es trotz vieler Hinweise in der Literatur bzgl. eines unterschiedlichen Ansprechens zu noxeninduzierten Tumoren kein spezialisiertes Behandlungskonzept für diese Tumoren.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 im Gegensatz zu den HPV-negativen Cal27 und UD-SCC-5 deutlich besser auf alleinige Strahlenbehandlung anspricht. Auch die Ansprechraten nach Therapie mit Cisplatin, 5-FU oder Cetuximab waren sowohl im Crystal-Violet-Proliferationsassay als auch im Colony-Formation-Assay für HPV-positive Zellen sehr vielversprechend und konnten durch eine Kombination mit einer Strahlenbehandlung weiter verbessert werden.

Ziel sollte es nun sein in prospektiven Studien diese Ergebnisse auch in der Klinik zu verifizieren um ggf. die Behandlungsstrategien für HPV induzierte Tumoren zu optimieren. Zudem sollte durch neue Therapeutika wie beispielsweise small molecule inhibitors versucht werden additive Effekte zu generieren und das Outcome zu steigern.

6. Literaturverzeichnis

Al-Sarraf, M. (1987). Chemotherapeutic management of head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 6(3), 181–198.

Al-Sarraf, M., LeBlanc, M., Giri, P. G., Fu, K. K., Cooper, J., Vuong, T., Schuller, D. E. (1998). Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *Journal of Clinical Oncology*, 16(4), 1310–1317.

Arenz, A., Ziemann, F., Mayer, C., Wittig, A., Dreffke, K., Preising, S., Wittekindt, C. (2014). Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlentherapie Und Onkologie: Organ Der Deutschen Röntgengesellschaft [et Al]*, 190(9), 839–846. <http://doi.org/10.1007/s00066-014-0605-5>

Banci, L., Bertini, I., Blaževič, O., Calderone, V., Cantini, F., Mao, J., Carri, M. T. (2012). Interaction of Cisplatin with Human Superoxide Dismutase. *Journal of the American Chemical Society*, 134(16), 7009–7014. <http://doi.org/10.1021/ja211591n>

Basu, A., Krishnamurthy, S., Basu, A., & Krishnamurthy, S. (2010). Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage, Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *Journal of Nucleic Acids, Journal of Nucleic Acids*, 2010, 2010, e201367. <http://doi.org/10.4061/2010/201367>, 10.4061/2010/201367

Berger, B., Belka, C., Weinmann, M., Bamberg, M., Budach, W., & Hehr, T. (2010). Reirradiation with alternating docetaxel-based chemotherapy for recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 186(5), 255–261.

Bernier, J., Cooper, J. S., Pajak, T. F., Van Glabbeke, M., Bourhis, J., Forastiere, A., Ang, K.-K. (2005). Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (# 22931) and RTOG (# 9501). *Head & Neck*, 27(10), 843–850.

Bol, V., & Grégoire, V. (2014). Biological basis for increased sensitivity to radiation therapy in HPV-positive head and neck cancers. *BioMed Research International*, 2014, 696028. <http://doi.org/10.1155/2014/696028>

Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jassem, J. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 354(6), 567–578.

Boetz, F. (2008). Neoadjuvant radiochemotherapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity]. *HNO*, 56(2), 183.

Calais, G., Alfonsi, M., Bardet, E., Sire, C., Germain, T., Bergerot, P., Bertrand, P. (1999). Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(24), 2081–2086.

Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Koch, W. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Research*, 56(11), 2488–2492.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010). FDA licensure of quadrivalent human papillomavirus vaccine (HPV4, Gardasil) for use in males and guidance from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59(20), 630–632.

Chaachouay, H., Ohneseit, P., Toulany, M., Kehlbach, R., Multhoff, G., & Rodemann, H. P. (2011). Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology*, 99(3), 287–292.

Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Gillison, M. L. (2011). Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 29(32), 4294–4301. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>

D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Gillison, M. L. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 356(19), 1944–1956.
Dittmann, K., Mayer, C., & Rodemann, H. P. (2010). Nuclear EGFR as novel therapeutic target. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 186(1), 1–6.

Eliassen, A. M., Hauff, S. J., Tang, A. L., Thomas, D. H., McHugh, J. B., Walline, H. M., Prince, M. E. (2013). Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Pregnant Women. *Head & Neck*, 35(3), 335–342. <http://doi.org/10.1002/hed.22973>

Facchinetti, M. M., Gandini, N. A., Fermento, M. E., Sterin-Speziale, N. B., Ji, Y., Patel, V., Curino, A. C. (2010). The expression of sphingosine kinase-1 in head and neck carcinoma. *Cells Tissues Organs*, 192(5), 314–324.

Fakhry, C., & Gillison, M. L. (2006). Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 24(17), 2606–2611.

Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus–positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(4), 261–269.

Gerber, D. E., & Choy, H. (2010). Cetuximab in combination therapy: from bench to clinic. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(1), 171–180.

Goldenberg, D., Lee, J., Koch, W. M., Kim, M. M., Trink, B., Sidransky, D., & Moon, C.-S. (2004). Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 131(6), 986–993. <http://doi.org/10.1016/j.otohns.2004.02.035>

Greenlee, R. T., Hill-Harmon, M. B., Murray, T., & Thun, M. (2001). Cancer statistics, 2001. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 51(1), 15–36.

Guntinas-Lichius, O., Wendt, T., Buentzel, J., Esser, D., Lochner, P., Mueller, A., Altendorf-Hofmann, A. (2010). Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(1), 55–63. <http://doi.org/10.1007/s00432-009-0636-y>

Haddad, R. I., & Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1143–1154.

Harrison, L., & Blackwell, K. (2004). Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *The Oncologist*, 9(Supplement 5), 31–40.

Hatanpaa, K. J., Burma, S., Zhao, D., & Habib, A. A. (2010). Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia (New York, NY)*, 12(9), 675.

Hemminki, K., Dong, C., & Frisch, M. (2000). Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *European Journal of Cancer Prevention*, 9(6), 433–437.

Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 59(2 Suppl), 21–26. <http://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.11.041>

HEROIU (CATALOIU), A.-D., DANCIU, C. E., & POPESCU, C. R. (2013). Multiple Cancers of the Head and Neck. *Mædica*, 8(1), 80–85.

Hitt, R., Mesia, R., Grau, J. J., Rubió, J., Martínez-Trufero, J., Morillo, E. D. B., Hernandez, J. J. C. (2014). 1035pinduction Chemotherapy (ict) with Docetaxel/Cisplatin/5-Fluorouracil (t/P/F) Followed by Chemoradiotherapy with Cisplatin (crtp) Vs Bioradiotherapy with Cetuximab (rtcx) for Unresectable Locally Advanced Head & Neck Cancer (ulahnc): Preliminary Results on Toxicity a Ttcc Group Trial. *Annals of Oncology*, 25(suppl 4), iv355–iv356. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu340.50>

Höer, A., & Klein, S. (2013). Umsatzveränderungen in einzelnen Indikationsgruppen. In P. D. med B. Häussler, D. med A. Höer, & E. Hempel (Eds.), *Arzneimittel-Atlas 2012* (pp. 43–376). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-32587-8_3

Hoffmann, T. K. (2012). Systemic therapy strategies for head-neck carcinomas: Current status. *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery*, 11. <http://doi.org/10.3205/cto000085>

Hoffmann, T. K., Bier, H., & Whiteside, T. L. (2004). Targeting the immune system: novel therapeutic approaches in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 53(12), 1055–1067. <http://doi.org/10.1007/s00262-004-0530-z>

Jané-Salas, E., López-López, J., Roselló-Llabrés, X., Rodríguez-Argueta, O.-F., & Chimenos-Küstner, E. (2012). Relationship between oral cancer and implants: clinical cases and systematic literature review. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 17(1), e23–e28. <http://doi.org/10.4317/medoral.17223>

Jeng, J. H., Chang, M. C., & Hahn, L. J. (2001). Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncology*, 37(6), 477–492.

Jeremic, B., Shibamoto, Y., Milicic, B., Nikolic, N., Dagovic, A., Aleksandrovic, J., Tadic, L. (2000). Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low-dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(7), 1458–1464.

Kalyankrishna, S., & Grandis, J. R. (2006). Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(17), 2666–2672. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.8306>

Kim, S.-H., Juhn, Y.-S., Kang, S., Park, S.-W., Sung, M.-W., Bang, Y.-J., & Song, Y.-S. (2006). Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(7-8), 930–938. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5561-x>

Klussmann, J., Dinh, S., Guntinas-Lichius, O., Wittekindt, C., Weisharpenborn, S., Wieland, U., Turek, L. (2004). HPV-assozierte Tonsillenkarzinome: Ein Update. *Hno*, 52(3), 208–218.

Kuo, Y.-M., Gybina, A. A., Pyatskowitz, J. W., Gitschier, J., & Prohaska, J. R. (2006). Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *The Journal of Nutrition*, 136(1), 21–26.

Laccourreye, O., Brasnu, D., Bassot, V., Ménard, M., Khayat, D., & Laccourreye, H. (1996). Cisplatin-fluorouracil exclusive chemotherapy for T1-T3N0 glottic squamous cell carcinoma complete clinical responders: five-year results. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 14(8), 2331–2336.

Laccourreye, O., Veivers, D., Hans, S., Ménard, M., Brasnu, D., & Laccourreye, H. (2001). Chemotherapy alone with curative intent in patients with invasive squamous cell carcinoma of the pharyngolarynx classified as T1-T4N0M0 complete clinical responders. *Cancer*, 92(6), 1504–1511.

Langevin, S. M., McClean, M. D., Michaud, D. S., Eliot, M., Nelson, H. H., & Kelsey, K. T. (2013). Occupational dust exposure and head and neck squamous cell carcinoma risk in a population-based case-control study conducted in the greater Boston area. *Cancer Medicine*, 2(6), 978–986. <http://doi.org/10.1002/cam4.155>

Liang, X.-H., Lewis, J., Foote, R., Smith, D., & Kademani, D. (2008). Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66(9), 1875–1880.

Maier, H., Dietz, A., Gewelke, U., Seitz, H. K., & Heller, W.-D. (1990). Tabak- und alkoholassoziiertes Krebsrisiko im Bereich des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 69(10), 505–511.

Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., & Forastiere, A. A. (2010). HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*, 11(8), 781–789.

Massarelli, E., Haddad, R. I., Lee, J. J., Lin, H. Y., Garden, A. S., Blumenschein, G. R., Papadimitrakopoulou, V. (2015). Weekly paclitaxel, carboplatin, cetuximab (PCC), and cetuximab, docetaxel, cisplatin, and fluorouracil (C-TPF), followed by risk-based local therapy in previously untreated, locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (LAHNSCC). *ASCO Meeting Abstracts*, 33(15_suppl), 6001.

Milisavljevic, D., Stankovic, M., Zivic, M., Popovic, M., & Radovanović, Z. (2009). Factors affecting results of treatment of Hypopharyngeal Carcinoma. *Hippokratia*, 13(3), 154–160.

Morris, L. G., Sikora, A. G., Patel, S. G., Hayes, R. B., & Ganly, I. (2011). Second primary cancers after an index head and neck cancer: subsite-specific trends in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(6), 739–746.

Morris, T. (2014, May 14). Effect of the human serum albumin concentration on the metabolism of cisplatin in vitro (Thesis). University of Calgary. Retrieved from <http://theses.ucalgary.ca/handle/11023/1523>

Munro, A. J. (1995). An overview of randomised controlled trials of adjuvant chemotherapy in head and neck cancer. *British Journal of Cancer*, 71(1), 83–91.

Nabeya, Y., Suzuki, T., Furuya, A., Koide, N., Ohkoshi, M., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (2011). Calpain regulates thymidylate synthase-5-fluoro-dUMP complex levels associated with response to 5-fluorouracil in gastric cancer cells. *Cancer Science*, 102(8), 1509–1515. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01978.x>

Okada, T., Kashino, G., Nishiura, H., Tano, K., & Watanabe, M. (2012). Micronuclei formation induced by X-ray irradiation does not always result from DNA double-strand breaks. *Journal of Radiation Research*, 53(1), 93–100.

Paz, I. B., Cook, N., Odom-Maryon, T., Xie, Y., & Wilczynski, S. P. (1997). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Cancer*, 79(3), 595–604.

Pedroza-Torres, A., López-Urrutia, E., García-Castillo, V., Jacobo-Herrera, N., Herrera, L. A., Peralta-Zaragoza, O., Pérez-Plasencia, C. (2014). MicroRNAs in cervical cancer: evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(5), 6263–6281. <http://doi.org/10.3390/molecules19056263>

Peters, E., Pritzkuleit, R., Beske, F., & Katalinic, A. (2010). Demografischer Wandel und Krankheitshäufigkeiten. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 53(5), 417–426.

Pignon, J.-P., Maître, A. le, Maillard, E., & Bourhis, J. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology*, 92(1), 4–14.

Pressemitteilungen - Krebs war 2013 die zweithäufigste Todesursache - Statistisches Bundesamt (Destatis). (n.d.). Retrieved October 30, 2015, from https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2015/02/PD15_034_232.html

Psyrris, A., Kassar, M., Yu, Z., Bamias, A., Weinberger, P. M., Markakis, S., Dimopoulos, M. A. (2005). Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(24), 8637–8643.

Reichart, P. A. (2000). Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 28(5), 390–398.

Reimers, N., Kasper, H. U., Weissenborn, S. J., Stützer, H., Preuss, S. F., Hoffmann, T. K., Guntinas-Lichius, O. (2007). Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *International Journal of Cancer*, 120(8), 1731–1738.

Ringström, E., Peters, E., Hasegawa, M., Posner, M., Liu, M., & Kelsey, K. T. (2002). Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*, 8(10), 3187–3192.

Rodriguez, C. P., & Adelstein, D. J. (2010). Survival Trends in Head and Neck Cancer: Opportunities for Improving Outcomes. *The Oncologist*, 15(9), 921–923. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0237>

Segaert, S., Taberner, J., Chosidow, O., Dirschka, T., Elsner, J., Mancini, L., Layton, A. (2005). The management of skin reactions in cancer patients receiving epidermal growth factor receptor targeted therapies. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 3(8), 599–606. <http://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2005.05058.x>

Shida, D., Takabe, K., Kapitonov, D., Milstien, S., & Spiegel, S. (2008). Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Current Drug Targets*, 9(8), 662.

Smith, E. M., Ritchie, J. M., Summersgill, K. F., Klusmann, J. P., Lee, J. H., Wang, D., Turek, L. P. (2004). Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *International Journal of Cancer*, 108(5), 766–772.

Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2009). Pharynx. TNM Online. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471420194.tnmc04/full>

Streit, S., Bange, J., Fichtner, A., Ihrler, S., Issing, W., & Ullrich, A. (2004). Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 111(2), 213–217. <http://doi.org/10.1002/ijc.20204>

Strome, S. E., Savva, A., Brissett, A. E., Gostout, B. S., Lewis, J., Clayton, A. C., Kasperbauer, J. L. (2002). Squamous Cell Carcinoma of the Tonsils A Molecular Analysis of HPV Associations. *Clinical Cancer Research*, 8(4), 1093–1100.

TIMOTHY D. COLLEN, RALPH WINTERHALDER, JOACHIM DIEBOLD, & WERNER MÜLLER. (2001). HPV bei Hals-Nasen-Ohren- Tumoren. *SCHWEIZER ZEITSCHRIFT FÜR ONKOLOGIE*.

Vermorcken, J. B., Remenar, E., van Herpen, C., Gorlia, T., Mesia, R., Degardin, M., Preiss, J. H. (2007). Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 357(17), 1695–1704.

Vermorcken, J. B., Trigo, J., Hitt, R., Koralewski, P., Diaz-Rubio, E., Rolland, F., Baselga, J. (2007). Open-Label, Uncontrolled, Multicenter Phase II Study to Evaluate the Efficacy and Toxicity of Cetuximab As a Single Agent in Patients With Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Who Failed to Respond to Platinum-Based Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 25(16), 2171–2177. <http://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.7447>

Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J. L., & Reiffers, J. (2001). [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiothérapie: Journal De La Société Française De Radiothérapie Oncologique*, 5(2), 109–129.

Vinokurova, S., & von Knebel Doeberitz, M. (2011). Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PloS One*, 6(9), e24451. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0024451>

Vokes, E. E., & Weichselbaum, R. R. (1990). Concomitant chemoradiotherapy: rationale and clinical experience in patients with solid tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 8(5), 911–934.

Wang, C.-J., & Knecht, R. (2011). Current concepts of organ preservation in head and neck cancer. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology: Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 268(4), 481–487. <http://doi.org/10.1007/s00405-010-1407-8>

Wenig, B. M. (2002). Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aerodigestive Tract: Precursors and Problematic Variants. *Modern Pathology*, 15(3), 229–254. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3880520>

Whiteside, T. L. (2001). Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer. *Current Oncology Reports*, 3(1), 46–55.

Wolff, K.-D., Follmann, M., & Nast, A. (2013). Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. Retrieved from <https://www.aerzteblatt.de/pdf/109/48/m829.pdf>

Xie, X., Piao, L., Bullock, B. N., Smith, A., Su, T., Zhang, M., Pan, Q. (2014). Targeting HPV16 E6-p300 interaction reactivates p53 and inhibits the tumorigenicity of HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 33(8), 1037–1046. <http://doi.org/10.1038/onc.2013.25>

Ziemann, F., Arenz, A., Preising, S., Wittekindt, C., Klusmann, J. P., 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. *American Journal of Cancer Research*, 5(3), 1017–1031.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell zur Mehrschrittkarzinogenese in HNSCC

Abbildung 2: Zellzyklus

Abbildung 3: Molekularpathologie bei HNSCC mit HPV.-Assoziation

Abbildung 4: IC50 Bestimmung für Cisplatin.

Abbildung 5: IC50 Bestimmung für 5-FU

Abbildung 6: IC50 Bestimmung für Cetuximab

Abbildung 7: Strahlenkinetik aller Zelllinien

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kombinationsansätze der Crystal-Violett ELISA- Assays.

Abbildung 9: Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Medikamentendosen.

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Kombinationsansätze der Crystal-Violett ELISA Assays für unterschiedliche Strahlendosen.

Abbildung 11: Kombinationsversuche mit 0,25 μ M und 2 Gy/ 10 Gy Bestrahlung bei Cal27

Abbildung 12: Kombinationsversuche mit 0,25 μ M und 2 Gy/ 10 Gy Bestrahlung bei DU-SCC-5

Abbildung 13: Kombinationsversuche mit 0,25 μ M und 2 Gy/ 10 Gy Bestrahlung bei UD-SCC-2

Abbildung 14: Einfluss von Cisplatin auf das klonogene Überleben

Abbildung 15: Einfluss von 5-FU auf das klonogene Überleben

Abbildung 16: Einfluss von Cetuximab auf das klonogene Überleben

Abbildung 17: Einfluss ionisierender Strahlung auf das klonogene Überleben

Abbildung 18: Einfluss kombinierter Inhibitoren auf das klonogene Überleben

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: pT-Klassifikation der UICC

Tabelle 2: pN-Klassifikation der UICC

Tabelle 3: pM-Klassifikation der UICC

Tabelle 4: Definition des R- Faktors.

Tabelle 5: Stadieneinteilung von Kopf-Halstumoren

Tabelle 6: Grading von Kopf-Halstumoren

Tabelle 7: Klassifikationsschema zur Einteilung prämaligener Vorstufen von HNSCC

Tabelle 8: Geräte

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Reagenzien

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien

Tabelle 12: Zellkultur Supplements

Tabelle 13: Verwendete Inhibitoren

Tabelle 14: Standardeinstellung Strahlengerät

Tabelle 15: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: Kontrolle

Tabelle 16: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 0,25 μ M Cisplatin

Tabelle 17: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 0,25 μ M 5-FU

Tabelle 18: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 100 μ M Cetuximab

Tabelle 19: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 0,25 μ M Cisplatin + 0,25 μ M 5-FU

Tabelle 20: Gesamtüberleben (in %), Behandlung: 100 μ M Cetuximab + 0,25 μ M 5-FU

Tabelle 21: Gesamtüberleben (in %) der Zelllinie Cal27

Tabelle 22: Gesamtüberleben (in %) der Zelllinie UD-SCC5

Tabelle 23: Gesamtüberleben (in %) der Zelllinie UD-SCC2

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovine serum albumin
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
Erk	extracellular signal regulated kinase
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
HER2	human epidermal growth factor receptor-2
IgG	Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
Mg ²⁺	Magnesium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NH ₄	Ammoniumchlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

PCR	Poymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositol 3 Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuklease
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
s.a.	siehe auch
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TKI	Tyrosinkinase
TM	Transmembran Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

10. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Henning Bier danke ich für die Chance und Möglichkeit in einem angenehmen Team und in guter Atmosphäre unter besten Bedingungen im onkologischen Labor der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Klinikums rechts der Isar an diesem interessanten Thema arbeiten zu dürfen.

Frau Dr. habil. Anja Pickhard danke ich für die stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die unerschöpfliche Geduld und das immer offene Ohr in allen Belangen. Vielen Dank für die zügige Durchsicht meines Skripts.

Herzlicher Dank gilt auch und in besonderem Maße Herrn Guido Piontek, der mir stets zur Seite stand und mich menschlich und fachlich kompetent mit Rat und Tat unterstützte. Immer ansprechbar, immer kollegial und freundlich. Vielen Dank.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Michael Molls danke ich für die Möglichkeit die Strahlenversuche in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie der Technischen Universität München durchführen zu können.

