

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

**Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren  
in der Kombinationschemotherapie mit Cisplatin und 5-  
Fluorouracil des oralen  
Plattenepithelkarzinoms *in vitro***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
M. Luise Knierim  
aus Darmstadt  
Würzburg, Dezember 2018

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Urs D. A. Müller-Richter

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2019

Die Promovendin ist Zahnärztin

Auch mit kleinen Schritten kann man einen Marathon laufen.

Heinz Bayer

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Das orale Plattenepithelkarzinom .....	2
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie .....	3
1.1.2	Diagnose.....	3
1.1.3	Therapie.....	4
1.2	Rezeptortyrosinkinasen .....	8
1.2.1	Einteilung und Struktur .....	8
1.2.2	Signaltransduktion .....	9
1.2.3	Tumorgenese.....	11
1.3	Tyrosinkinaseinhibitoren .....	11
1.3.1	Allgemein .....	11
1.3.2	Wirkmechanismus.....	12
1.4	Ziel der Arbeit.....	13
2	Material und Methode .....	14
2.1	Zytostatika.....	14
2.1.1	Cisplatin .....	14
2.1.2	5-Fluorouracil.....	14
2.2	Tyrosinkinaseinhibitoren .....	15
2.2.1	Lapatinib .....	15
2.2.2	Pazopanib.....	16
2.2.3	Trametinib.....	17
2.2.4	Dabrafenib .....	18
2.3	Wirkstoffe und Medien .....	19
2.4	Geräte und Software .....	21
2.5	Zelllinien und Zellkulturen .....	21
2.6	Versuchsaufbau und Durchführung .....	22
2.7	Expressionsanalyse relevanter Rezeptor-Gene .....	27
2.7.1	PCR (Polymerase-Kettenreaktion) .....	27
2.8	Statistische Methoden.....	29
3	Ergebnisse .....	32

3.1	Übersicht der Rezeptorexpression.....	32
3.2	Untersuchung der antiproliferativen Aktivität von Cisplatin und 5-FU...	33
3.3	Untersuchung der antiproliferativen Aktivität verschiedener Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	35
3.3.1	Wirksamkeit von Lapatinib.....	35
3.3.2	Wirksamkeit von Pazopanib .....	36
3.3.3	Wirksamkeit von Trametinib.....	37
3.3.4	Wirksamkeit von Dabrafenib.....	39
3.4	Untersuchung der antiproliferativen Aktivität der verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren in Kombination mit 5-Fluorouracil und Cisplatin .....	40
3.4.1	Wirksamkeit von Lapatinib in der Kombinationstherapie .....	40
3.4.2	Wirksamkeit von Pazopanib in der Kombinationstherapie.....	43
3.4.3	Wirksamkeit von Trametinib in der Kombinationstherapie.....	45
3.4.4	Wirksamkeit von Dabrafenib in der Kombinationstherapie .....	48
3.5	Vergleich der Zelllinien.....	51
3.6	Vergleich zwischen Mono- und Kombinationstherapie .....	52
3.6.1	Lapatinib .....	53
3.6.2	Pazopanib.....	54
3.6.3	Trametinib.....	55
3.6.4	Dabrafenib .....	56
3.6.5	Statistischer Vergleich .....	57
4	Diskussion .....	59
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literaturverzeichnis .....	75
7	Abbildungsverzeichnis .....	90
8	Tabellenverzeichnis .....	93
9	Anhang.....	94
9.1	Charakterisierung der Interaktion abhängig vom Kombinationsindex...	94
10	Publikation.....	95
11	Danksagung .....	96
12	Lebenslauf.....	97

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
ABC	ATP-binding cassette
ABCB1	ATP-binding cassette subfamily B member 1
ABCG2	ATP-binding cassette subfamily G member 2
AML	Acute myeloid leukaemia
ANOVA	mehrfaktorielle Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BIM	Bcl-2-like protein 11
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
c	Sicherheitsfaktor (certainty)
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CAF	Krebs-assoziierten Fibroblasten
CH <sub>3</sub> OH	Methanol
CI	Konfidenzintervall
CIP	Computerunterstützte individuelle Prognosestellung
Cis	Cisplatin
c-KIT	CD117, KIT oder Stammzellfaktor-Rezeptor
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom P450
Dab	Dabrafenib
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulphoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPD	Dihydropyrimidindehydrogenase
DVT	Digitale Volumetomographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor

EGFR	Epidermal growth factor receptor
ErbB (1-4)	epidermal growth factor receptor 1-4
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
F	Statistischer F-Wert
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FG	Statistische Freiheitsgrade
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GDP	Guanosindiphosphat
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
Gy	Gray
HCl	Chlorwasserstoff
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPV	Humanes Papillomanvirus
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, GTPase
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
log	Logarithmus
Itk	Interleukin-2 receptor-inducible T-cell kinase
IMRT	Intensity modulated radiotherapy
JMD	Juxtamembranäre Domäne
K	Kombinationsindex
KRAS	Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homologue gen
Lab	Lapatinib
LC <sub>50</sub> -Wert	Letale Konzentration für 50% der Zellen
Lck	Leukocyte-specific protein tyrosine kinase
M	Molare Masse
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Multiples Myelom
MAbs	Monoklonale Antikörper

MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MDR	Multidrug resistance
MEK	mitogen activated protein-kinase
MET	Mesenchymal epithelial transition factor
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ionen
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
nM	Nanomolar
NK	Nierenzellkarzinom
NSCLC	Non-smallcell lung cancer
NGF	Nerve growth factor
OPG	Orthopantomogramm
OS	Overall Survival - Gesamtüberlebensrate
p <sub>ANOVA</sub>	mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)
p <sub>PS</sub>	zweifaktorielle Rangvarianzanalyse mit Messwiederholungen auf einem Faktor nach Puri und Sen
p <sub>t</sub>	t-Test
p <sub>U</sub>	p aus dem U-Test nach Mann und Whitney
Paz	Pazopanib
PBS	Phosphate buffered saline
PCF	relativen Zentrifugalbeschleunigung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF (A und B)	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PEC	Orales Plattenepithelkarzinom
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	Progressions-free survival - progressionsfreies Überleben
Pgp	Humanes P-Glykoprotein
PI3K/AKT-Weg	Phosphoinositid-3-Kinase; AKT= Proteinkinase B (Serin/Threonin-Kinase)

PI3K/AKT/mTOR	Phosphoinositide-3-kinase/ Proteinlinase B = Serin-Threonin-Kinase/ mammalian target of rapamycin
PIS	Penicillin/Streptomycin
Phospholipase-C-Weg	Steuerung der Genexpression durch Ca <sup>2+</sup> -Freigabe
PTB-Domäne	Phosphotyrosin Bindungs-Domäne
PTK	Protein-Tyrosinkinase
Ras/Raf/MAPK-Weg	Rat sarcoma /rapidly accelerated fibrosarcoma /Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade-Weg
RCC	Nierenzellkarzinom
RCT	Radiochemotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SH2-Domäne	Src-homology 2-Domäne
SMAC-mimetics	second mitochondria-derived activator of caspase-mimetics
SD	Standard deviation
STAT3/5	Signal transducer and activator of transcription 3/5
STS	Soft tissue sarcoma
Tra	Trametinib
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNM-System	TNM Classification of Malignant Tumors
TPI	Therapieabhängigen Prognoseindex
UGTs	UDP-Glucuronosyltransferase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	World Health Organization
WTS	Weichteilsarkom
w/o	without
w/v	weight (of solute)

# 1 Einleitung

Die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms fußt auf der chirurgischen Intervention mit lokaler Resektion des Tumors und einer möglichen lokoregionären Lymphknotenentfernung, der Radiatio wie auch der medikamentösen Tumortherapie. Trotz Innovationen in allen Teilgebieten dieses multimodalen Therapiekonzeptes, wie z.B. der Möglichkeit intraoperativer Schnellschnittdiagnostik [1], der Einführung der Intensity modulated radiotherapy (IMRT) oder der Nutzung neuerer monoklonaler Antikörper, scheint die 5-Jahre-Überlebensrate von 55–60 % während der letzten Dekaden unverändert [2, 3].

Die klassischen Zytostatika sind aufgrund erheblicher Toxizitäten und Nebenwirkungen nur limitiert einsetzbar. Zudem reduzieren primäre und sekundäre Chemotherapie-Resistenzen ihre Wirksamkeit. Neuartige metallorganische Komplexverbindungen wie Eisen-, Titan- und Nickelkomplexe zeigen erste positive Effekte in der Überwindung solcher Resistenzen [4-10]. Die Optimierung und Weiterentwicklung insbesondere der medikamentösen Tumortherapie ist daher von großer Bedeutung, um besonders die Überlebensdauer und -wahrscheinlichkeit des PEC zu verbessern.

Durch einen großen Kenntniszuwachs auf molekularer Ebene konnten viele intrazelluläre Signaltransduktionswege in Zusammenhang mit Tumorproliferation gebracht werden. Eine Tumorzelle beinhaltet in der Regel zahlreiche Mutationen, von denen aber nur wenige eine entscheidende funktionelle Bedeutung für die Zelle haben [11]. Besonderes Augenmerk richtet sich hierbei auf Rezeptortyrosinkinasen (RTK), die in zahlreichen Tumorentitäten fehlreguliert bzw. überexprimiert sind [12]. Ein etablierter therapeutischer Angriffspunkt beim PEC ist der epidermal growth factor receptor (EGFR), da eine Überexpression (>90 %), Amplifikation (10 %) und Mutation (3 %) in vielen PEC sowie einer Vielzahl von anderen epithelialen Tumoren nachgewiesen werden konnten [13-16]. Insbesondere die häufig vorkommende Überexpression vom EGFR-Protein ist ein Indikator für eine schlechte Prognose und korreliert mit reduzierter Gesamtüberlebensrate (OS) und reduziertem progressionsfreien

Überleben (PFS) [17-20]. Mit molekularbiologischen Screeningmethoden lassen sich immer mehr spezifisch (intra)zelluläre *targets* finden. So konnte auch eine pathogene Expression des VEGF-Rezeptors (vascular endothelial growth factor rezeptor) und MET-Faktors (mesenchymal-epithelial transition) in HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) nachgewiesen werden, 90 % und 50–83 % respektive [21-23].

Neben der klassischen Therapie mittels Zytostatika hat sich in weiten Teilen der Medizin die sog. „*targeted therapy*“ als Therapie etabliert [24]. Sie stellt eine spezielle Art der medikamentösen Therapie dar, die sich auf biologische bzw. zytologische Eigenarten („*target*“) der Tumorzelle fokussiert. Dadurch wird eine zielgerichtete Hemmung von Tumorzellproteinen ermöglicht, wodurch Proliferation, Entdifferenzierung, Neoangiogenese und Metastasierung gebremst werden können [25]. Physiologische Zellen weisen solche Merkmale nicht oder kaum auf und werden daher weniger in Mitleidenschaft gezogen, als dies bei herkömmlicher Chemotherapie der Fall ist [26]. Auf diese Weise lassen sich mögliche Nebenwirkungen reduzieren. Zu diesen Arzneistoffen zählen unter anderem Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), Proteasom-Inhibitoren und die Gentherapie.

Um die Heilungsrate zu verbessern hat sich ein neuer Therapieansatz entwickelt, der die klassischen Zytostatika mit Substanzen der zielgerichteten Therapie kombiniert [27]. In dieser zielgerichteten Behandlungsform bilden die TKI eine Gruppe, die in dem Therapiespektrum des PEC eingehender untersucht werden soll.

## **1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom**

Das orale PEC ist ein maligner Tumor epidermalen Ursprungs, der relativ langsam wächst und i.d.R. aus sog. Vorläuferläsionen hervorgeht. Die invasive Form zeigt ein lokal destruierendes, exophytisches oder ulzerierendes Wachstum [28-30]. Obwohl in den letzten Jahren viele Fortschritte in Diagnostik und Therapie erzielt werden konnten, zeigt sich weiterhin eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 55–60 % [2, 3]. Der Zeitpunkt der Diagnosestellung, die

damit korrelierende Tumordicke sowie die Lokalisation spielen weiterhin eine für die Prognose entscheidende Rolle.

### **1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie**

Nach Aufzeichnung der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) erkrankten im Jahr 2013 etwa 13.800 Menschen in Deutschland an einem oralen Plattenepithelkarzinom [31, 32]. Die Inzidenz in Europa liegt bei ca. 20–30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Männer erkranken doppelt so häufig wie Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 63 Jahren, für Männer bei 61 Jahren [30, 33, 34].

Sowohl das Plattenepithelkarzinom als auch orale Präkanzerosen können durch einen Ursachenkomplex hervorgerufen werden. Dabei unterscheidet man zwischen primär exogenen und endogenen Noxen (Kanzerogene) und einer genetischen Determination. Bei letzterer sind vor allem exogenen Faktoren ursächlich für die Entstehung eines PEC. Das Geschlecht und vor allem das Alter und damit die Einwirkzeit exogener Noxe sind ausschlaggebend für die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms. Die endogene Eigenschaft einen Tumor zu entwickeln ist individuell unterschiedlich [35]. Verschiedene Genmutationen wurden in den letzten Jahren mit der Entstehung eines PEC in Verbindung gebracht. Besonders bei jüngeren Patienten konnte gehäuft eine TP53-Mutation nachgewiesen werden [36, 37]. Auch bei Immunsupprimierten oder Erbkrankheiten wie der Fanconi Anämie zeigt sich ein vermehrtes Auftreten von aggressiven PEC [38, 39].

Zu den wesentlichen exogenen Noxen zählen Rauchen, Alkoholkonsum, chronische UV-Strahlung, Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) sowie Fehlernährung und schlechte Mundhygiene [40]. Prädispositionsstellen sind Mundboden, harter Gaumen, Zungenrand, retromolares Dreieck, Innenwange, Vestibulum und nicht keratinisiertes Lippenrot.

### **1.1.2 Diagnose**

Die Diagnose wird in der Regel klinisch gestellt und muss histopathologisch gesichert werden. Laut der gültigen S3-Leitlinien können OPG-, PET/CT-, CT-,

DVT-, Ultraschall- oder MRT-Untersuchungen indiziert sein. Dabei werden die Größe des Primarius, dessen etwaige Infiltration in Nachbargewebe wie auch die lokoregionäre Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasierung bestimmt (TNM Klassifikation).

### **1.1.3 Therapie**

Die Therapieform wird maßgeblich von der Ausbreitung, Größe und Lokalisation des Tumors, dem Lymphknotenbefall sowie dem histologischen Differenzierungsgrad bestimmt. Dabei lassen sich zwei Grundkonzepte voneinander unterscheiden, das kurative und das palliative. Das kurative Konzept strebt eine dauerhafte Heilung des Patienten an, wohingegen das palliative bei weit fortgeschrittenem Tumorwachstum auf die Linderung des Tumorleidens zielt [41].

Das prognostisch beste Therapieverfahren ist eine radikale chirurgische Exzision „en-bloc-Resektion“ (R0) mit Schnellschnitt-Kontrolle [42] und elektive Neck Dissection bei unauffälligen Lymphknotenstatus (cN0) mit anschließender Rekonstruktion sowie, je nach TNM-Klassifikation, adjuvanter Radio-/Chemotherapie [43].

#### **1.1.3.1 Operative Therapie**

Die Tumorsektion findet mit einem auf die Tumorform abgestimmten und im gesunden Gewebe liegenden Sicherheitsabstand statt. Dieser beträgt zwischen 0,5 cm und 2 cm und muss in allen Richtungen eingehalten werden. In dieser Sicherheitszone erfolgt die Entfernung sämtlichen Gewebes, unter anderem auch Anteile des Ober- oder Unterkiefers. Zur bestmöglichen Beurteilung des Operationsergebnisses werden an den Resektionsrändern topographisch zugeordnete Schnellschnitten mit anschließend intraoperativer histopathologischer Kontrolle durchgeführt.

Bei dem oralen PEC ist in 20–40 % der Fälle eine Metastasierung in die Halslymphknoten zu beobachten. Die Level I-III sind in der Regel immer betroffen, das Level V nur selten. Unabhängig von der T-Kategorie erfolgt bei Patienten mit klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus eine elektive (prophy-

laktische) Neck Dissection [30]. Wenn radiologische und klinische Untersuchungen den Verdacht einer oder mehrerer Lymphknotenmetastasen bestätigt haben, findet eine kurative Neck Dissection statt. In Bezug auf das Ausmaß der Neck Dissection können, mehrere Modifikationen unterschieden werden [30, 43, 44].

### **1.1.3.2 Radio-/ Chemotherapie**

Die klassischen Zytostatika verursachen DNA-Schäden und greifen in die Zellteilung bzw. das Zellwachstum ein. Sie optimieren die Strahlensensitivität der Tumorzellen durch Synchronisierung ihrer Mitosephase (M-Phase, G2-Phase) [45]. Zudem vermindern Chemotherapeutika die Strahlenresistenz in hypoxischen Tumorzellen [46, 47]. Bei der Kombination aus Chemo- und Strahlentherapie wurde eine Verbesserung der Überlebensrate von ca. 20–30 % im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie erreicht [48, 49]. Die, je nach Therapieintention, am häufigsten eingesetzten Substanzen sind Cisplatin/PLATIBLASTIN®, 5-FU, Cetuximab/ERBITUX® sowie Docetaxel/TAXOTERE®. Als Standardbehandlung in der Radiochemotherapie kann die Monotherapie mit Cisplatin angesehen werden. Methotrexat wird aktuell nur noch selten bei Kopf-/Hals-Karzinomen eingesetzt, da es mit Nebenwirkungen, wie starker Mukositis einhergeht und bezüglich der Überlebensrate sowie Ansprechrates Cisplatin unterlegen ist [50-52].

In der Radiotherapie werden elektromagnetische Strahlen eingesetzt. Dazu gehören die Röntgen- oder Gammastrahlen sowie korpuskuläre Strahlen (z.B. Neutronen- oder Protonenstrahlen) [53]. Je nach Tumorausdehnung und Lage wird entschieden, welche Art von Strahlung zur Anwendung kommt. Das Zielvolumen umfasst den Primärtumor mit einem Mindestabstand von 1 cm. Besteht ein erhöhtes Risiko oder ein bestätigter Verdacht der lymphonodulären Metastasierung, so wird das lokoregionäre Lymphabflussgebiet in dieses Zielvolumen mit einbezogen [44]. Bei der alleinigen Radiotherapie erfolgt eine Bestrahlung des Primärtumors in der Regel fünfmal wöchentlich mit einer Einzeldosis von 1,8 bis 2 Gy (Gray) bis zu einer Gesamtstrahlendosis von ca. 66 bis 74 Gy. Die Strahlenbelastung bei der kombinierten Radio-Chemotherapie

ist mit einer Gesamtdosis von ca. 60 Gy geringer. Diese findet konventionell in 27–30 Fraktionen über ca. sechs Wochen statt. Bei Tumoren mit erhöhtem Rezidivrisiko ist laut Leitlinie postoperativ eine Gesamtdosis von 66 Gy zu empfehlen. Als palliativer Behandlungsansatz kann alternativ zur Radio-Chemotherapie eine Kombination der Strahlentherapie mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab angezeigt sein [54].

### **1.1.3.3 Medikamentöse Tumorthherapie**

Das mittlerweile breite Spektrum an medikamentösen Substanzen, die in der Therapie des oralen PEC zum Einsatz kommen, lassen sich in fünf Wirkstoffgruppen unterteilen: zytotoxische Chemotherapeutika, niedermolekulare Kinase-Inhibitoren, anti-EGFR monoklonale Antikörper und Immunmodulatoren. Die am häufigsten eingesetzten Substanzen sind platinhaltige Chemotherapeutika, 5-FU, Taxane oder Methotrexat. Hierbei hat, verglichen mit anderen Chemotherapeutika, Cisplatin die größte Bedeutung. In einer Meta-Analyse konnte gezeigt werden, dass Platinderivate effektiver sind als nicht platinhaltige Therapiekonzepte [48]. Bis zum heutigen Tage wird kontrovers diskutiert ob Cisplatin oder Carboplatin einen signifikanten Vorteil hat [55, 56].

Alle weiterentwickelten medikamentösen Therapiekonzepte konzentrieren sich primär auf eine Reduzierung behandlungsbedingter Toxizitäten mit einem gezielteren therapeutischen Angriffspunkt um Überlebensdauer und -qualität zu verbessern. Neben der klassischen Therapie mittels Zytostatika hat sich daher in der Medizin die sog. „*targeted therapy*“ als Therapie etabliert [24]. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Art der medikamentösen Therapie, welche auf biologische bzw. zytologische Eigenarten („*target*“) der Tumorzelle fokussiert ist. Zu diesen Arzneistoffen zählen unter anderem Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), Proteasom-Inhibitoren und die Gentherapie. Eine Anzahl von TKIs (Afatinib, Gefitinib, Sunitinib, Erlotinib und Lapatinib) wurden in der Therapie des fortgeschrittenen PEC getestet [57-59]. Sie greifen an spezifische fehlregulierte oder überexprimierte Tyrosinkinasen in Tumorzellen an. In der Gentherapie werden selektiv die genetischen Mutationen bekämpft [60, 61].

Bislang unterscheidet man vier verschiedene Gentyphen, welche in Tumorzellen eingeschleust werden können [62].

Immunmodulatoren stärken durch Stimulierung von T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) die körpereigenen Abwehrkräfte gegen die Tumorzellen. Nivolumab (Opdivo<sup>®</sup>) und Pembrolizumab (Keytruda<sup>®</sup>) sind zwei von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen Immuntherapeutika zur Behandlung des rezidivierenden bzw. metastasierten PEC bei vorheriger platinhaltiger Chemotherapie und genügend hoher PD-L1 (programmed death-ligand 1) Expression.

Da eine Überexpression (>90%) des EGFR in vielen PEC nachgewiesen werden konnte, etablierte sich EGFR als therapeutischer Angriffspunkt [63]. Insbesondere das Medikament Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) hat in den letzten Jahren als Medikation zur PEC-Behandlung an Bedeutung gewonnen. Der Wirkstoff Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher eine hohe Bindungsaffinität besitzt an der extrazellulären Domäne von EGFR besitzt und zusätzlich antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität induziert.

Die Kombination von Wirkstoffen ist ein guter Ansatz um Problematiken wie primäre und sekundäre Resistenzen insbesondere in der Chemotherapie zu umgehen. Ferner sollen additive Effekte genutzt werden um die Wirksamkeit zu verbessern. Die in der Literatur am häufigsten genannte Kombination ist Cisplatin mit 5-FU. Zusätze von Paclitaxel oder Docetaxel zeigten keine Überlegenheit zur Standardtherapie (Cis/5-FU) [59, 64]. Ohne 5-FU konnte Cisplatin mit Docetaxel eine höhere Tumoransprechrate und Überlebensrate mit geringeren Schleimhauttoxizitäten erreichen [65]. Der monoklonale Antikörper Cetuximab als weiterer Zusatz zeigte eine vielversprechende Aktivität als Erstlinientherapie bei Patienten mit rezidivierendem/metastasiertem PEC [66]. In der Palliativtherapie zeigt die Kombination aus Chemotherapie und Cetuximab einen Vorteil gegenüber der Monotherapie [43, 67]. Es gibt weitere Studien bezüglich synergistischen Effekten von Cetuximab und dem Immunmodulator Lenalidomide. Dieser hat die Fähigkeit die Zytokinproduktion von Immunzellen zu stimulieren und die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität zu aktivieren [68]. Um Resistenzen gegenüber Cetuximab entgegenzuwirken

wurden weitere monoklonale Antikörper oder Kinase-Inhibitoren kombiniert [59, 69]. Zwei der am häufigsten verwendeten TKI sind Gefitinib und Erlotinib [69]. Die Strahlentherapie mit Erlotinib lieferte gute Ergebnisse und kann auch mit Verabreichung von Cisplatin erfolgen [69]. Angesichts der im PEC nachgewiesenen Rezeptormutationen und schnell entwickelnden Platinresistenzen gewinnt die Kombination mit niedermolekularen TKI mehr an Bedeutung und benötigt intensivere Untersuchungen.

## 1.2 Rezeptortyrosinkinasen

### 1.2.1 Einteilung und Struktur

Voraussetzung für ein geordnetes Wachstum und Differenzierung von Gewebe und Organen ist die interzelluläre Kommunikation. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Interaktion von spezifischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, die eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. Nach der Lokalisation unterscheidet sich die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen (Protein-Tyrosinkinasen, PTK) von den Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Die RTK sind Transmembranrezeptoren. Sie besitzen eine extra-, eine trans- und eine intrazelluläre Region [70]. An der intrazellulären Domäne tragen sie eine Enzymgruppe, die Tyrosinkinase, welche die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten anderer Proteine ermöglicht [12]. Extrazellulär befindet sich die ligandenbindende Domäne mit variablen Strukturmotiven, auf der die Einteilung der RTK in drei verschiedene Typen basiert [12, 71]. Anhand ihrer Substratspezifität differenziert man den EGFR-Typ, den Insulinrezeptor-Typ und nerve growth factor (NGF)-Rezeptor-Typ. Zurzeit sind 58 RTK und 32 PTK bekannt. Die RTK werden in 20 Subfamilien unterteilt [72] und können mit *intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität* vorkommen. Hierbei ist die Tyrosinkinase Teil des Rezeptors. Bei Rezeptoren mit *assoziierter Tyrosinkinaseaktivität* ist sie an den Rezeptor gebunden.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten TKI beeinflussen unter anderem EGFR, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF), mitogen

activated protein-kinase (MAP-K-Kinase= MEK), platelet derived growth factor-receptor (PDGFR) und vascular endothelial growth factor-receptor (VEGFR).

EGFR ist ein membranständiger Rezeptor und gehört zur ErbB-Familie, bestehend aus vier verwandten RTK: EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4). Bei Aktivierung können verschiedene Signalwege initiiert werden (Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, STAT3/5 und Proteinkinase C). Die Signale stimulieren das Zellwachstum und verhindern den apoptotischen Zelltod. Mutationen können demnach zu unkontrolliertem Wachstum führen.

BRAF ist ein essentielles Glied im EGFR-Signaltransduktionsweg. Er leitet Wachstumssignale des EGF-Rezeptors in den Zellkern weiter. Der daueraktivierte EGFR-Transduktionsweg forciert Proliferation, anti-Apoptose, Angiogenese und Metastasierung.

Die MAP-K-Kinase ist eine dualspezifische Kinase, die Proteine an Tyrosin bzw. Threonin-Resten phosphoryliert. ERK1 und 2 (MAP-Kinase) werden durch ihre Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierten ERK1 und 2 gelangen in den Zellkern, wo sie kerneigene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch die Transkription von Zielgenen regulieren. Speziell diese Raf→MEK1/2→ERK1/2-Kaskade ist einer der wichtigsten Signalwege, der zum Überleben des PEC führt. Bei ca. 30 % aller Krebsarten ist dieser hyperaktiv, Mutationen im PEC zeigen sich zu 15 % [73-75].

Der PDGFR ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der auf der Oberfläche vieler epithelialer Zellen zu finden ist. Er reguliert unter anderem Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Zu den aktivierenden Signalwegen gehören MAPK, PI-3-Kinase und  $\gamma$ -Phospholipase [76].

Der VEGFR kann membrangebunden und löslich vorkommen. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Vaskulogenese und ist hauptsächlich in Endothelzellen aufzufinden [77].

### **1.2.2 Signaltransduktion**

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl neuer Mitglieder der Familie der RTK identifiziert und mit der Pathogenese von Tumorerkrankungen in Verbindung

gebracht worden. Obwohl RTK unterschiedliche Zellantworten vermitteln, haben sie alle ein gemeinsames Strukturprinzip. Im inaktiven Zustand liegen die RTK mit Ausnahme der Insulin-Rezeptor Familie primär als Monomer vor [78]. Die Inhibition der Dimerisierung und damit Aktivierung wird durch die Konformation einer Aktivierungsschleife, durch eine juxtamembranäre Domäne (JMD) oder C-terminale Domäne stabilisiert. Die Aktivierung kann in drei Schritte erfolgen [79]:

#### Ligandenbindung

Durch Bindung eines spezifischen Polypeptid-Liganden kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors, welche die Dimerisierung zweier Rezeptormonomere induziert.

#### Dimerisierung

Mit der Dimerisierung einhergehende Konformationsänderung der Aktivierungsschleife wird deren inhibitorische Funktion aufgehoben. Die Dimerisierung kann zwischen zwei identischen oder zwei unterschiedlichen Monomeren einer Rezeptorfamilie erfolgen.

#### Autophosphorylierung

Die Dimerisierung führt zur Aktivierung der enzymatischen Domäne. Die beiden Monomere können sich nun unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) an Tyrosinresten gegenseitig phosphorylieren. Mit den aktivierten Rezeptor verbinden sich nachfolgend eine Reihe von zellulären Proteinen, die wiederum tyrosinphosphoryliert werden und das Aktivierungssignal in den Zellkern weiterleiten, wo eine Änderung der Genexpression induziert wird [80] [78].

Signaltransduktionsmoleküle docken an die zytosolischen Phosphotyrosinreste des aktivierten Rezeptors an. Dies erfolgt mit Hilfe sog. Src-homology 2-Domänen (SH2-Domäne) und Phosphotyrosin Bindungs-Domänen (PTB-Domäne) [81]. Beide Domänen besitzen eine Tasche, welche mit positiven Aminosäuren besetzt ist. Die Variabilität in der Aminosäuresequenz ermöglicht die spezifische Erkennung eines Rezeptors [79]. Signalwege, die durch RTK aktiviert werden sind z.B. der Ras/Raf/MAPK-Weg, der Phospholipase-C-Weg und der PI3K/AKT-Signalweg [70]. Da eine RTK mehrere Substratbindungsmotive besitzt, welche je nach Effektorprotein (SH2-, PTB-Domäne) eine andere

Signalkaskade auslöst und die Effektorproteine wiederum mehrere Bindungsdomänen enthalten, ist eine Fülle von Kombinationsmöglichkeiten gegeben [82, 83].

### **1.2.3 Tumorgenese**

RTK sind ein wichtiger Bestandteil für die interzelluläre Kommunikation. Sie nehmen unter anderem eine zentrale Stellung in der Regulation von zellulären Prozessen wie Gentranskription, Proliferation, Zellstoffwechsel, Differenzierung, Zellmigration und Zellzykluskontrolle ein [71, 84]. Genetische Aberrationen oder Fehlregulationen von Tyrosinkinase und auch Elementen der Signaltransduktionskette führen u.a. zu überschießenden Entzündungsreaktionen, Arteriosklerose, Diabetes wie auch Krebserkrankungen [72]. Tumorzellen können eine Mutation im Bereich des Rezeptorgens aufweisen oder sowohl Rezeptormoleküle als auch korrespondierende Liganden überexprimieren. Die Überexpression spezifischer Rezeptoren wird in zahlreichen Tumoren beobachtet und ist mit einem aggressiveren und prognostisch schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert [85-87]. Im PEC der Kopf-/Hals-Region kann in 90 % der Fälle eine Überexpression um das Drei- bis Achtfache des EGFR nachgewiesen werden [13].

Die Hemmung von pathologisch aktivierten Tyrosinkinase stellt die Grundlage für molekulare Therapieansätze dar. Die Fortleitung mitogener und anti-apoptotischer Signale sowie spezifische Störungen in der Erkennung dieser Signale werden korrigiert, um weiteres Wachstum zu stoppen. Das Ziel ist, eine höhere Spezifität und Selektivität zu erreichen und eine effektive anti-Tumortherapie zu entwickeln, die normale Gewebe weitgehend unbeeinträchtigt lässt.

## **1.3 Tyrosinkinaseinhibitoren**

### **1.3.1 Allgemein**

TKI sind niedermolekulare Substanzen. Sie haben meist mehrere Ziele („*targets*“) in der Signaltransduktion einer Zelle. Hierdurch können sie unter

anderem Wachstum, Zelldifferenzierung und Angiogenese beeinflussen [88]. Aufgrund ihrer Verstoffwechslung und Beeinflussung metabolisierender Enzyme ist eine strenge therapeutische Indikation angezeigt. Die Metabolisierung von TKI erfolgt zum größten Teil über das Cytochrom-P450-Enzym (CYP). Mittels des P-Glykoprotein (P-gp) werden sie als Produkt des multidrug resistance Gens (MDR) aus dem Zellinneren heraustransportiert. Arzneimittelinteraktionen können daher bei gleichzeitiger Gabe von TKI mit anderen Inhibitoren/Induktoren von CYP-Enzymen oder Substraten von P-gp zu erheblichen Komplikationen führen [89].

In den letzten Jahren konnten einige TKI in der Tumorthherapie etabliert werden. Verwendung finden sie in der Therapie von Pankreas-, Mamma-, Nierenzellkarzinom, Weichteilsarkomen, Chronisch myeloischer Leukämie (CML) oder dem malignen Melanom. Bereits als Erstlinientherapie kommt der TKI Imatinib in der Behandlung von CML, mit einer Ansprechrate von bis zu 90 %, zum Einsatz [90, 91]. Weitere TKI, welche gezielt auf die ATP-Bindungsstelle der RTK wirken und damit eine Blockade der stromabwärts gelegenen intrazellulären Signalwege auslösen, sind unter anderem Sorafenib, Sunitinib [92], Vatalanib, Vandetanib und Regorafenib [93].

### **1.3.2 Wirkmechanismus**

TKI binden an einen spezifischen Wachstumsfaktor-Rezeptor und hemmen die enzymatische Aktivität der Tyrosinkinase. Durch die Inhibition wird die Weiterleitung von Wachstumssignalen unterbunden. Man unterscheidet vier verschiedene Mechanismen:

- Kompetitive Bindung an der ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase, d.h. die TKI konkurrieren mit dem Adenosintriphosphat (ATP)
- TKI konkurrieren mit der phosphorylierenden Einheit
- TKI konkurrieren mit dem Substrat
- TKI binden außerhalb des aktiven Zentrums und hemmen durch Konformationsumwandlung allosterisch

## 1.4 Ziel der Arbeit

Da TKI an unterschiedlichen Tyrosinkinasen binden und dadurch verschiedene Signalkaskaden beeinflussen, erscheint eine synergistische Wirkung verschiedener TKIs wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zytotoxische Wirksamkeit von Trametinib, Lapatinib, Dabrafenib und Pazopanib in der Monotherapie wie auch additive bzw. synergistische Effekte in der Kombinationstherapie mit Cisplatin oder 5-FU anhand von *in-vitro*-Untersuchungen an humanen Tumorzelllinien des oralen PEC analysiert. Dies geschah zur Beantwortung folgender Fragen:

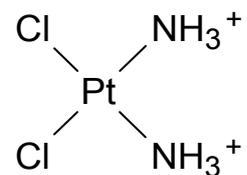
- ⇒ In welchem Konzentrationsbereich wirken die untersuchten TKI anti-proliferativ auf die humanen Tumorzelllinien und wie groß ist die erreichte maximale Zellzahlreduktion in der Monotherapie?
- ⇒ Besteht ein Zusammenhang zwischen der Rezeptorgen-Expression und der Wirksamkeit der TKI?
- ⇒ Gibt es Unterschiede bezüglich der zytotoxischen Wirksamkeit der TKI in der Mono- oder Kombinationstherapie zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien?
- ⇒ Lässt sich durch Kombination von 5-FU bzw. Cisplatin mit den TKI der zytotoxische Effekt auf die Tumorzelllinien steigern? Liegen synergistische, additive oder antagonistische Effekte vor?

## 2 Material und Methode

### 2.1 Zytostatika

#### 2.1.1 Cisplatin

Cisplatin (Cis, cis-Diamindichloroplatin) ist ein zu den Platinverbindungen gehörendes Zytostatikum, das vor allem in der Bekämpfung solider Tumoren Verwendung findet. Seine Wirkung entfaltet es durch Bildung von Platinkomplexen und die dadurch entstehende Querverknüpfungen (cross-linking) zweier benachbarter Guanin-Basen eines DNA-Stranges. Verknüpfungen können innerhalb eines DNA-Stranges oder zwischen benachbarten DNA-Strängen entstehen [94]. Die DNA wird durch diese Strukturänderung gestört und funktionsunfähig. Der Stoffwechsel der Zelle wird gestoppt und die Zelle leitet die Apoptose ein. Des Weiteren löst Cisplatin Punktmutationen aus und hemmt die Telomeraseaktivität und damit die DNA-Reparatur. Ursächlich für Resistenzbildungen sind intrazelluläre Konzentrationen an Glutathion und zahlreiche SH-Gruppen tragende Metallproteine. Cisplatin ist in der Therapie von Hoden-, Bronchial-, Ovarial- und Zervixkarzinomen sowie metastasierenden oder rezidivierenden PEC als wirksame Behandlung etabliert [95, 96].

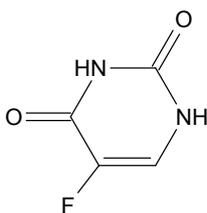


**Abbildung 1:** Strukturformel von Cisplatin ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ) [Eigene Darstellung] [97]

#### 2.1.2 5-Fluorouracil

5-Fluorouracil (2,4-Dihydroxy-5-Fluoropyrimidine) ist ein Zytostatikum, das zur Gruppe der Antimetabolite zählt und ein Pyrimidinanalogon ist. 5-FU ist

strukturell mit der Pyrimidinbase Uracil ähnlich und wird daher an ihrer Stelle in die RNA eingebaut. Außerdem hemmt es das Schlüsselenzym der Pyrimidinbiosynthese, die Thymidilat-Synthase, das zur Hemmung des Zellwachstums in hoch replikativen Zellen führt. Schließlich führt der Zellzyklusarrest zum Einleiten der Apoptose und zum Zelltod. Etwaige Resistenzen gegenüber 5-FU liegt häufig einer erhöhten Aktivität der Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) zugrunde, welche für den Abbau von Pyrimidinbasen verantwortlich ist [98, 99].



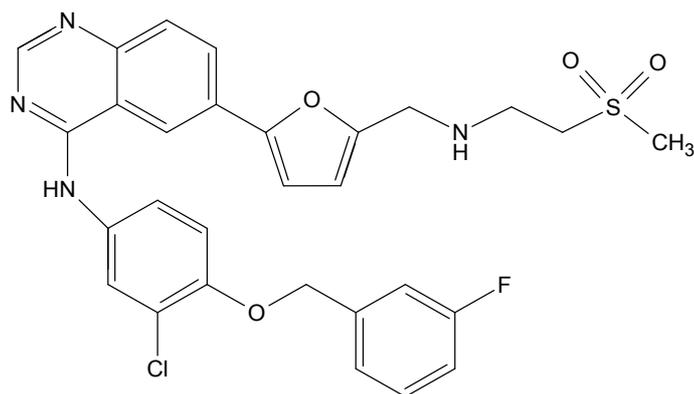
**Abbildung 2:** Strukturformel von 5-Fluorouracil (C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [Eigene Darstellung] [100]

## 2.2 Tyrosinkinaseinhibitoren

### 2.2.1 Lapatinib

Lapatinib (GW572016; GlaxoSmithKline) ist ein 4-Anilinoquinolin-Derivat, welches von GlaxoSmithKline entwickelt wurde und seit Juni 2008 unter dem Handelsnamen Tykerb® (USA) bzw. Tyverb® (EU) in Europa zugelassen ist [101]. Der Wirkstoff Lapatinibditosilat ist ein reversibler, dualer TKI, der sowohl EGFR- (ErbB1) als auch HER2- (ErbB2) Tyrosin-Kinasen durch kompetitive Bindung an der ATP-Bindungsstelle hemmt [102]. Darüber hinaus konnte eine Inhibition der Autophosphorylierung von Erk1/2 und P13/Akt gezeigt werden, welche Effektoren von Proliferation und Überleben der Zelle sind [103]. Lapatinib wird für die Behandlung von Patienten mit Mammakarzinom eingesetzt, wenn eine Überexpression der Rezeptoren Erb1 (EGFR) und Erb2 (HER2) auf der Oberfläche der Tumorzellen nachgewiesen ist. Besonders die Kombination aus Lapatinib mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) oder dem Zytostatikum Capecitabin (Xeloda®) erbrachte

signifikante klinische Vorteile in der Behandlung von Mammakarzinom gegenüber der Monotherapie [104-107]. Dies unterstützt die Hypothese der vorliegenden Arbeit. Zu beobachtende Nebenwirkungen sind unter anderem Hautausschlag, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit, Diarrhö, Leberfunktionsstörungen und Herzrhythmusstörung [108, 109].

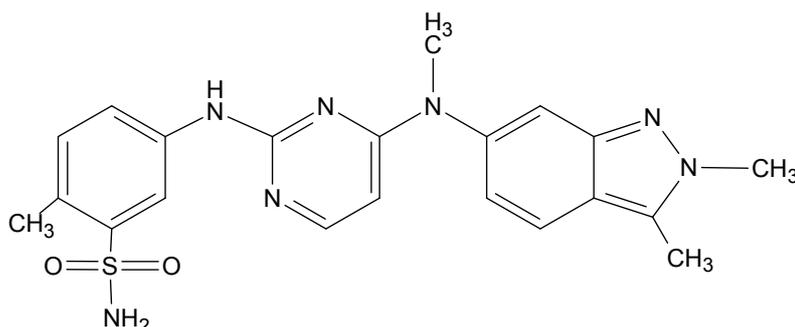


**Abbildung 3:** Strukturformel von Lapatinib (C<sub>41</sub>H<sub>40</sub>ClFN<sub>4</sub>O<sub>11</sub>S<sub>3</sub>) [Eigene Darstellung] [110]

### 2.2.2 Pazopanib

Pazopanib (GW786034B; GlaxoSmithKline) ist ein *multitarget*-TKI, welcher von GlaxoSmithKline entwickelt wurde und im Juli 2013 in Europa unter den Handelsname Votrient® auf den Markt kam [111]. Der Wirkstoff Pazopanib-Hydrochlorid ist ein Indazol-, Pyrimidin- und Benzolsulfonamid-Derivat und blockiert Tyrosinkinasen verschiedener RTK. Zu diesen RTK gehören VEGFR (-1, -2 und -3), PDGFR (-α und -β), fibroblast growth factor receptor (FGFR-1 und -3), Stem cell factor receptor (c-Kit), Interleukin-2 receptor-inducible T-cell kinase (Itk), Transmembrane glycoprotein receptor tyrosine kinase (c-Fms) und Leukocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck). Pazopanib ist seit 2010 als Erstlinientherapie in der Behandlung von fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom (RCC) in Deutschland zugelassen, sowie für Patienten, die zuvor in der RCC-Therapie eine Chemotherapie erhalten haben [112-114]. Ferner wird es als Zweitlinientherapie von Weichteilsarkomen/soft tissue sarcoma (WTS, STS) eingesetzt. Die Verabreichung von Pazopanib ist bei Patienten mit ausgewähl-

ten Subtypen eines fortgeschrittenen Weichteilsarkoms indiziert, die vorher eine Zytokintherapie erhalten haben oder während der ersten 12 Monate nach (neo-) adjuvanter Therapie eine Progredienz aufweisen [115, 116]. Häufig auftretende Nebenwirkungen sind verminderter Appetit, Geschmacksstörungen, Hypertonie, Diarrhö, Übelkeit, Erbrechen, Myokardinfarkte und Leberfunktionsstörungen [117-119].

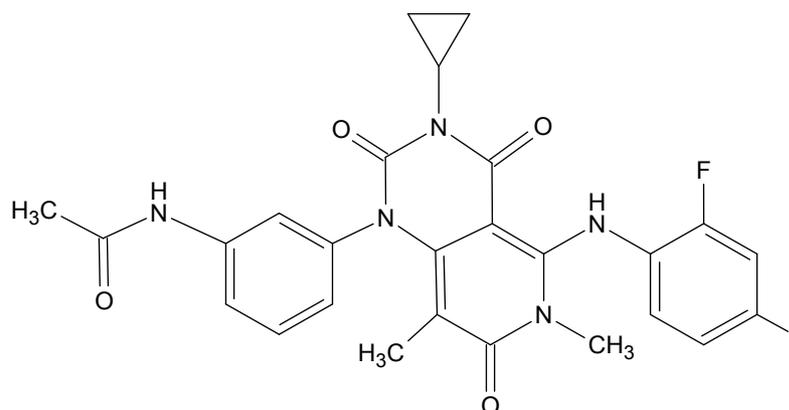


**Abbildung 4:** Strukturformel von Pazopanib (C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S) [Eigene Darstellung] [120]

### 2.2.3 Trametinib

Trametinib (GSK1120212; GlaxoSmithKline) ist ein von der Firma GlaxoSmithKline entwickeltes Pyridin- und Pyrimidin-Derivat, welches im Juni 2014 in der EU unter dem Handelsname Mekinist® eingeführt wurde [121]. Der Wirkstoff Trametinib-Dimethylsulfoxid ist ein reversibler direkter Inhibitor der MEK-Kinase 1 und 2 und verhindert dadurch auch die Aktivierung von MEK durch v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF). Es inhibiert die DNA-Synthese, Signalweiterleitung durch extracellular-signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) sowie stromabwärts gelegene Genexpression durch ERK1/2 und damit weiteres Tumorwachstum in BRAF-/ MEK-mutierten Zellen. Verwendung findet Trametinib in der Therapie von nicht-resezierbaren oder metastasierenden Melanomen mit bestätigter BRAF-V600E- oder V600K-Mutation [122-124]. Im Jahre 2013 fand die Zulassung von Trametinib in der Kombinationstherapie mit Dabrafenib (Tafinlar®) zur Behandlung von BRAF-mutierten metastasierenden Melanomen durch die FDA (Food and Drug Administration) in den USA

statt. Seit 2017 ist die Kombination auch in der Behandlung von metastasierenden nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) mit BRAF-V600E-Mutation zugelassen [125]. Die gleichzeitige Hemmung von BRAF und MEK wird bei Patienten mit metastasierenden Melanomen mit V600-BRAF-Mutation eingesetzt [126]. Diarrhö, Übelkeit, Lymphödem, Hautausschlag, Linksventrikuläre Dysfunktion, Sehstörungen und Pneumonitis können als Nebenwirkungen auftreten [127, 128].



**Abbildung 5:** Strukturformel von Trametinib ( $C_{26}H_{23}FIN_5O_4$ ) [Eigene Darstellung] [129]

#### 2.2.4 Dabrafenib

Dabrafenib (GSK2118436; GlaxoSmithKline) ist ein oral Thiazol- und Pyrimidin-Derivat, welches 2013 in Europa unter dem Handelsname Tafinlar® zugelassen wurde. Der Wirkstoff Dabrafenibmesilat ist ein selektiver, reversibler ATP-kompetitiver BRAF-Kinaseinhibitor und hemmt das mutierte BRAF(BRAF(mut))-Protein mit BRAF(V600E) und BRAF(V600K)-Genotyp [130]. V600E beschreibt den Austausch einer einzelnen Aminosäure an der Position 600 (Valin → Glutaminsäure). Diese Mutation erhöht die Aktivität des Enzyms um einen Faktor 500. Ursache maligner Melanome sind über 50 % auf Mutationen im BRAF-Gen zurück zu führen [131-133]. Durch diese Kodon-600-Mutation im BRAF-Gen gibt BRAF unabhängig von der Aktivierung des EGFR-Signalweges wachstumsfördernde Signale weiter. Diese Signalkaskade wird durch mutiertes

BRAF vom EGFR entkoppelt. Tumoren mit aktivierender BRAF-Mutation können daher nicht mittels antiEGFR therapiert werden. Als Monotherapie findet dieser Dabrafenib Verwendung in der Behandlung von inoperablen oder metastasierenden BRAF-V600-Mutation-positiven Melanomen [134, 135]. In der Kombination mit Trametinib kommt Dabrafenib zur Behandlung von metastasierenden Melanomen mit BRAF-V600E/K-Mutation zum Einsatz. Auch in der Therapie von kolorektalen Tumoren und Lungenkarzinomen wird Dabrafenib eingesetzt [131, 136]. Häufige Nebenwirkungen sind unter anderem Hyperkeratose, Kopfschmerzen, Pyrexie, Desquamation der Haut, Parästhesien und/oder Dysästhesien in den Händen QT-Verlängerung, Arthralgien und Nierenversagen [137-139].

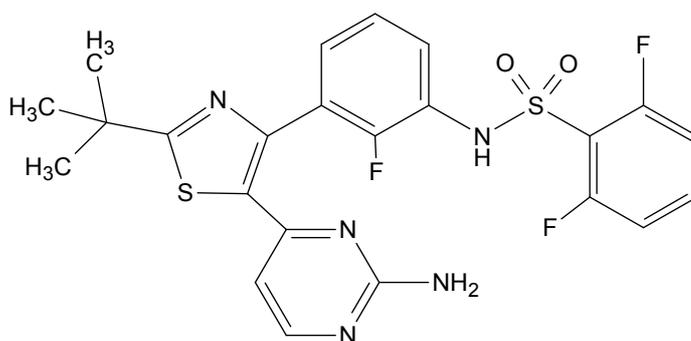


Abbildung 6: Strukturformel von Dabrafenib (C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) [Eigene Darstellung] [140]

## 2.3 Wirkstoffe und Medien

Tabelle 1: Wirkstoffe und Medien

Name	Hersteller	Konzentration
Cisplatin	Teva®	3,33 mM Stocklösung (Infusionslösung); verwendete Konzentration: 400 µM; log <sub>2</sub> -Verdünnungsreihe
5-Fluorouracil	medac GmbH	385 mM Stocklösung (Infusionslösung); verwendete Konzentration: 400 µM; log <sub>2</sub> -Verdünnungsreihe
Lapatinib	GlaxoSmith Kline	MW: 943,477; In Verdünnung mit DMSO; verwendete Konzentration: 200 µM; log <sub>3</sub> -Verdünnungsreihe
Pazopanib	GlaxoSmith Kline	MW: 473,979; In Verdünnung mit DMSO; verwendete Konzentration: 800 µM; log <sub>2</sub> -Verdünnungsreihe
Trametinib	GlaxoSmith Kline	MW: 693,528; In Verdünnung mit DMSO; verwendete Konzentration: 200 µM; log <sub>2</sub> -Verdünnungsreihe
Dabrafenib	GlaxoSmith Kline	MW: 519,562; In Verdünnung mit DMSO; verwendete Konzentration: 600 µM; log <sub>2</sub> -Verdünnungsreihe

Kristallviolett	Roth®	1 g Kristallviolett auf 1 l H <sub>2</sub> O in 20 % Methanol
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Sigma Aldrich®	≥ 99,8 %
Trypsin/ EDTA	Biochrom	0,05 %/ 0,02 % (w/v) in PBS (Phosphate buffered Saline) w/o (without) Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>
Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich®	1 M
DMEM (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium	gibco®	[+] 1 g/L D-Glucose [+] L-Glutamine [-] Pyruvate
DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco®	[-] CaCl <sub>2</sub> [-] MgCl <sub>3</sub>
DMSO [(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO]	gibco®	Dimethyl-Sulphoxide
10 % FCS ≙ FBS	gibco®	Fetal calf serum
1 % PIS	gibco®	10,000 Units/ml Penicillin; 10,000 µg/ml Streptomycin
CASYton®	Schärfe System GmbH	partikelreine, isotonische und isoosmotische Kochsalzlösung
QuantiTect Primer	QIAGEN®	Die Sequenzen, der von QIAGEN® gewerblich erhältlichen Primern, wurden nicht angegeben.
RW1 Puffer	QIAGEN®	→ Die Abkürzungen der Puffer RW1 und RPE aus dem RNeasy-Kit® der Firma QIAGEN® stammen vom Hersteller. Bezüglich der genauen Zusammensetzung können keine Angaben gemacht werden.
RPE Puffer	QIAGEN®	
RLT Puffer	QIAGEN®	
DEPC-Wasser (Diethyl pyrocarbonate)	Sigma Aldrich®	1 ml ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, 12 h bei 37 °C und anschließend autoklavieren
gDNA Wipeout Puffer	QIAGEN®	100 µl 7x
Reverse Transkriptase	QIAGEN®	10 µl
RT Puffer	QIAGEN®	200 µl 5x
RT Primer Mix	QIAGEN®	50 µl
RNase-freies Wasser	QIAGEN®	1,9 ml, 2 ml
QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix	QIAGEN®	1 ml 2x

R- und F-Primer (10 µM) β-Actin	QIAGEN®	Je 1 µl
---------------------------------	---------	---------

## 2.4 Geräte und Software

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Hersteller
Zellzähler-CASY®	Schärfe System GmbH; Wellenlänge: 595 nm; Schütteln: 5sec
Brutschrank	Thermo Scientific™ 5 % CO <sub>2</sub> , 37°C
Photometer Rainbow	Tecan® SPECTRAFluor Microplate Reader
ND-2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
CFX96 Touch™ Deepwell Real-Time PCR Detection System	Bio Rad, München, Deutschland

Tabelle 3: Software

Hersteller und Softwarename
RdrOle Software 4.50
Microsoft® Excel 2013
MEDAS® (Fa. Grund, Margetshöchheim)

## 2.5 Zelllinien und Zellkulturen

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- **PC 1-1:** Diese Zelllinie stammt von einem Kehlkopfkarcinom der Stimmritze eines männlichen Patienten (pT2N0M0G2).
- **PC 13-1:** Diese Zelllinie stammt von einem männlichen Patienten, der unter einem oralen Plattenepithelkarzinom des retromolaren Dreiecks litt (pT4pN1M0G3).
- **PC 52:** Diese Zelllinie hat ihren Ursprung im Primärkarzinom der aryepiglottischen Falte eines männlichen Patienten (pT2N0M0G2).
- **SCC 9:** Diese Zelllinie wurde aus einem Primärkarzinom an der Basis der Zunge eines männlichen Patienten etabliert (pT4N3M0G2).
- **SCC 68:** Diese Zelllinie wurde aus einem Primärkarzinom der Zunge eines männlichen Patienten entnommen (pT4N0M0G1).

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle genannten Zelllinien wurden in DMEM bei einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>/ 95 % Luft bei 37 °C kultiviert. Der Mediumwechsel

erfolgte zwei- bis dreimal in der Woche. Zur Zellpassage fand zunächst die Waschung mit DPBS statt. Anschließend wurden diese für 15 Minuten mit 0,05 % Trypsin/EDTA 0,02 % (3 ml pro Zellkultur) bei 37 °C inkubiert. Hierdurch wurden die adhärenen Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Durch Entnahme der Zellkulturen aus dem Brutschrank und Zugabe von DMEM (7 ml pro Zellkultur) wurde der Trypsinisierungsvorgang gestoppt.

## 2.6 Versuchsaufbau und Durchführung

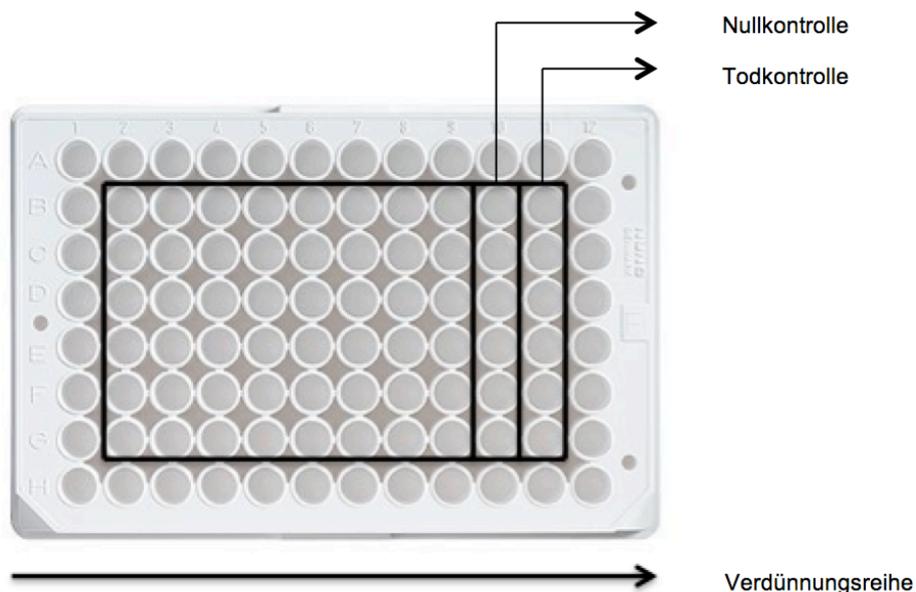
Für alle fünf Zelllinien wurde der Einfluss von Trametinib, Lapatinib, Dabrafenib, Pazopanib und in Kombination mit Cisplatin und 5-FU hinsichtlich der daraus resultierenden relativen Zellzahl untersucht. In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Bestimmung des zytotoxischen Potentials und der mittleren Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) von Cisplatin, 5-FU und der vier untersuchten TKI an allen Zelllinien. In den Versuchen der Kombinationstherapie sollte die Interaktion von 5-FU und Cisplatin mit den jeweiligen TKI untersucht werden, um synergistische oder antagonistische Effekte zu erörtern. Verwendung fanden die laboreigenen  $IC_{50}$ -Werte von 5-FU und Cisplatin.

### a) Aussaat der Zellen

Nach Absaugen des Nährmediums aus den Zellkulturflaschen erfolgte die Waschung der Zellen mit 10 ml DPBS. Das Ablösen der Zellen zur Passage ist unter 2.5 beschrieben. Die Ermittlung der Zellzahl fand mittels CASY-Zellzähler statt. Dafür wurden 10 µl der jeweiligen Zelllösung mit 10 ml CASYton® (isotonischer Kochsalzlösung) vermischt. Nach Berechnung der benötigten Menge an Zellsuspension wurde die Suspension in 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunclon Delta Surface nunc®) übertragen, sodass jedes well 100 µl (=  $10^4$  Zellen) enthielt. Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, erfolgte die Aussaat in DMEM mit anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C.

## b) Vorbereitung der 96-Well-Mikrotiterplatten

Vor Bestückung der Zelllinien mit den Substanzen erhielt jedes *well* 100  $\mu$ l DMEM. Die Spalte 11 diente als Todkontrolle. Das enthaltene Medium aus dieser Spalte wurde entfernt und durch 100  $\mu$ l Hydrochloricacid (1mol/l) in DMEM (1:2) pro *well* ersetzt, welches die Zellmembran zerstört und so die Zellen abtötet. Diese sogenannte Todkontrolle wurde zur Berechnung der Mittelwerte herangezogen. Die Spalte 10 stellte die Null-Spalte dar. In allen Versuchsreihen war die Vorbereitung der 96-Well-Mikrotiterplatten gleich. Wie in Abb. 8 dargestellt erfolgte eine  $\log_2$ -Verdünnungsreihe beginnend in Spalte 2 von links nach rechts. Die Spalten 1 und 12, sowie die Reihen A und H sind in den Versuchsaufbau nicht miteinbezogen um Verfälschungen durch Verdunstung im Inkubator zu reduzieren. Sie enthielten eine reine Zell-Medium-Suspension.



**Abbildung 7:** Belegungsschema einer 96-Well-Mikrotiterplatte (transparent) in den Monotherapieversuchen:

(Spalte 2-9) Tumorzellen + TKI/CIS/5-FU Verdünnungsreihe, (Spalte 10) Medium + Tumorzellen, (Spalte 11) Hydrochloricacid + Tumorzellen. Außerhalb des Vierecks liegende *wells* werden in den Versuch nicht miteinbezogen: (Spalte 1) und (Spalte 12) Medium + Tumorzellen. [Eigene Darstellung]

c) Bestückung mit Cisplatin und 5-FU

Cisplatin und 5-FU lagen nach Verdünnung mit DMEM in einer Konzentration von 400 µM vor. Von der jeweiligen Lösung wurden 200 µl/well in Spalte 2 jeder Mikrotiterplatte gefüllt. Die Verdünnungsreihe für Cisplatin und 5-FU erfolgte in log2. Die Übertragung von 100 µl aus Spalte 2 in Spalte 3 verlief kontinuierlich bis einschließlich Spalte 9. Die in Spalte 9 entnommenen 100 µl Lösung wurden verworfen. Anschließend erfolgte die Inkubation über drei Tage bei 37°C.

d) IC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin und 5-FU der jeweiligen Zelllinie

Wie in Tab. 4 dargestellt gibt es für jede Zelllinie einen spezifischen IC<sub>50</sub>-Wert von Cisplatin und 5-FU. Für die mathematische Berechnung fand das Programm MEDAS® Verwendung. Für die darauf aufbauenden Kombinationsversuche wurden die laboreigenen IC<sub>50</sub> herangezogen.

**Tabelle 4:** Laboreigene IC<sub>50</sub> von 5-FU und Cisplatin für die jeweiligen Zelllinien

IC <sub>50</sub> von 5-FU für		IC <sub>50</sub> von Cisplatin für	
PC 1-1	10 µM	PC1-1	01 µM
PC 13	20 µM	PC13	01 µM
PC 52	10 µM	PC52	05 µM
SCC 9	20 µM	SCC9	14 µM
SCC 68	10 µM	SCC68	14 µM

e) Vorbereitung der TKI

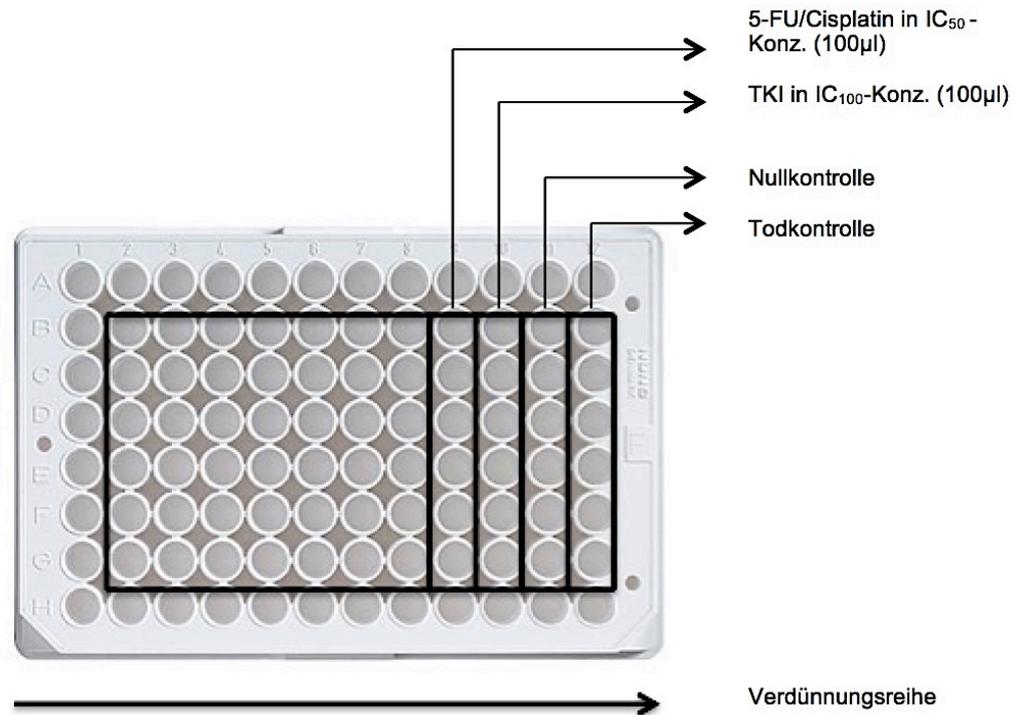
Die in Pulverform befindlichen TKI wurden mit DMSO in Lösung auf eine Konzentration von 10 mM gebracht und weiter mittels DMEM auf die in Tab. 5 dargestellten Werte verdünnt. Der Versuchsaufbau entsprach dem von Cisplatin und 5-FU mit variierenden Verdünnungslogarithmen. Jede Mikrotiterplatte erfasste zwei Mess-Serien. Die Reihen B, C und D, sowie E, F und G enthielten jeweils ein Medikament.

**Tabelle 5:** Verwendete Konzentration und Verdünnungs-Logarithmen der verschiedenen TKI

TKI	Konzentration	Verdünnungsreihe
Lapatinib	200 $\mu$ M	log3
Pazopanib	800 $\mu$ M	log2
Trametinib	200 $\mu$ M	log2
Dabrafenib	600 $\mu$ M	log2

f) Kombination der TKI mit Cisplatin und 5-FU

Zeile A und H, sowie Spalte 1 waren in den Versuch nicht miteinbezogen um Verfälschungen, wie z.B. durch Verdunstung während der Inkubation, zu reduzieren. Aus den restlichen *wells* wurde das Medium mit einer Pipette abgesaugt. Spalte 12 stellte die Todkontrolle dar. Als Referenz diente die Nullkontrolle in Spalte 11. Die reinen TKI in jeweiliger Konzentration lagen in Spalte 10 vor. Spalte 2 beinhaltete 200  $\mu$ l der Suspension, bestehend aus  $IC_{50}$ -Konzentration von Cisplatin bzw. 5-FU mit DMEM und TKI, in jeweiliger Ausgangskonzentration. In allen weiteren Spalten befand sich die Zelllinien-spezifische  $IC_{50}$ -Lösung von Cisplatin bzw. 5-FU. Wie in Abb. 8 dargestellt erfolgte die Verdünnungsreihe in entsprechendem Logarithmus bis einschließlich Spalte 8.



**Abbildung 8:** Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte (transparent) in den Kombinationstherapieversuchen:

(Spalte 2-8) Tumorzellen + TKI Verdünnungsreihe+ Cis/5FU in  $IC_{50}$ -Konz., (Spalte 9) Tumorzellen +  $IC_{50}$  Cis/5FU, (Spalte 10) Tumorzellen + TKI, (Spalte 11) Medium + Tumorzellen, (Spalte 12) Hydrochloricacid + Tumorzellen. Außerhalb des Vierecks liegende *wells* werden in den Versuch nicht miteinbezogen: (Spalte 1) Medium + Tumorzellen. [Eigene Darstellung]

### g) Kristallviolett-Test und Auswertung

Mittels Kristallviolett konnte der Einfluss der Substanzen auf die Zellproliferation sichtbar gemacht werden. Nach 72-stündiger Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Mono- wie auch Kombinationstherapien, erfolgte der Kristallviolett-Test. Hierzu wurden die Zellen mit 50 µl Kristallviolett pro *well* versehen. Nach 15-minütiger Einwirkzeit fand die Waschung der Platten mit destilliertem Wasser statt. Bei Raumtemperatur trockneten die Platten über 24 Stunden. Für die folgende Auswertung wurde jedes *well* mit 100 µl Methanol bestückt. Dadurch löste sich der an Proteinen gebundene Farbstoff. Die optische Dichte wurde nach gründlicher Aufmischung (5 sec) der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm am *Plate reader (SLT Rainbow)* gemessen. Die ermittelten Extinktionswerte übertrug die *RdrOle-Software* in *Excel (Microsoft®)*. Hier fand die weitere Bearbeitung mittels einer standar-

disierten Rechenmatrix (Sheet) statt. Aus den sechs Zeilen (Mess-Serien) ergaben sich entsprechende Mittelwerte, welche in Prozent relativ zur unbehandelten Nullkontrolle (100 %-Marke) gesetzt wurden. Die Mittelwerte der Todkontrolle fungierten als Background-Kontrolle und wurden von diesen abgezogen. Der daraus resultierende prozentuale Anteil überlebender Tumorzellen wurde gegen die Konzentration der verschiedenen TKI aufgetragen und graphisch als Inhibitionskurve dargestellt.

## 2.7 Expressionsanalyse relevanter Rezeptor-Gene

### 2.7.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe der semiquantitativen Real-Time-PCR die Expression nachfolgender Gene in den fünf genannten Zelllinien analysiert:

BRAF600

---

VEGFR (1, 2, 3)

---

FGFR (1, 2, 3, 4)

---

PDGFR ( $\alpha$ ,  $\beta$ )

---

c-FMS

---

c-Kit

---

MAPK (1,2)

---

EGFR (ErbB1)

#### 2.7.1.1 RNeasy-Kit

Alle fünf Zelllinien wurden in DMEM bei einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>/ 95 % Luft bei 37 °C kultiviert. Zur Zellpassage wurden die adhärenen Zellen mit 0,05 % Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) gelöst und in Eppendorf Tubes® 1,5 ml (E-Cups) übertragen. Bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (PCF) von 13,2 wurde die Zellsuspension 1 Min. zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde durch Absaugen von dem Zellpellet entfernt.

Für die Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) fand die Aufbereitung mittels RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) Verwendung. Zur Homogenisierung des Zellpellets wurden dafür zunächst 350 µl RLT-Puffer mit einer Einmalspritze hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch mit 350µl Ethanol (70 %) versehen und in einer RNeasy® Spinsäule (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) 30 Sekunden zentrifugiert. Das im Sammelröhrchen befindliche Filtrat wurde verworfen. Die Filtermembran wurde mit der an ihr gebundenen RNA zunächst mit 700 µl RW1-Puffer (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) und dann mit 500 µl RPE-Puffer (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) versehen und je 30 Sekunden zentrifugiert. Die letzte Waschung erfolgte erneut mit 500 µl RPE-Puffer und wurde für 2 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde die RNA für 1 Minute mit 25 µl RNase-freiem Wasser in ein RNase-freies Eppendorfgefäß eluiert. Die Eppendorf Tubes® enthielten dann 25 µl mit der RNA der Zelllinien beinhaltendem Wasser. Die Konzentrationsmessung der RNA wird mit einem ND-2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bei 260 nm durchgeführt.

#### **2.7.1.2 Reverse Transkription**

Vor der Durchführung der PCR muss mit einer reversen Transkriptase die RNA in cDNA transkribiert werden. Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transcription-Kit (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) durchgeführt. Hierfür wurde 1 µg der RNA in 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Zur Homogenisierung wurden 2 µl gDNA Wipeout-Puffer (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) hinzugegeben und für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Jedes Eppendorf Tube® wurde mit 1 µl reverse Transkriptase, 1 µl RT-Primer-Mix und 4 µl RT-Puffer (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) versehen. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 15 Minuten bei 42 °C. Durch dreiminütiges Erhitzen auf 95 °C wird die reverse Transkription gestoppt. Um das Gemisch an der Unterseite der Eppendorf Tubes® zu kondensieren wurden die Proben bei 4 °C und 9 PCF zentrifugiert.

### 2.7.1.3 Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der quantitative Nachweis der über die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion ausgedrückt wird (qRT-PCR) wurde mit Hilfe des CFX96 Touch™ Deepwell Real-Time PCR Detection System (Bio Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Die Verstärkung erfolgte mittels QuantiTect® SYBR® Green-PCR-Kits (QIAGEN®, Venlo, Niederlande).

### 2.7.1.4 Quantitative Genexpression

Um einen relativen quantitativen Vergleich der verschiedenen Rezeptor-Expressionen zu ermöglichen, wurde die mRNA von  $\beta$ -Actin als Standardgen („Housekeeping-Gen“) zusätzlich zum zu untersuchenden Gen revers transkribiert und anschließend in der PCR coamplifiziert. Unter gegebenen optimalen Bedingungen sind alle Genexpressionen in einem funktionellen Bereich, sodass der relative Prozentsatz der spezifischen Expression wie folgt berechnet werden konnte:

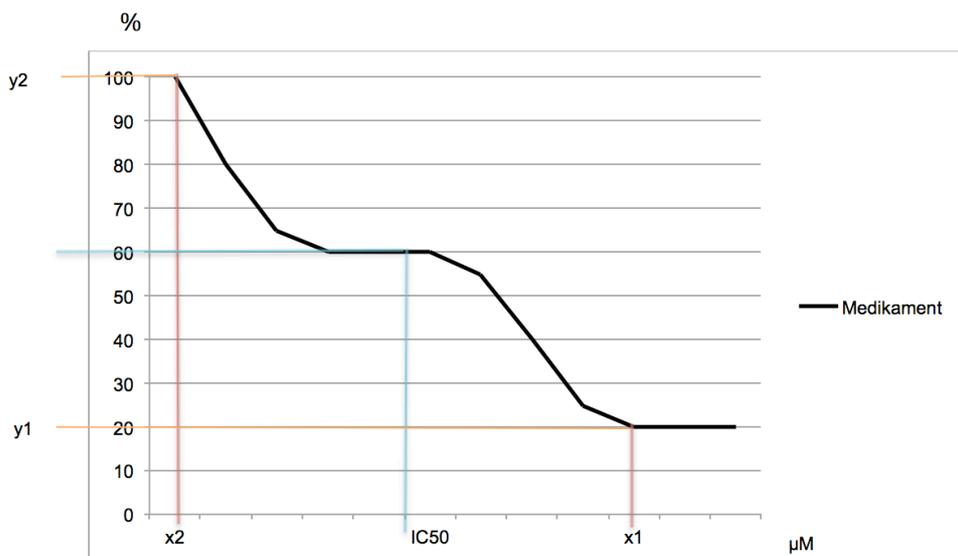
$$X/Y \times 100\% = \text{normierte zielspezifische Genexpression [\%]}$$

X = spezifische Rezeptor-Genexpression; Y = „Housekeeping-Gen“-Expression

## 2.8 Statistische Methoden

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) sowie die graphische Darstellung der Daten erfolgte durch *Excel* (Microsoft®). Die Auswertung und Analyse der Daten erfolgte mittels des Statistikprogramms MEDAS® (Grund EDV-Systeme, Margetshöchheim). Insgesamt sind für die statistische Auswertung 90 Mess-Serien entstanden.

Die  $IC_{50}$ -Werte wurden zum einen graphisch durch Fällung eines Lotes aus den Dosiswirkungskurven, zum anderen mathematische mittels MEDAS® (Grund EDV-Systeme, Margetshöchheim) ermittelt. Dabei wurde als Untergrenze ( $y_1$ ) die jeweils niedrigste Zellzahlkonzentration gewählt. Die Obergrenze ( $y_2$ ) stellte bei allen Messungen die 100 %-Linie dar. Anhand von  $y_1$  und  $y_2$  wurden die zugehörige Dosis  $x_1$  und  $x_2$  bestimmt und logarithmiert, sowie linear interpoliert. Da eine logarithmische Verdünnungsreihe vorliegt, wurden die drei gleichen Messungen geometrische gemittelt.



**Abbildung 9:** Graphische Darstellung der Bestimmung von  $IC_{50}$  [Eigene Darstellung]

Zur Beschreibung der Ergebnisse dieser prospektiven, deskriptiv projizierten Studie wurden folgende Tests verwendet:

Um den Einfluss der Mono- und Kombinationstherapie auf die fünf verschiedenen Tumorzelllinien anhand der Zellzahl zu untersuchen, wurde die mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA,  $p_{ANOVA}$ ) durchgeführt. Darstellung der Signifikanz zwischen der Mono- und Kombinationstherapie ergab sich aus der Berechnung des  $p_{PS}$ -Werts. Die zweifaktorielle Rangvarianzanalyse mit Messwiederholungen auf einem Faktor nach Puri und Sen ( $p_{PS}$ ) dient zum Test einer Messreihe, wenn die Proben zusätzlich in Gruppen eingeteilt sind, hier in Zelllinien oder Monoversuch und Kombinationsversuch. Diese Analyse setzt keine Gaußverteilung voraus. Wenn eine Gauß'sche Normalverteilung angenommen werden kann, wird stattdessen die zweifaktorielle Varianzanalyse ( $p_{ANOVA}$ ) ausgewertet. Wegen der geringen Fallzahl ist  $p_{PS}$  nicht sehr aussagekräftig, weshalb auch  $p_{ANOVA}$  berechnet und bei der Auswertung beachtet wurde. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus in den paarweisen Tests kam der t-Test ( $p_t$ ) zu tragen. Da der mächtigere unverbundene t-Test ( $p_t$ ) nur Verwendung findet, wenn eine Gauß'sche Normalverteilung der Messwerte angenommen werden kann, wurde zusätzlich der U-Test durchgeführt und in der Auswertung berücksichtigt. Der U-Test nach Mann und Whitney ( $p_U$ ) setzt keine Gauß'sche Normalverteilung der Messwerte voraus. Für die Untersuchung auf

eine Gauß'sche Normalverteilung fand die Probitdarstellung mit den Grenzen nach *Lillefors* Verwendung.

Um die Testergebnisse quantitativ vergleichen zu können, berechnete man p-Werte ( $p = \text{probability}$ ). Jeder dieser Tests lieferte einen p-Wert, den man an einer Signifikanzschranke gemessen hat. Ein p-Wert unter 0,05 wird als signifikant bezeichnet und das Ergebnis wird als wesentlich interpretiert. Die p-Werte werden mit Stern-Symbolen gekennzeichnet. Werte mit  $p \leq 0,05$  werden als signifikant beschrieben (\*). Liegen die Werte für  $p$  bei  $\leq 0,01$ , ist das Ergebnis sehr signifikant (\*\*). Ein Ergebnis wird als hoch signifikant angesehen, wenn sich p-Werte von  $\leq 0,001$  ergeben (\*\*\*).

Die p-Werte in deskriptiven Statistiken repräsentieren keine Irrtumswahrscheinlichkeiten, da es sich dann nicht um eine geplante prospektive Studie mit einer zu beweisenden Hypothese handelt, sondern sie dienen zur Bewertung und zum Gegenüberstellung der verschiedenen Testergebnisse. Die Bezeichnung „*signifikant*“ wird im statistischen Kontext reserviert, um Testergebnisse mit p-Werten unter 0,05 zu beschreiben.

Um die resultierenden Effekte der Kombinationstherapie von 5-FU bzw. Cisplatin und TKI festzulegen fand der Kombinationsindex K Verwendung. Aus allen Versuchen wurden die  $IC_{50}$ -Werte der Mittelwerte mit Hilfe von MEDAS® bestimmt und letztendlich aus den gemittelten  $IC_{50}$ -Werten der Monotherapie und der Kombination der Kombinationsindex berechnet. Anhand davon konnte eine Aussage über den resultierenden Effekt der Kombinationstherapie gemacht werden.

Die Auswahl der statistischen Tests und Durchführung wurde von Frau Dr. I. Haubitz beraten und unterstützt.

**Kombinationsindex  $K = IC_{50}[\text{Kombination}] / IC_{50}[\text{Monotherapie}]$  [141, 142]**

- K=1            Additiver Effekt
- K>1            Antagonistischer Effekt
- K<1            Synergistischer (super-additiver) Effekt

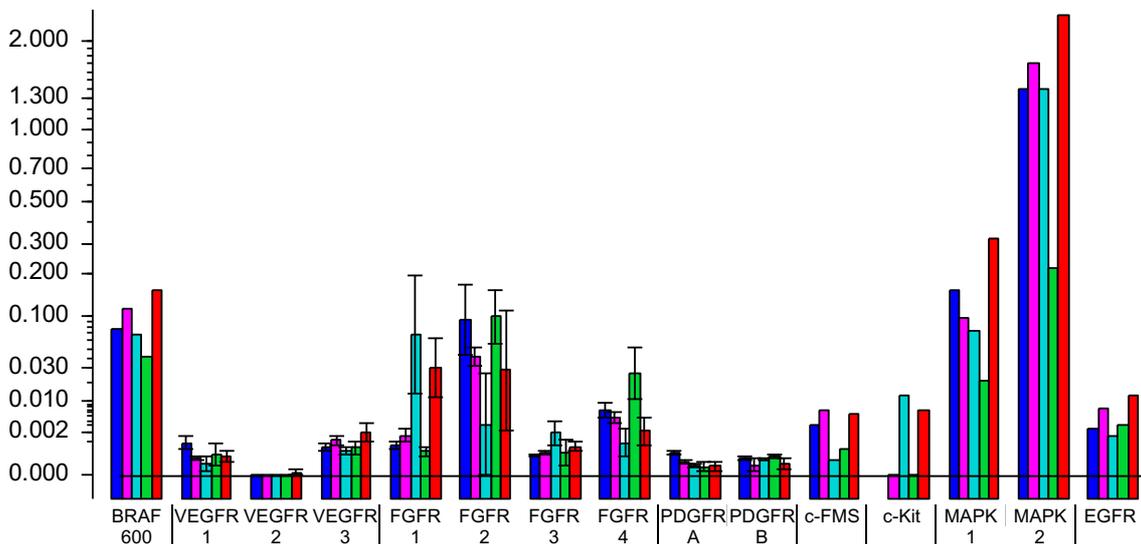
Eine Tabelle über die Charakterisierung der Interaktion abhängig vom Kombinationsindex K, modifiziert nach Chou, ist im Anhang wiederzufinden.

### 3 Ergebnisse

Die untersuchten TKI inhibieren unterschiedliche Tyrosinkinassen. Mittels Real-Time-PCR konnte das Vorkommen der verschiedenen Kinasen in den fünf humanen Tumorzelllinien des PEC nachgewiesen werden. Um das jeweilige zytotoxische Potential der einzelnen TKI und der Zytostatika Cisplatin und 5-FU zu ermitteln, wurden die Zelllinien mit den entsprechenden Substanzen in Mikrotiterplatten über 72h behandelt. Durch photometrische Messung der Zellzahl analysierte man die antiproliferative Wirksamkeit und errechnete den für jede Tumorzelllinie spezifischen  $IC_{50}$ -Wert.

#### 3.1 Übersicht der Rezeptorexpression

Die ermittelten Werte sind Prozent-Werte gemessen an  $\beta$ -Actin als 100%-Marke. In Tab. 8 sind die zugehörigen Grenzwerte und entsprechende Interpretationen angegeben.



Mittelwert mit Standardabweichung des Mittelwertes ( $s_{em}$ ), aufgeteilt nach Zelllinien. ■ = PC1, ■ = PC13, ■ = PC52, ■ = SCC 9, ■ = SCC68. n = 2 pro Zell-Line VEGFR, FGFR, PDGFR und n = 1 für alle anderen. Die y-Achse ist mit der Kubikwurzel transformiert.

**Abbildung 10:** Darstellung der mittels PCR nachgewiesenen Rezeptor-Expressionen

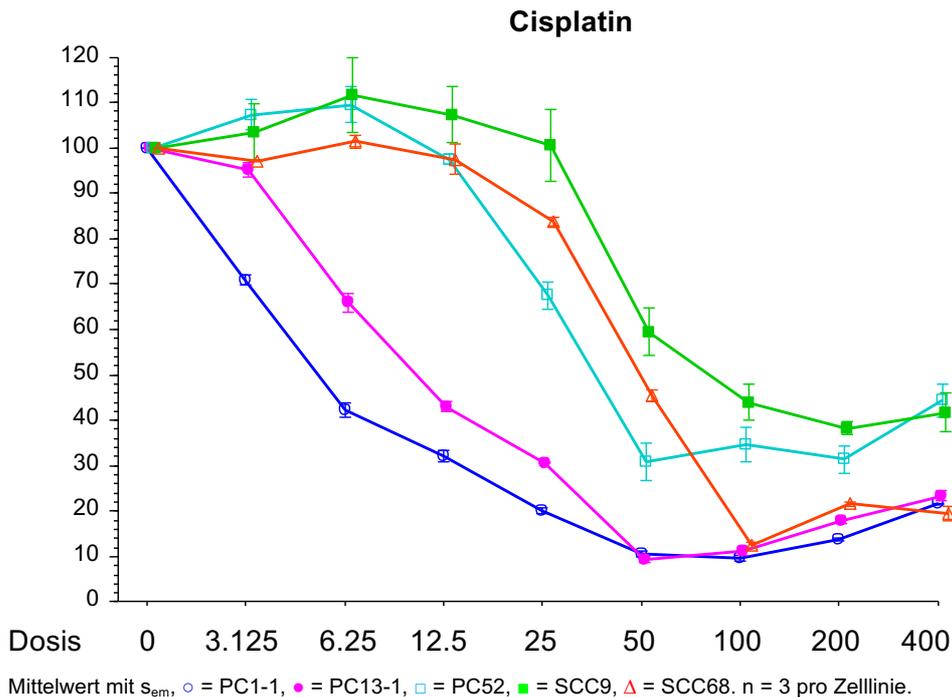
Tabelle 6: Grenzwerte der Gen-Expression

Beschreibung	Grenzwerte
Sehr stark	> 0,1
Stark	0,01 - 0,09
Mittel	0,001 - 0,009
Schwach	≤ 0,0009

### 3.2 Untersuchung der antiproliferativen Aktivität von Cisplatin und 5-FU

Für Cisplatin und 5-Fluorouracil konnten bei allen fünf Tumorzelllinien eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Zellwachstums mit einem sigmoiden Kurvenverlauf gezeigt werden (Abb. 11). Sowohl für Cisplatin, wie auch in der Monotherapie mit 5-FU, wurde bei allen Zelllinien dosisabhängig ein hoch signifikantes Ansprechverhalten beobachtet ( $p < 0,1$ ) (Tab.11).

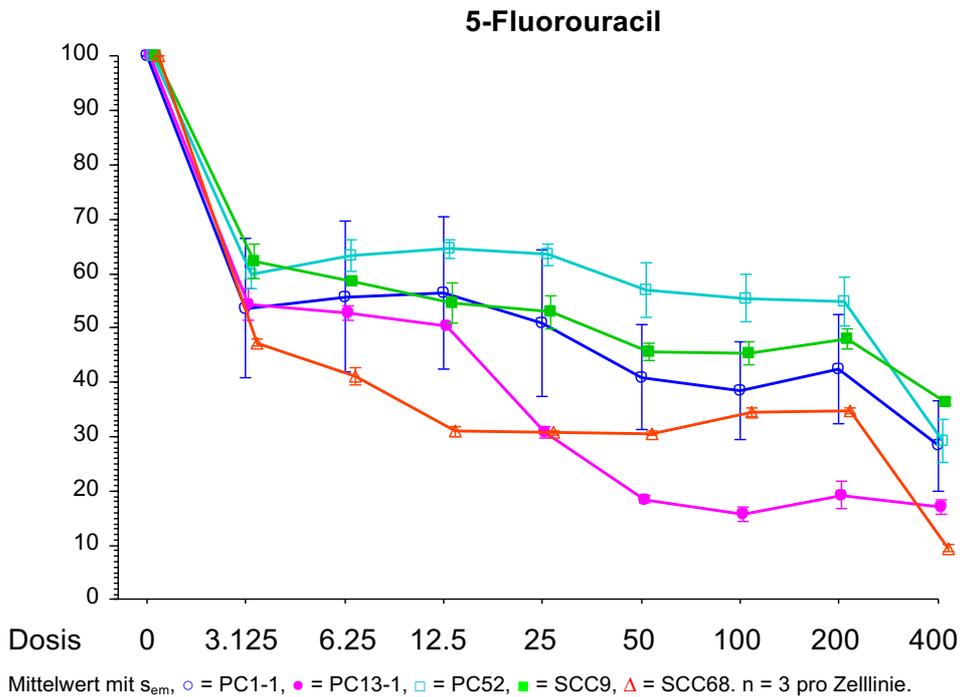
Mit einer maximalen Zellzahlreduktion auf  $9,649 \pm 0,977$  % und  $9,295 \pm 1,204$  % zeigten die Zelllinien PC1-1 und PC13-1 ein ähnlich sensibles Ansprechverhalten gegenüber Cisplatin. Die errechneten  $IC_{50}$ -Werte lagen bei  $4,617 \pm 1,046$   $\mu$ M und  $8,757 \pm 1,052$   $\mu$ M. Eine vergleichbare maximale Reduktion der Zellzahl zeigte die Zelllinie SCC68. Hier erreichte man bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M  $12,423 \pm 1,105$  % der Ausgangszellzahl. Die mittlere inhibitorische Konzentration von  $41,195 \pm 1,031$   $\mu$ M ergab bei der Zelllinie SCC68 eine Zellreduktion auf  $56,21 \pm 0,553$  % der Ausgangszellzahl. Im Ansprechverhalten ähnlich verhielten sich die Tumorzelllinien PC52 und SCC9, die einen  $IC_{50}$ -Wert von  $25,744 \pm 1,155$   $\mu$ M und  $42,385 \pm 1,143$   $\mu$ M, sowie eine maximale Zellzahlreduktion auf  $30,832 \pm 6,976$  % und  $38,289 \pm 2,385$  % zeigten.



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Cisplatin auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 400 µM (log2).

Wohingegen die einzelnen Zelllinien bei Bestückung mit 5-FU wie in Abb. 12 ersichtlich eine viel höhere Sensitivität zeigen als mit Cisplatin. Bei der Inkubation mit hohen 5-FU-Konzentrationen erwies sich die Zelllinie SCC68 als sehr sensibel und zeigt eine maximale Zellzahlreduktion auf  $9,494 \pm 1,025$  % wie eine  $IC_{50}$  von  $<3,125^*$  - µM. Die Tumorzelllinien PC13-1 und SCC9 zeigten sich ähnlich sensibel gegenüber 5-FU. Vergleichsweise geringe Konzentrationen von 3,125 µM ergaben eine Zellreduktion bei PC13-1 auf  $54,351 \pm 4,996$  %. Auch bei Zelllinie SCC9 ermittelte man einen Wert von  $54,651 \pm 6,404$  % im Bereich von 12,5 µM. Der  $IC_{50}$ -Wert von PC13-1 liegt im Bereich  $<3,311^*$  - µM und von SCC9 im Bereich  $<3,125^*$  - µM. Das zytotoxische Potential von 5-FU war in den Zelllinien PC1-1 und PC52 vergleichbar schwach ausgebildet. Die errechneten  $IC_{50}$ -Werte betragen  $<6,712^*$  - µM und  $<5,869^*$  - µM mit einer maximalen Zellreduktion auf  $28,377 \pm 14,486$  % und  $29,163 \pm 6,762$  %.

\*Für Versuche, in denen die ermittelte  $IC_{50}$  kleiner als die Konzentration am ersten Messpunkt ist wurde der Wert  $<3,125$  µM eingesetzt und daraus mit den restlichen Werten das geometrische Mittel berechnet.



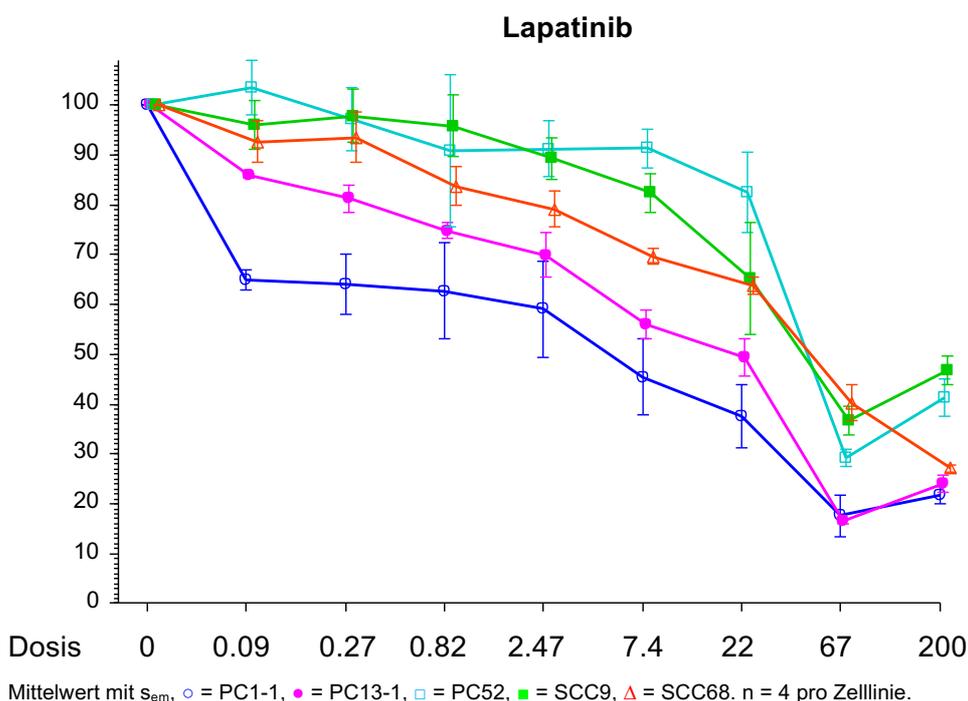
**Abbildung 12:** Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von 5-FU auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 400  $\mu\text{M}$  ( $\log_2$ ).

### 3.3 Untersuchung der antiproliferativen Aktivität verschiedener Tyrosinkinase-Inhibitoren

#### 3.3.1 Wirksamkeit von Lapatinib

Hinsichtlich ihrer Interaktion zeigten die fünf Zelllinien nach Inkubation mit Lapatinib hochsignifikante konzentrationsabhängige Unterschiede in der Inhibierung des Zellwachstums ( $p < 0,01$ ) (Tab. 11). Mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1,125 \pm 5,423 \mu\text{M}$  und einer maximalen Zellzahlreduktion auf  $17,644 \pm 7,146 \%$  stellten sich die Tumorzelllinie PC1-1 als besonders sensibel auf Lapatinib dar. Ähnliche Zellreduktion konnte der TKI Lapatinib auch in der Zelllinie PC13-1 mit  $16,461 \pm 0,788 \%$  erreichen ( $\text{IC}_{50} = 6,891 \pm 1,911 \mu\text{M}$ ). Die Tumorzelllinie PC52 benötigte mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von  $31,366 \pm 1,194 \mu\text{M}$  eine über vierfach höhere Konzentration an Lapatinib um gleiche zytotoxische Effekte zu zeigen. Abb. 13 stellt einen starken Abfall der Zellzahl in PC52

erst ab einer Konzentration von  $>22,22 \mu\text{M}$  dar. Die Zungenkarzinomzelllinien SCC9 und SCC68 reagierten ähnlich sensibel auf Lapatinib. Es konnte eine mittlere inhibitorische Konzentration von  $18,559 \pm 1,674 \mu\text{M}$  und  $20,546 \pm 1,343 \mu\text{M}$  errechnet werden. Die maximale Zellzahlreduktion liegt hier im Bereich von  $36,826 \pm 4,930 \%$  und  $27,123 \pm 1,257 \%$ . Bei hoher Konzentration kann das Medikament teilweise noch in kristalliner Form vorliegen, was den Wiederanstieg der Dosiswirkungskurven bei  $200 \mu\text{M}$  erklärt.

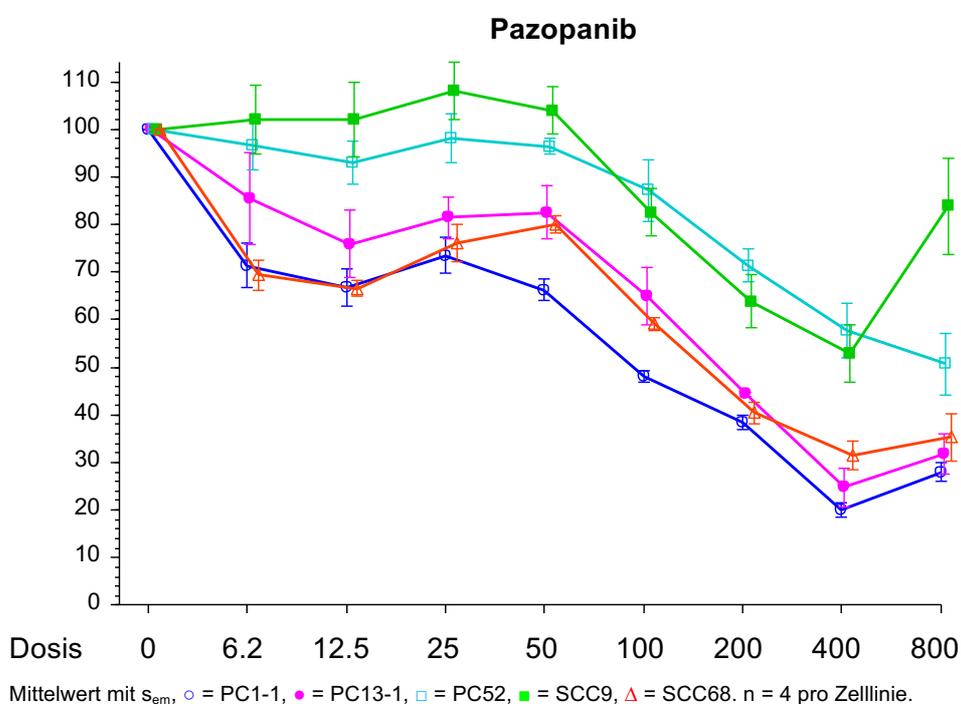


**Abbildung 13:** Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Lapatinib auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von  $200 \mu\text{M}$  ( $\log_3$ ).

### 3.3.2 Wirksamkeit von Pazopanib

Abb. 14 stellt die Dosiswirkungskurven nach Inkubation mit dem TKI Pazopanib über 72h dar. Es ergaben sich hoch signifikante Unterschiede im Ansprechverhalten der einzelnen Zelllinien auf Pazopanib ( $p < 0,01$ ) (Tab. 11). Die beiden Tumorzelllinien PC52 und SCC9 zeigten die geringste Sensitivität gegenüber dem TKI. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen bei  $170,993 \pm 1,564 \mu\text{M}$  für PC52 und  $125,958 \pm 1,251 \mu\text{M}$  für SCC9. Die geringste mittlere inhibitorische Konzentration konnte für die Zelllinie PC1-1 ( $62,647 \pm 1,191 \mu\text{M}$ ) berechnet werden. Das zytotoxische

Potential von Pazopanib erreichte hier bei einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  eine maximale Zellreduktion auf  $20,059 \pm 3,147$  %. Hingegen konnte bei selber Konzentration in der Zelllinie PC13-1 nur eine Zellreduktion auf  $24,727 \pm 8,182$  % gezeigt werden ( $\text{IC}_{50}=102,399 \pm 1,222$   $\mu\text{M}$ ). Laut Berechnung von  $\text{IC}_{50}$  reagiert SCC68 ( $\text{IC}_{50}=80,369 \pm 1,231$   $\mu\text{M}$ ) sensibler auf Pazopanib als PC13-1. Bei Betrachtung der Abb. 14 konnte jedoch Pazopanib in der Zelllinie SCC68 mit einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  nur eine maximale Zellzahlreduktion von  $31,527 \pm 6,179$  % erreichen. Bei allen Zelllinien außer PC52 ist ein Wiederanstieg der Dosiswirkungskurve bei einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  zu beobachten.



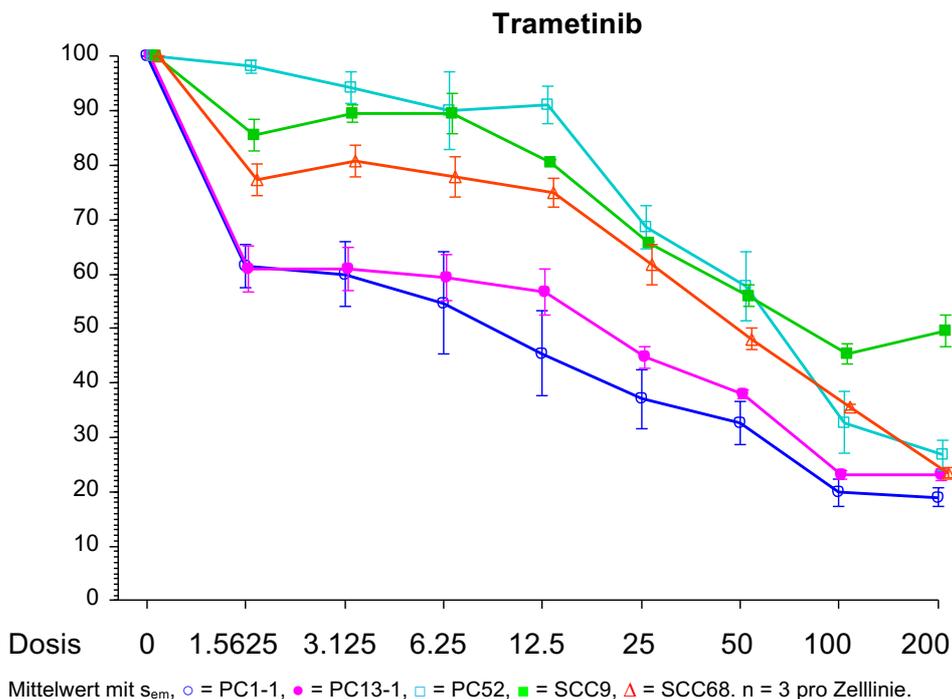
**Abbildung 14:** Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Pazopanib auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 800  $\mu\text{M}$  ( $\log_2$ ).

### 3.3.3 Wirksamkeit von Trametinib

Abb. 15 zeigt, dass der TKI Trametinib im unteren Konzentrationsbereich hoch signifikante Zellzahlreduktion in den fünf untersuchten Zelllinien aufweist ( $p < 0,01$ ) (Tab. 11). Für alle Tumorzelllinien konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition des Zellwachstums mit sigmoidem Kurvenverlauf beobachtet

werden (Interaktion  $p < 0,01$ ). Beim Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte erwiesen sich die beiden Zelllinien PC1-1 und PC13-1 als besonders sensibel gegenüber einer Inkubation mit Trametinib. Mit einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Trametinib erreichte man bei PC1-1 eine Zellreduktion auf  $18,987 \pm 3,059 \%$  und in PC13-1 auf  $23,048 \pm 1,877 \%$ . Die errechneten mittleren inhibitorischen Konzentrationen lagen bei  $< 4,278^{**} \pm 2,166 \mu\text{M}$  und  $< 5,929^{**} \pm 1,284 \mu\text{M}$ . Ein ähnlicher inhibitorischer Effekt wurde in der Zelllinie PC52 mit einer fast dreifach höheren Konzentration ( $35,985 \pm 1,472 \mu\text{M}$ ) erzielt. Der Kurvenverlauf der Zelllinie PC13-1 zeigt ein Plateau im Bereich von  $1,5625 \mu\text{M}$  bis  $6,25 \mu\text{M}$  mit einer Zellreduktion auf 60 %. Erst ab einer Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  fällt die Kurve weiter stark ab ( $44,721 \pm 3,377 \%$ ). Eine maximale Zellzahlreduktion auf unter 20 % konnte ausschließlich in der Zelllinie PC1-1 erreicht werden ( $18,987 \pm 3,059 \%$ ). Die beiden Zungenkarzinomzelllinien SCC9 und SCC68 zeigten eine ähnliche Ansprechrate mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von  $18,068 \pm 1,068 \mu\text{M}$  und  $24,270 \pm 1,338 \mu\text{M}$ . Das schwächste zytotoxische Potential von Trametinib ist in der Zelllinie SCC9 mit einer maximalen Zellreduktion auf  $45,313 \pm 3,182 \%$  ersichtlich.

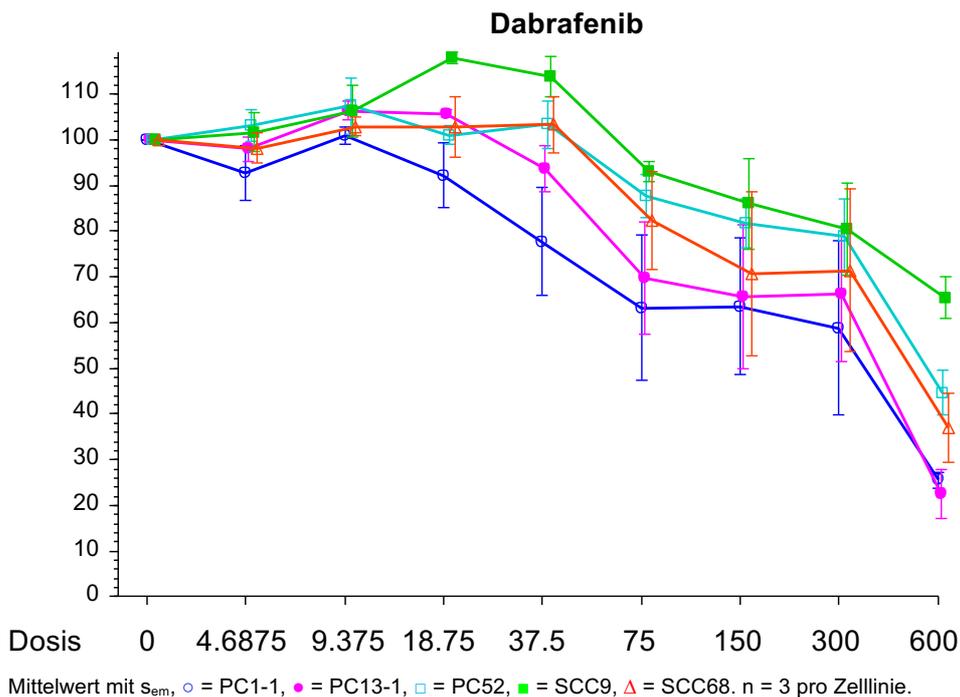
\*\*Für Versuche, in denen die ermittelte  $IC_{50}$  kleiner als die Konzentration am ersten Messpunkt ist wurde der Wert  $< 1,5625 \mu\text{M}$  eingesetzt und daraus mit den restlichen Werten das geometrische Mittel berechnet.



**Abbildung 15:** Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Trametinib auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $\log_2$ ).

### 3.3.4 Wirksamkeit von Dabrafenib

Alle fünf Zelllinien zeigten ein ähnliches Ansprechverhalten gegenüber den verschiedenen Konzentrationen von Dabrafenib ( $\log_2$ ) in der Monotherapie ( $p=0,15$ ) (Tab. 11). Im Verlauf sind Parallelen in den Dosiswirkungskurven der verschiedenen Zelllinien zu erkennen (Interaktion  $p=0,75$ ) (Tab. 11). Der stärkste zytotoxische Effekt von Dabrafenib konnte für die Zelllinie PC1-1 mit einer maximalen Zellzahlreduktion auf  $25,606 \pm 3,090$  % sowie einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $88,851 \pm 3,855$   $\mu\text{M}$  festgestellt werden. Für die Zelllinien PC13-1 und SCC68 errechnete sich eine mittlere inhibitorische Konzentration von  $120,827 \pm 2,925$   $\mu\text{M}$  und  $145,649 \pm 2,614$   $\mu\text{M}$ . In den Versuchen mit PC52 und SCC9 zeigte Dabrafenib das geringste zytotoxische Potential. Es ergab sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $241,607 \pm 2,161$   $\mu\text{M}$  für PC52 und  $163,987 \pm 2,288$   $\mu\text{M}$  für SCC9. Der schwächste zytotoxische Effekt konnte mit einer Zellzahlreduktion auf  $65,492 \pm 8,163$  % der Ausgangszellzahl für die Zelllinie SCC9 gezeigt werden.



**Abbildung 16:** Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Dabrafenib auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 600  $\mu\text{M}$  ( $\log_2$ ).

### 3.4 Untersuchung der antiproliferativen Aktivität der verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren in Kombination mit 5-Fluorouracil und Cisplatin

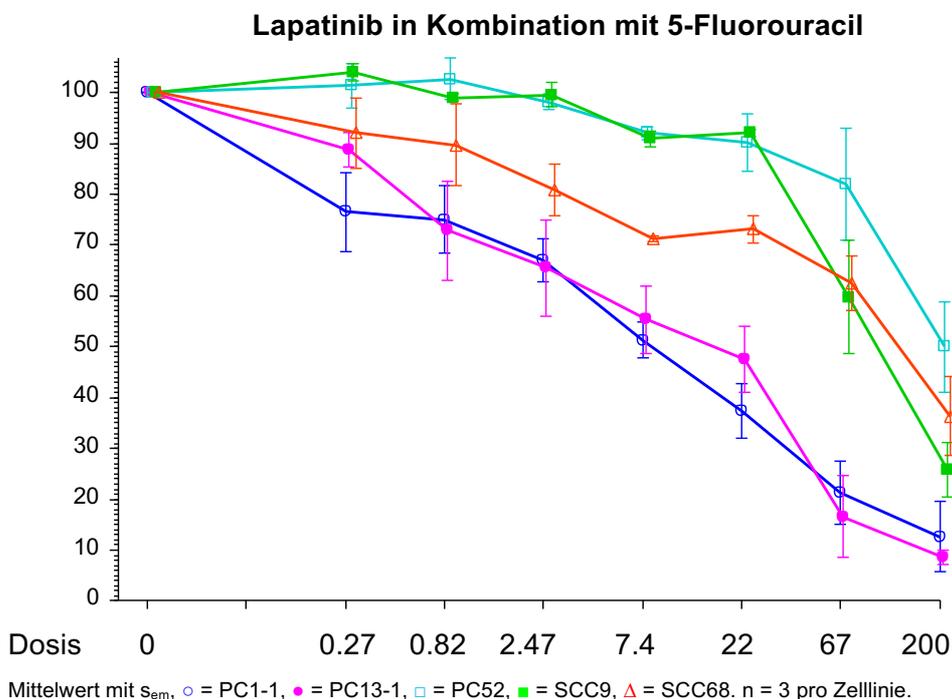
Im Folgenden werden die Dosiswirkungskurven der Kombinationsversuche gezeigt. Die Darstellung der Verläufe für je einen Wirkstoff mit entsprechender  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration der Kombinationszytostatika (Cisplatin und 5-FU) erfolgen getrennt nach Zelllinien.

#### 3.4.1 Wirksamkeit von Lapatinib in der Kombinationstherapie

In Abb. 17 und 18 sind die Kombinationsversuche mit Lapatinib und 5-FU bzw. Cisplatin dargestellt. Wie auch in der Monotherapie reagierten die Zelllinien PC1-1 und PC13-1 sensibler gegenüber den Wirkstoffen als die restlichen Zelllinien. In der Kombinationstherapie ist kein Wiederanstieg der Dosiswirkungskurven bei maximaler Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  zu erkennen, sondern ein stetiger Abfall bis auf unter 10 %. Eine Verbesserung der zytotoxischen

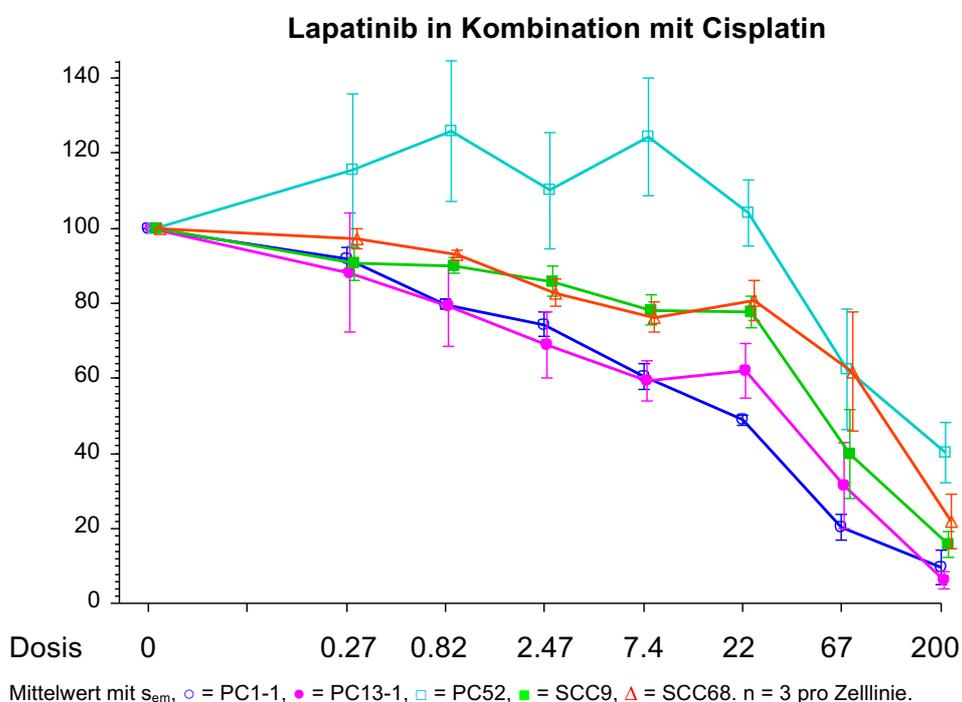
Wirksamkeit von Lapatinib konnte durch 5-FU sowie Cisplatin in hoher Dosiskonzentration von 200  $\mu\text{M}$  erreicht werden.

In der Kombinationstherapie mit Lapatinib und 5-FU zeigten die fünf untersuchten Tumorzelllinien ähnlich wie in der Monotherapie hoch signifikante Unterschiede in ihrem Ansprechverhalten ( $p < 0,01$ ) (Tab. 11). Beim Vergleich der Wirksamkeitsprofile sind keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Therapieformen festzustellen ( $p = 0,19$ ) (Tab. 12). Hinsichtlich der mittleren inhibitorischen Konzentration zeigte die Wirkstoffkombination bei allen Zelllinien außer PC13-1 einen antagonistischen Effekt ( $K > 1$ ). Die Kombination erwies ausschließlich bei hoher Dosis von 200  $\mu\text{M}$  Lapatinib ein stärkeres Wirksamkeitsprofil. In der Zelllinie PC13-1 erbrachte die Kombination eine maximale Zellreduktion auf  $8,649 \pm 2,323$  %. Die  $\text{IC}_{50}$  ist mit  $6,302 \pm 5,73$   $\mu\text{M}$  annähernd konstant geblieben. Auch in der Zelllinie PC1-1 konnte die Zellzahl bei hoher Dosis von  $17,644 \pm 7,146$  % in der Monotherapie auf  $12,678 \pm 12,181$  % weiter reduziert werden.



**Abbildung 17:** Kombinationsversuch mit 5-FU – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Lapatinib mit der jeweiligen  $\text{IC}_{50}$  von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $\log_3$ ).

Die Tumorzelllinien zeigten in der Kombinationstherapie mit Lapatinib und Cisplatin sehr signifikante Ansprechraten ähnlich wie in der Monotherapie ( $p < 0,01$ ) (Tab. 11). Im Gegenteil zur Monotherapie sind die Verläufe der Dosiswirkungskurven annähernd parallel ( $p = 0,71$ ) (Tab. 11). Die Zugabe von Cisplatin erwies keine Verbesserung gegenüber der Monotherapie. Der Kombinationsindex K ergab bei allen Zelllinien keine Verbesserung des zytotoxischen Potentials von Lapatinib durch Cisplatin. Ausschließlich in hoher Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Lapatinib konnte ähnlich wie auch bei der Zugabe von 5-FU eine Erhöhung der zytotoxischen Wirksamkeit auf die Zelllinien beschrieben werden. Insbesondere PC1-1, PC13-1 und SCC9 zeigten eine erhöhte maximale Zellreduktion in der Kombination. In der Zelllinie PC13-1 konnte die Zellzahl von  $16,461 \pm 0,788$  % auf  $6,247 \pm 3,900$  % reduziert werden. Auch in der Zelllinie PC1-1 konnte die Zellzahl bei hoher Dosis von  $17,644 \pm 7,146$  % in der Monotherapie auf  $9,721 \pm 7,643$  % weiter gesenkt werden.



**Abbildung 18:** Kombinationsversuch mit Cisplatin – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Lapatinib mit der jeweiligen  $IC_{50}$  von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $\log_3$ ).

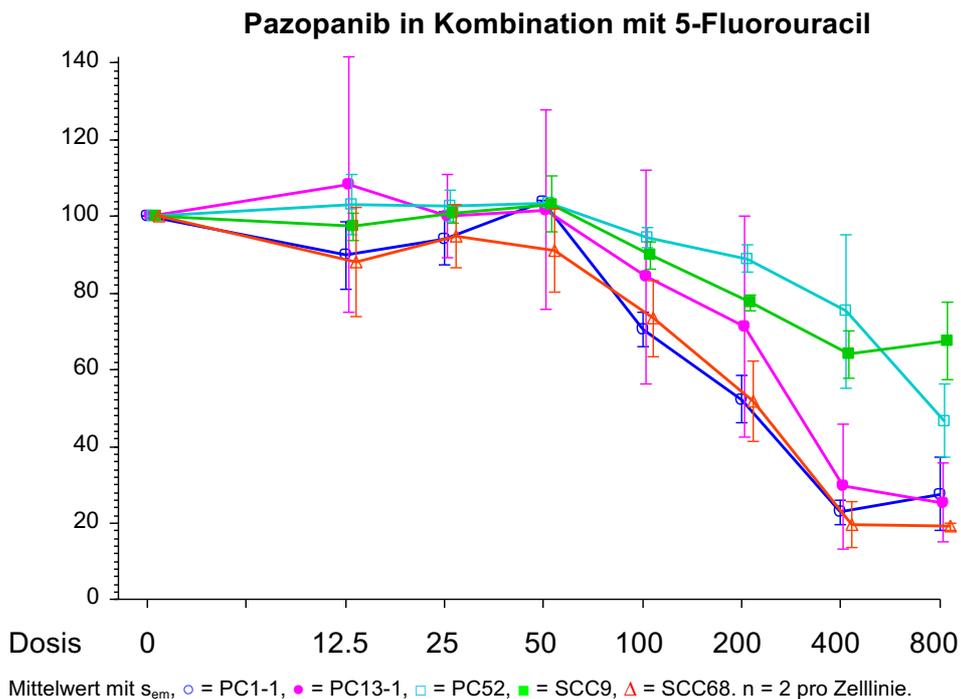
**Tabelle 7:** Zusammenfassung der IC<sub>50</sub> in Mono- und Kombinationstherapie mit Lapatinib, 5-FU und Cisplatin, sowie zugehörigem K-Wert.

Zelllinie	Mono	mit 5-FU	K <sub>5-FU</sub>	mit Cisplatin	K <sub>Cis</sub>
PC1-1	1,125 ± 5,423 µM	5,248 ± 2,561 µM	4,66	11,553 ± 1,381 µM	10,27
PC13-1	6,891 ± 1,911 µM	6,302 ± 5,273 µM	0,91	17,661 ± 5,159 µM	2,56
PC52	31,366 ± 1,194 µM	80,287 ± 1,432 µM	2,56	59,881 ± 1,550 µM	1,91
SCC9	18,559 ± 1,674 µM	59,967 ± 1,602 µM	3,23	44,478 ± 1,570 µM	2,40
SCC68	20,546 ± 1,343 µM	37,332 ± 1,498 µM	1,82	58,670 ± 1,692 µM	2,86

### 3.4.2 Wirksamkeit von Pazopanib in der Kombinationstherapie

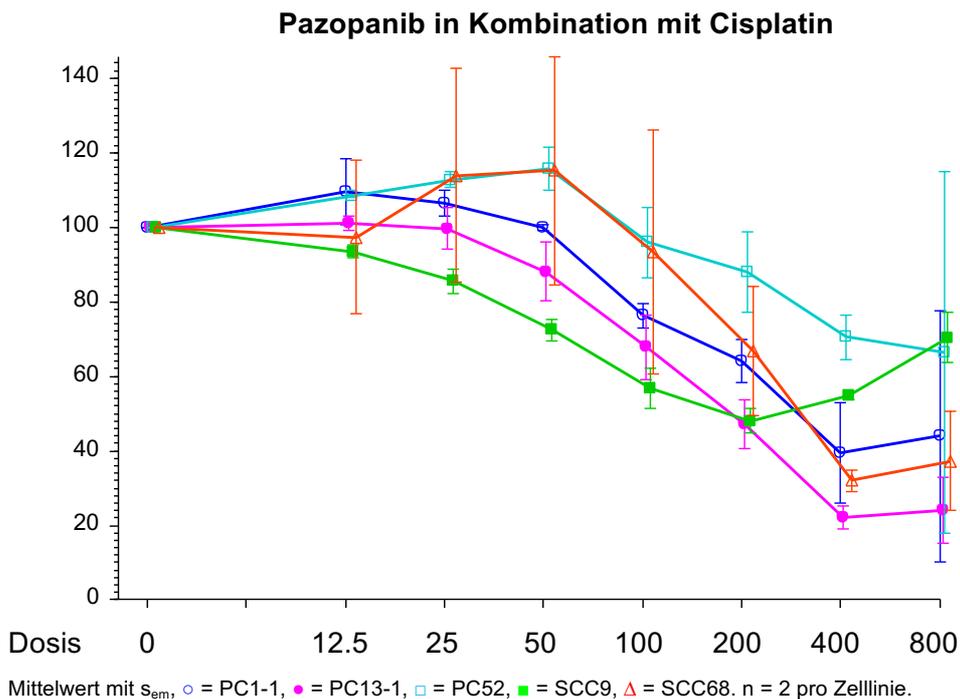
Die nachfolgenden Diagramme stellen die Kombinationstherapie mit Pazopanib und 5-FU bzw. Cisplatin dar. In beiden Versuchen zeigten die Zelllinien PC52 und SCC9 die geringste Sensitivität, ähnlich wie in der Monotherapie mit Pazopanib. Nur bei hoher Dosis von 800 µM konnte eine Verbesserung des zytotoxischen Potentials von Pazopanib durch die Kombination festgestellt werden.

Beim Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte zwischen Mono- und Kombinationstherapie wurde bei allen Tumorzelllinien keine Verbesserung der zytotoxischen Wirksamkeit durch Zugabe von 5-FU erzielt. Besonders in den Zelllinien PC1-1 und PC52 stieg der IC<sub>50</sub>-Wert um mehr als das Doppelte (147,746 ± 1,496 µM; 399,799 ± 1,540 µM). Die maximale Zellreduktion konnte in der Tumorzelllinie SCC68 von ca. 31,527 ± 6,179 % auf 19,118 ± 1,311 % gesteigert werden. Durch die Zugabe von 5-FU erwiesen die Zelllinien im Vergleich zur Monotherapie alle eine ähnliche Sensitivität gegenüber Pazopanib (p=0,46) (Tab. 11). Das hoch signifikante Ansprechverhalten der Zelllinien in der Monotherapie wurde durch 5-FU annähernd gleich gegenüber Pazopanib (Mono p=<0,00005; Kombi p=0,46). Beim Vergleich zwischen Mono- und Kombinationstherapie sind signifikante Unterschiede in der Zellinhibition zu beobachten. Hinsichtlich der Interaktion sind die Verläufe der Dosiswirkungskurven aus beiden Therapieformen parallel (p=0,13) (Tab. 12).



**Abbildung 19:** Kombinationsversuch mit 5-FU – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Pazopanib mit der jeweiligen  $IC_{50}$  von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 800  $\mu$ M (log2).

Das in der Pazopanib-Monotherapie ( $p < 0,01$ ) hoch signifikant unterschiedliche Ansprechverhalten der einzelnen Zelllinien zueinander wird durch den Zusatz von Cisplatin angeglichen ( $p = 0,29$ ) (Tab. 11). Die Zelllinien zeigten in der Kombinationstherapie ein ähnliches Ansprechverhalten. Bezüglich ihrer Interaktion sind in Abb. 20 die annähernd parallelen Verläufe der Dosiswirkungskurven der einzelnen Zelllinien ersichtlich ( $p = 0,68$ ). Einen synergistischen Effekt der Wirkstoffkombination resultierte ausschließlich in der Zelllinie SCC9. Der  $IC_{50}$ -Wert reduzierte sich mit  $46,344 \pm 1,034 \mu$ M um das 2,7-fache zur Monotherapie. Die maximale Zellreduktion in SCC9 wurde von  $52,921 \pm 12,211$  % auf  $48,085 \pm 4,828$  % erhöht. Die stärkste Zellreduktion konnte bei einer Konzentration von 400  $\mu$ M Pazopanib mit Cisplatin in der Zelllinie PC13-1 erreicht werden ( $22,086 \pm 4,379$  %).



**Abbildung 20:** Kombinationsversuch mit Cisplatin – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Pazopanib mit der jeweiligen  $IC_{50}$  von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 800  $\mu\text{M}$  ( $\log_2$ ).

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der  $IC_{50}$  in Mono- und Kombinationstherapie mit Pazopanib, 5-FU und Cisplatin, sowie zugehörigem K-Wert.

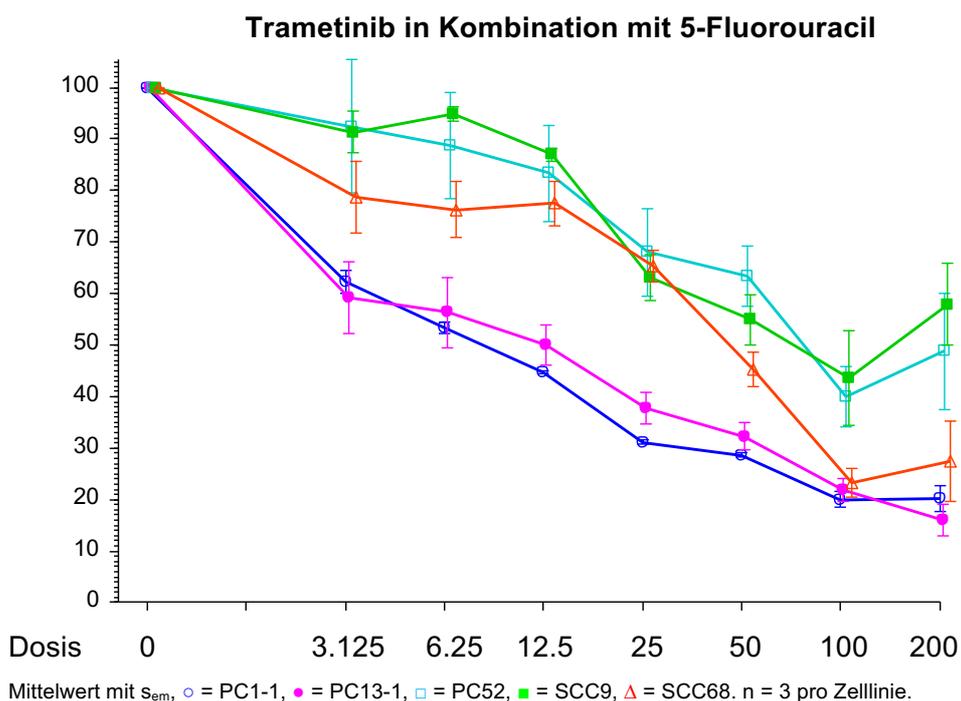
Zelllinie	Mono	mit 5-FU	$K_{5-FU}$	mit Cisplatin	$K_{Cis}$
PC1-1	$62,647 \pm 1,191 \mu\text{M}$	$147,746 \pm 1,496 \mu\text{M}$	2,36	$164,622 \pm 1,635 \mu\text{M}$	2,63
PC13-1	$102,399 \pm 1,222 \mu\text{M}$	$172,736 \pm 2,208 \mu\text{M}$	1,69	$125,878 \pm 2,933 \mu\text{M}$	1,23
PC52	$170,993 \pm 1,564 \mu\text{M}$	$399,799 \pm 1,540 \mu\text{M}$	2,34	$202,992 \pm 1,034 \mu\text{M}$	1,19
SCC9	$125,957 \pm 1,251 \mu\text{M}$	$190,148 \pm 1,109 \mu\text{M}$	1,51	$46,344 \pm 2,294 \mu\text{M}$	0,37
SCC68	$80,369 \pm 1,231 \mu\text{M}$	$160,003 \pm 1,450 \mu\text{M}$	1,99	$147,156 \pm 1,496 \mu\text{M}$	1,83

### 3.4.3 Wirksamkeit von Trametinib in der Kombinationstherapie

In der Kombinationstherapie mit Trametinib und 5-FU bzw. Cisplatin konnte bei den Zelllinien PC52 und SCC9 eine initiale Zellzahlsteigerung bei Konzentration 200  $\mu\text{M}$  beobachten werden. Beide Medikamenten-Kombinationen wirkten auf die Zelllinien PC1-1 und PC13-1 am stärksten. Wie auch in der Monotherapie zeigten die Zelllinien PC52 und SCC9 eine geringere Sensitivität.

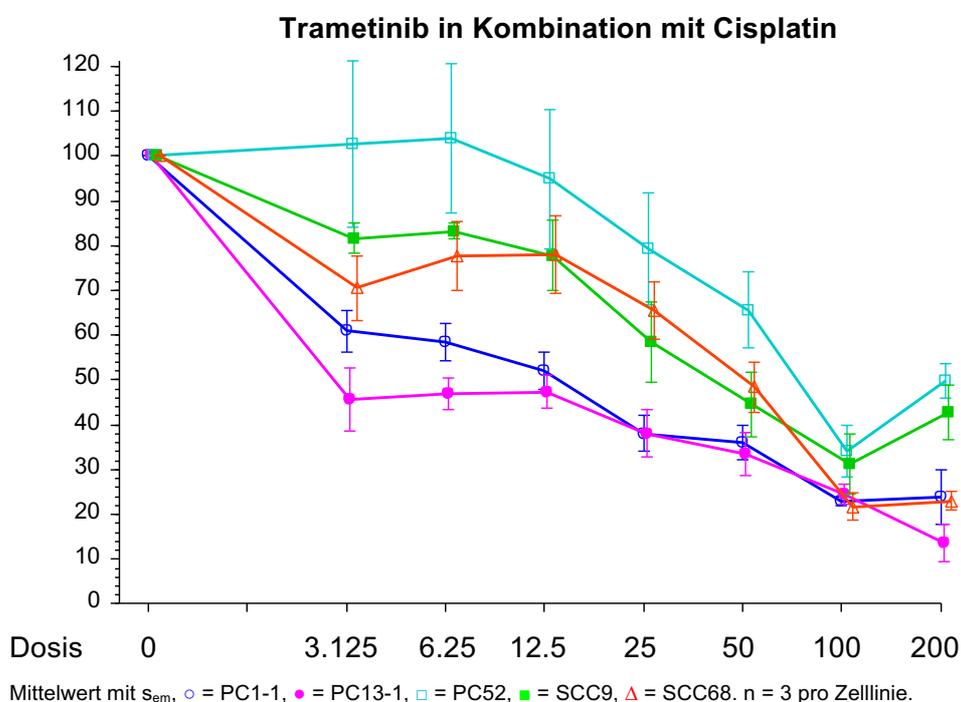
In der Kombinationstherapie mit Trametinib und 5-FU sind ähnlich wie in der Monotherapie signifikante Unterschiede im Ansprechverhalten der verschiede-

nen Zelllinien zu beobachten ( $p < 0,01$ ) (Tab. 11). Bezüglich ihrer Interaktion zeigten die fünf Zelllinien nach Inkubation mit der Kombination hochsignifikante konzentrationsabhängige Unterschiede in der Inhibierung des Zellwachstums ( $p < 0,01$ ) (Tab. 11). Durch Zugabe von 5-FU konnten synergistische Effekte in den Zelllinien PC1-1 und PC52 beobachtet werden. Der  $IC_{50}$ -Wert von PC1-1 reduzierte sich mit einem Wert von  $3,892 \pm 1,183 \mu\text{M}$  bis auf die Hälfte gegenüber der Monotherapie. Die Zelllinie PC13-1 zeigte bei hoher Konzentration von Trametinib eine gesteigerte Zellreduktion von  $23,048 \pm 1,877 \%$  auf  $15,978 \pm 5,425 \%$  durch 5-FU. Bei den Zungenkarzinom-Zelllinien SCC9 und SCC68 konnte keine Verbesserung des zytotoxischen Potentials von Trametinib durch 5-FU festgestellt werden. Nicht nur die errechneten  $IC_{50}$ -Werte, sondern auch die maximale Zellzahlreduktion sind weitestgehend konstant geblieben.



**Abbildung 21:** Kombinationsversuch mit 5-FU – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Trametinib mit der jeweiligen  $IC_{50}$  von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von  $200 \mu\text{M}$  ( $\log_2$ ).

Hinsichtlich ihrer Interaktion zeigten die Zelllinien untereinander in der Kombinationstherapie mit Trametinib und Cisplatin ähnlich wie in der Monotherapie dosisabhängig hoch signifikante Unterschiede im Verlauf der Kurven ( $p < 0,01$ ) (Tab. 11). Im Vergleich der Dosiswirkungskurven von Mono- und Kombinationstherapie konnten ähnliche Werte festgestellt werden ( $p = 0,12$ ) (Tab. 12). In ihrem Ansprechverhalten auf den Kombinations-Wirkstoff zeigten die Zelllinien signifikante Unterschiede ( $p = 0,01$ ) (Tab. 11). Der Zusatz von Cisplatin erbrachte in der Zelllinie PC13-1 nach Berechnung des Kombinationsindex  $K$  einen synergistischen Effekt ( $K < 0$ ). Einen deutlichen Effekt ist bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Hier zeigte die Kombination eine Erhöhung der Zellzahlreduktion auf  $13,674 \pm 7,176 \%$ . Die  $\text{IC}_{50}$  reduzierte sich um mehr als dreiviertel gegenüber der Monotherapie ( $< 3,175^* - \mu\text{M}$ ). In den Zelllinien PC1-1, PC52, SCC9 und SCC68 konnte Cisplatin das zytotoxische Potential von Trametinib nicht verbessern. Die ermittelten Werte der Kombinationstherapie sind hier im Vergleich zur Monotherapie konstant geblieben.



**Abbildung 22:** Kombinationsversuch mit Cisplatin – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Trametinib mit der jeweiligen  $\text{IC}_{50}$  von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $\log_2$ ).

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der IC<sub>50</sub> in Mono- und Kombinationstherapie mit Trametinib, 5-FU und Cisplatin, sowie zugehörigem K-Wert.

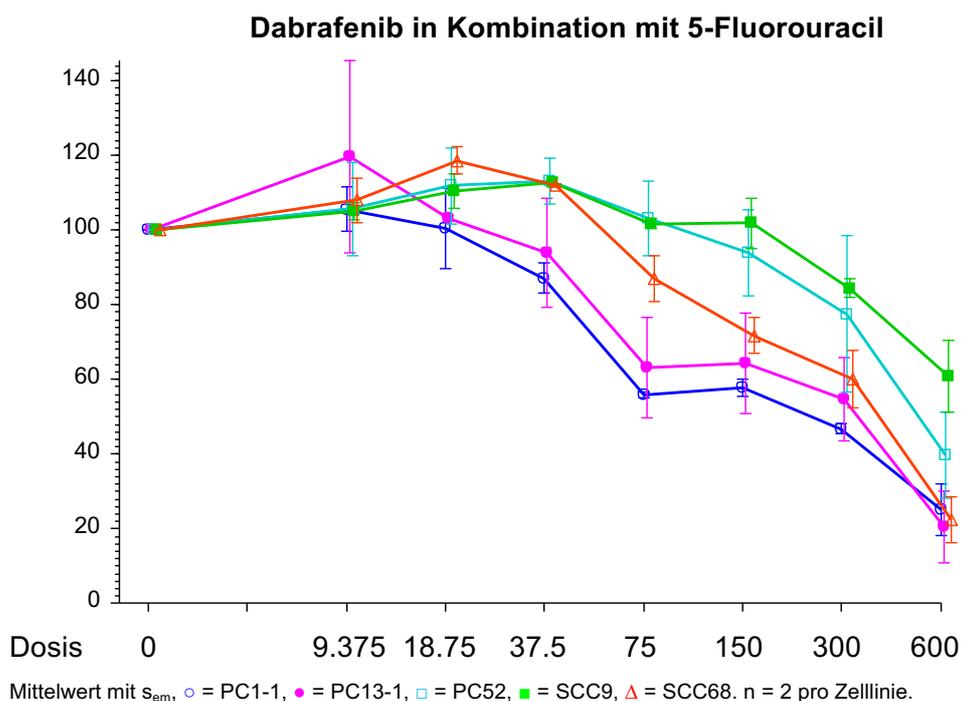
Zelllinie	Mono	mit 5-FU	K <sub>5-FU</sub>	mit Cisplatin	K <sub>Cis</sub>
PC1-1	<4,278** ± 2,166 µM	3,892 ± 1,183 µM	<0,9	<5,262* ± 1,118 µM	<1,23
PC13-1	<5,929** ± 1,284 µM	<5,976* ± 1,180 µM	<1,01	<3,125* - µM	<0,53
PC52	35,985 ± 1,472 µM	24,164 ± 1,903 µM	0,67	38,158 ± 1,552 µM	1,06
SCC9	18,068 ± 1,068 µM	19,118 ± 1,085 µM	1,06	19,639 ± 1,456 µM	1,09
SCC68	24,270 ± 1,338 µM	29,211 ± 1,125 µM	1,20	27,109 ± 1,757 µM	1,12

### 3.4.4 Wirksamkeit von Dabrafenib in der Kombinationstherapie

Abb. 23 und Abb. 24 zeigen die Kombinationstherapie unter Dabrafenib mit konstanter Zugabe der für jede Zelllinie spezifischen IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von 5-FU oder Cisplatin. Wie auch in der Monotherapie mit Dabrafenib verhielten sich in beiden Kombinationsversuchen die Zelllinien PC1-1 und PC13-1 sensibler als PC52 und SCC9. In beiden Diagrammen weist die Zelllinie SCC9 die geringste Empfindlichkeit bei der Höchstdosis und im Verlauf auf.

In der Kombinationstherapie unter Dabrafenib mit 5-FU wurden ähnlich Verläufe der Dosiswirkungskurven beobachtet wie in der Monotherapie (p=0,09) (Tab. 12). Die Zelllinien reagierten ähnlich sensibel auf die Wirkstoffkombination (p=0,21) (Tab. 11). Hinsichtlich ihrer Interaktion zeigen die fünf Zelllinien in Abb. 23 hochsignifikante konzentrationsabhängige Unterschiede in der Inhibition des Zellwachstums (p<0,01) (Tab. 11). Beim Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte aus Mono- und Kombinationstherapie konnte die Kombination mit 5-FU ausschließlich in der Tumorzelllinie PC1-1 einen synergistischen Effekt zeigen (K<0). Die erhöhte Sensitivität wird bei Betrachtung der maximalen Zellreduktion (25,063 ± 9,758 %) und den um das 1,4-fache reduzierte IC<sub>50</sub>-Wert deutlich. Nach Berechnung des Kombinationsindex K erbrachte der Zusatz von 5-FU bei allen weiteren Zelllinien eine Verschlechterung des Wirksamkeitsprofils von Dabrafenib. Trotz der Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes konnte die Kombination in der Zelllinie SCC68 eine maximale Zellreduktion von 37,019 ± 13,267 % auf 22,589 ± 8,652 % steigern. Bei einer Konzentration von 600µM Dabrafenib ist das zytotoxische Potential der Kombination in der Zelllinie PC13-1 mit einer maximalen

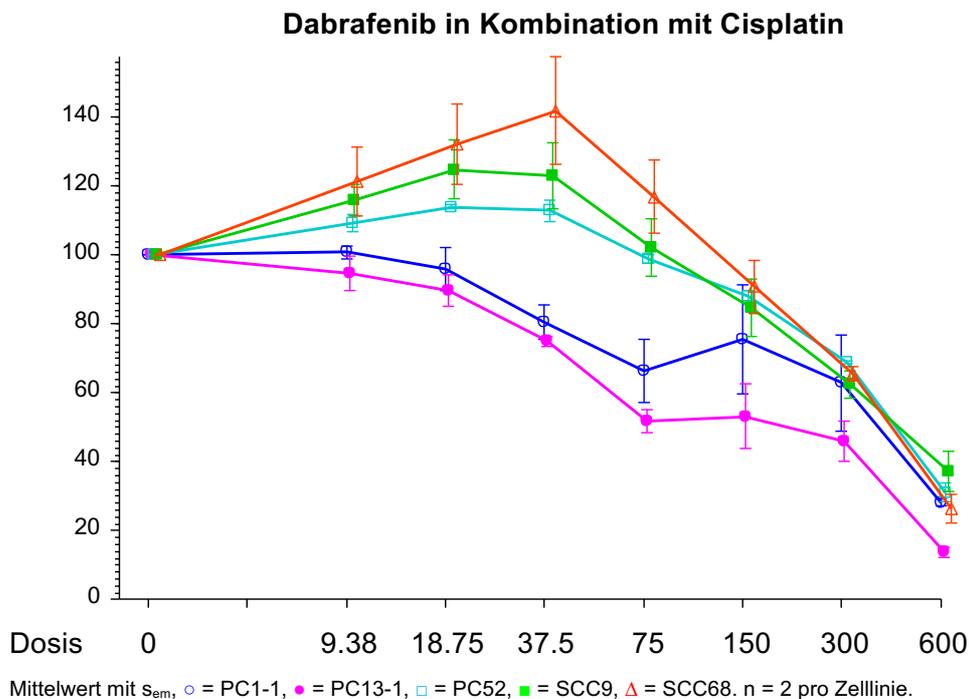
Zellzahlreduktion auf  $20,437 \pm 13,588$  % am stärksten deutlich. In den Zelllinien PC52 und SCC9 konnte ein ähnlich schwaches Ansprechverhalten beobachtet werden ( $320,653 \pm 1,462$   $\mu\text{M}$ ;  $307,345 \pm 1,322$   $\mu\text{M}$ ). Bei beiden zeigte Dabrafenib sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombination mit 5-FU den geringsten zytotoxischen Effekt.



**Abbildung 23:** Kombinationsversuch mit 5-FU – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Dabrafenib mit der jeweiligen  $\text{IC}_{50}$  von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 600  $\mu\text{M}$  ( $\log_2$ ).

Durch die Zugabe von Cisplatin zeigten die Zelllinien im Vergleich zur Monotherapie ( $p=0,15$ ) signifikante Unterschiede in der Inhibition des Zellwachstums ( $p=0,01$ ) (Tab. 11). Bei Betrachtung ihrer Interaktion ist das Ansprechverhalten der Tumorzelllinien auf die Wirkstoffkombination dosisabhängig sehr unterschiedlich ( $p<0,01$ ) (Tab. 11). Im Vergleich der Dosiswirkungskurven von Mono- und Kombinationstherapie wurden ähnlich Verläufe beobachtet ( $p=0,22$ ) (Tab. 12). Nach Berechnung des K-Wertes konnte die Kombination mit Cisplatin ausschließlich in der Zelllinie PC13-1 einen synergistischen Effekt zeigen. Die  $\text{IC}_{50}$  von PC13-1 verbesserte sich auf

116,525 ± 2,555 µM. Hier konnte der Zusatz von Cisplatin die maximale Zellreduktion von 22,585 ± 9,160 % auf 13,775 ± 1,962 % weiter erhöhen. Bei Betrachtung der IC<sub>50</sub> haben sich die Werte bei allen anderen Zelllinien erhöht, in SCC68 sogar um mehr als das Doppelte. Bei einer Konzentration von 600 µM wirkt die Kombination auf die Zelllinien PC1-1 und SCC68 gleich. Die maximale Zellinhibition wurde hier durch die Kombination auf 28,216 ± 1,614 % und 26,377 ± 5,786 % gesteigert. Bei hoher Konzentration von Dabrafenib, zeigte die Kombination mit Cisplatin in der Zelllinie SCC9 den stärksten synergistischen Effekt. Die maximale Zellreduktion erhöhte sich von 65,492 ± 8,163 % in der Monotherapie auf 37,212 ± 8,467 %.



**Abbildung 24:** Kombinationsversuch mit Cisplatin – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Dabrafenib mit der jeweiligen IC<sub>50</sub> für 5-FU auf die Zelllinie PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 600 µM (log<sub>2</sub>).

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der IC<sub>50</sub> in Mono- und Kombinationstherapie mit Dabrafenib, 5-FU und Cisplatin, sowie zugehörigem K-Wert.

Zelllinie	Mono	mit 5-FU	K <sub>5-FU</sub>	mit Cisplatin	K <sub>Cis</sub>
PC1-1	88,851 ± 3,855 µM	63,700 ± 1,126 µM	0,72	142,698 ± 3,721 µM	1,61
PC13-1	120,827 ± 2,925 µM	141,565 ± 2,969 µM	1,17	116,525 ± 2,555 µM	0,96
PC52	241,607 ± 2,161 µM	320,654 ± 1,462 µM	1,33	317,618 ± 1,042 µM	1,31
SCC9	163,987 ± 2,288 µM	307,345 ± 1,322 µM	1,87	235,125 ± 1,448 µM	1,43
SCC68	145,649 ± 2,614 µM	269,448 ± 1,266 µM	1,85	310,060 ± 1,098 µM	2,13

### 3.5 Vergleich der Zelllinien

Die Tumorzelllinie PC1-1 zeigt bei allen Medikamenten und Wirkstoffkombinationen die höchste Sensitivität, gefolgt von PC13-1. Ein schwaches zytotoxisches Potential der getesteten Substanzen wurde in der Tumorzelllinie PC52, sowie SCC9 festgestellt. Die Zungenkarzinomzelllinie SCC68 schwankt immer zwischen beiden Extremen.

**Tabelle 11:** Vergleich der Zelllinien untereinander in Mono- wie auch Kombinationstherapie.

Quelle		FG	F	p <sub>ANOVA</sub>
Mono-Versuche				
5-FU	Zell-Linien	4	4.10	0.03*
	Interaktion	28	10.62	<0.01***
Cis	Zell-Linien	4	58.70	<0.01***
	Interaktion	28	54.47	<0.01***
Lap	Zell-Linien	4	9.46	<0.01**
	Interaktion	28	2.63	<0.01***
Paz	Zell-Linien	4	16.05	<0.01***
	Interaktion	28	3.30	<0.01***
Tra	Zell-Linien	4	18.40	<0.01***
	Interaktion	28	6.09	<0.01***
Dab	Zell-Linien	4	2.18	0.15
	Interaktion	28	0.79	0.75

Kombinations-Versuche				
Lap mit 5-FU	Zell-Linien	4	29.10	<0.01***
	Interaktion	24	2.32	<0.01**
Lap mit Cis	Zell-Linien	4	11.24	<0.01**
	Interaktion	24	0.81	0.71
Paz mit 5-FU	Zell-Linien	4	1.07	0.46
	Interaktion	24	2.29	0.02*
Paz mit Cis	Zell-Linien	4	1.69	0.29
	Interaktion	24	0.83	0.68
Tra mit 5-FU	Zell-Linien	4	10.02	<0.01**
	Interaktion	24	3.13	<0.01***
Tra mit Cis	Zell-Linien	4	5.67	0.01*
	Interaktion	24	3.85	<0.01***
Dab mit 5-FU	Zell-Linien	4	2.14	0.21
	Interaktion	24	3.70	<0.01***
Dab mit Cis	Zell-Linien	4	10.26	0.01*
	Interaktion	24	3.06	<0.01**

FG= Statistische Freiheitsgrade, F= Statistischer F-Wert,  $p_{ANOVA}$ = mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), 5-FU= 5-Fluoruracil, Cis= Cisplatin, Lap= Lapatinib, Paz= Pazopanib, Tra= Trametinib, Dab= Dabrafenib.

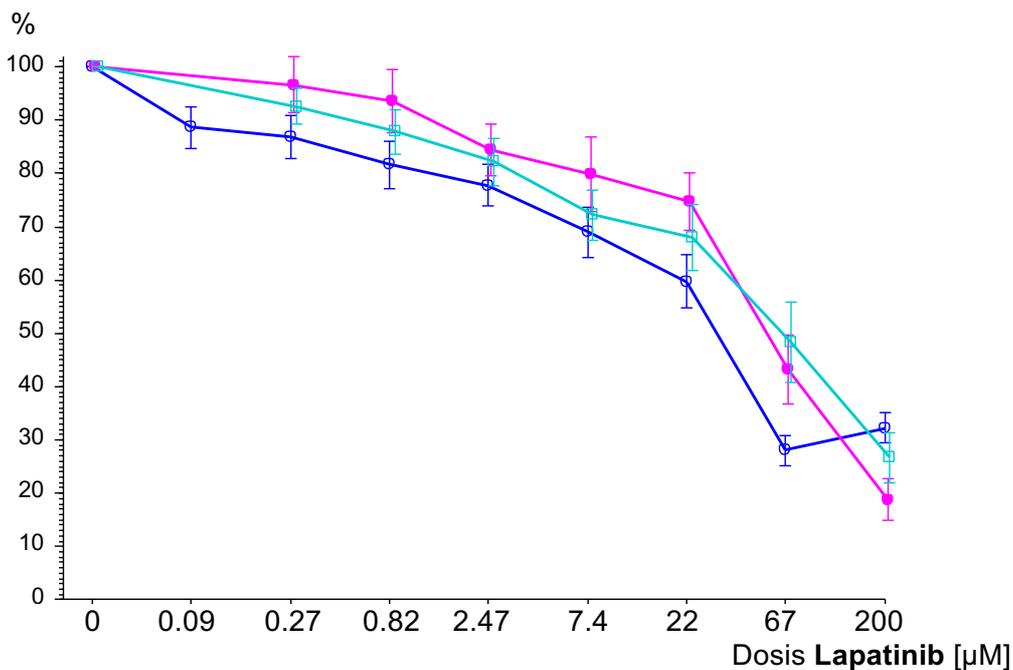
In Tab. 11 ist der Vergleich der Zelllinien sowohl in den Mono- als auch in den Kombinationsversuchen widergegeben. Die Zeile der Zelllinien beinhaltet die Mittelwerte der fünf Zelllinien von allen Messungen. Die Interaktion beschreibt die Parallelität der Verläufe. Es verdeutlicht, ob die Differenz zwischen den Zelllinien je nach Dosis unterschiedlich ist.

### 3.6 Vergleich zwischen Mono- und Kombinationstherapie

Nachfolgend werden alle Zelllinien zusammengefasst im Vergleich zwischen der Mono- und Kombinationsversuche graphisch dargestellt.

### 3.6.1 Lapatinib

Im Vergleich zur Monotherapie zeigten beide Kombinationen mit Lapatinib eine Abnahme der zytotoxischen Wirksamkeit. Ausschließlich bei der Maximalkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ist eine verbesserte Zellwachstumsinhibition bei den Kombinationsversuchen zu erkennen. Die Interaktionen sind bei beiden Kombinationsversuchen signifikant ( $p=0,01$ ) und sehr signifikant ( $p<0,01$ ) (Tab. 12). Die Wirkstoffkombination mit 5-FU zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Dosiswirkungskurve der Monotherapie ( $p=0,19$ ) (Tab. 12). Die Werte bei Zusatz von Cisplatin erwiesen starke Unterschiede bezüglich der Zellreduktion in der Monotherapie ( $p<0,01$ ) (Tab. 12), insbesondere im Konzentrationsbereich von 66,67  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$ .

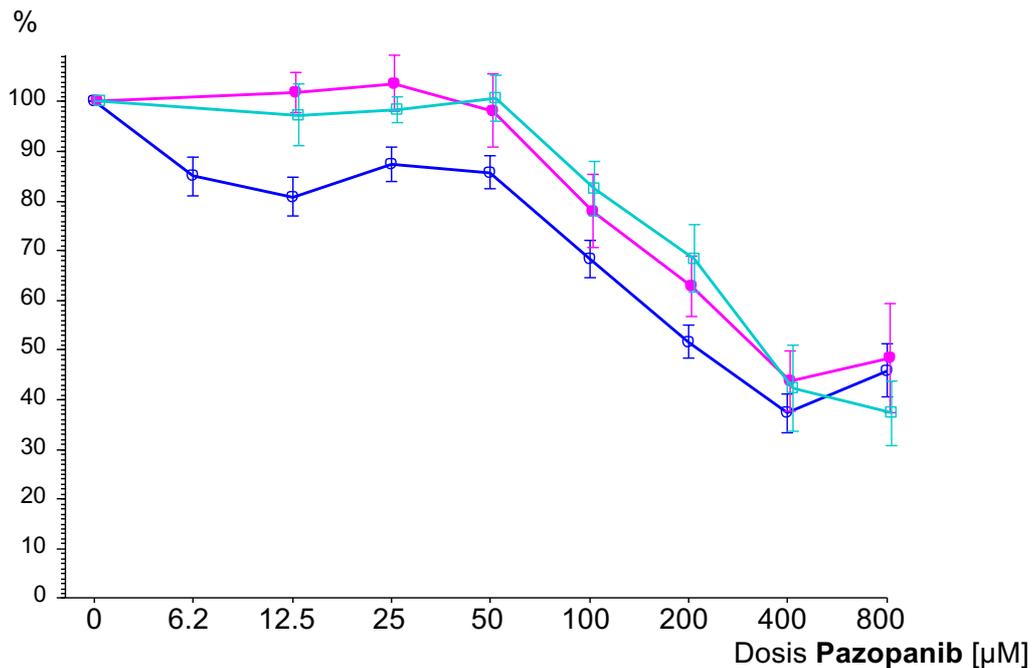


Mittelwert mit  $s_{\text{em}}$ , getrennt nach Zusatz  $\circ$  = Mono (n = 15),  $\bullet$  = CIS (n = 15),  $\square$  = 5-FU (n = 15).

**Abbildung 25:** Monotherapie mit Lapatinib im Vergleich mit der jeweiligen Kombinationstherapie von 5-FU und Cisplatin.

### 3.6.2 Pazopanib

Pazopanib zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Mono- und Kombinationsversuchen ( $p=0,04$ ;  $p=0,02$ ) (Tab. 12). Durch die annähernd parallel verlaufenden Dosiswirkungskurven stellt sich die Interaktion als nicht signifikant dar ( $p=0,13$ ;  $p=0,15$ ) (Tab. 12). Im Vergleich der Monotherapie mit der Kombination von 5-FU bzw. Cisplatin kam es zu einer Abnahme der zytotoxischen Wirksamkeit. Es konnte eine konstante Reduktion der Zellwachstumshemmung beobachtet werden. Ausschließlich die Kombination mit 5-FU hat bei einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  Pazopanib einen Vorteil gegenüber der Monotherapie. Wie in Abb. 26 veranschaulicht ist der Verlauf der Kombination mit 5-FU im Konzentrationsbereich von 12,5  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  zur Monotherapie signifikant. Die Kombination mit Cisplatin zeigt bei niedriger Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  bis 25  $\mu\text{M}$  stark abweichende Zellzahlen gegenüber zur Monotherapie ( $p<0,01$ ).

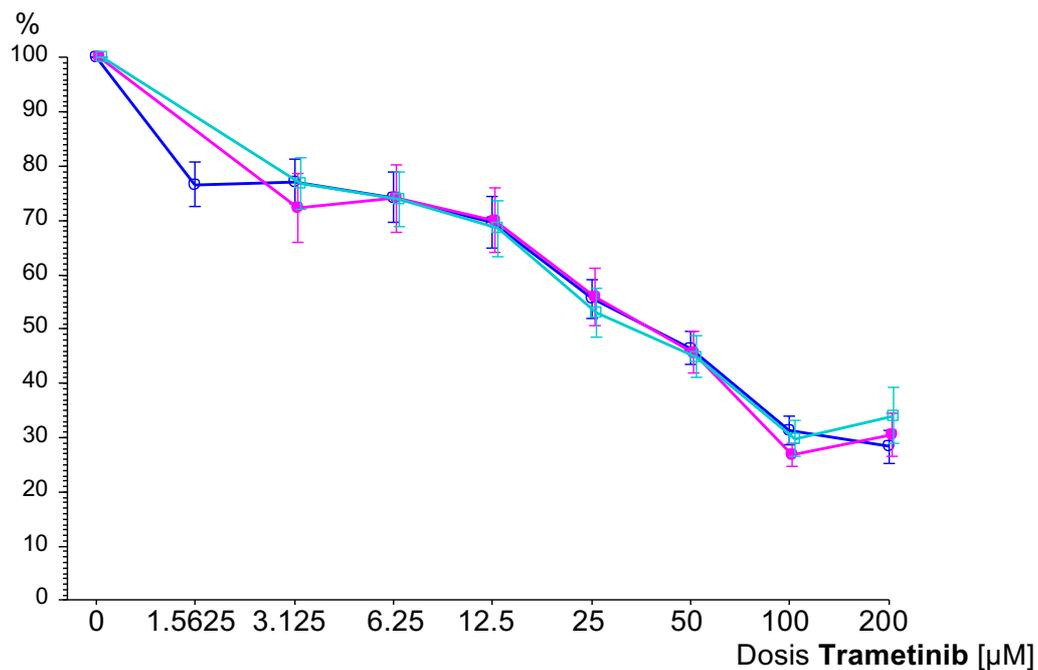


Mittelwert mit  $s_{em}$ , getrennt nach Zusatz ○ = Mono (n = 20), ● = CIS (n = 10), □ = 5-FU (n = 10).

**Abbildung 26:** Monotherapie mit Pazopanib im Vergleich mit der jeweiligen Kombinationstherapie von 5-FU und Cisplatin.

### 3.6.3 Trametinib

Abb. 27 zeigt annähernd parallel verlaufende Dosiswirkungskurven der Mono- und Kombinationsversuche (Interaktion:  $p=0,61$ ;  $p=0,09$ ) (Tab. 12). Es konnte kein Unterschied im Wirksamkeitsprofil von Trametinib festgestellt werden ( $p=0,12$ ;  $p=0,85$ ) (Tab. 12). Der Zusatz der Kombinationslösungen ergab demnach keine Steigerung der Reduktion der Zellzahl.

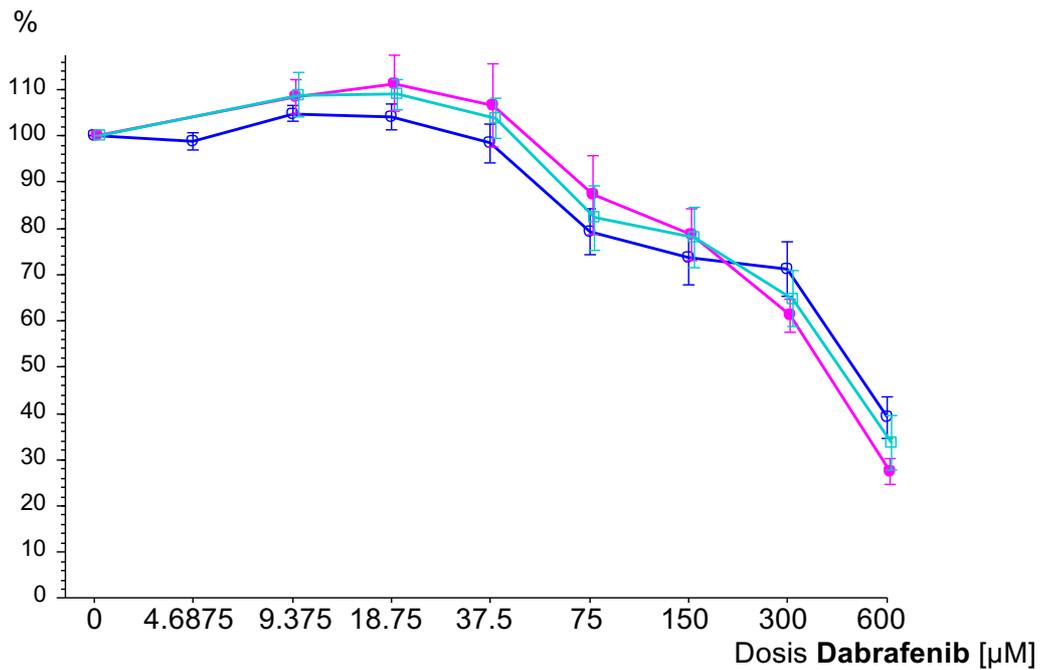


Mittelwert mit  $s_{em}$ , getrennt nach Zusatz ○ = Mono (n = 15), ● = CIS (n = 15), □ = 5-FU (n = 15).

**Abbildung 27:** Monotherapie mit Trametinib im Vergleich mit der jeweiligen Kombinationstherapie von 5-FU und Cisplatin.

### 3.6.4 Dabrafenib

Abb. 28 veranschaulicht, dass beide Kombinationsversuche mit Dabrafenib und 5-FU bzw. Cisplatin ähnliche Verläufe aufweisen. Das Wirksamkeitsprofil von Dabrafenib zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Mono- und Kombinationstherapie ( $p=0,09$ ;  $p=0,22$ ) (Tab. 12). Die Interaktion ist in beiden Kombinationsversuchen signifikant ( $p=0,02$ ;  $p=0,01$ ) (Tab. 12). Die Dosiswirkungskurven der Kombinationen zeigen bei hohen Konzentrationen ( $600 \mu\text{M}$ ) ein besseres zytotoxisches Potential im Verhältnis zur Monotherapie.



Mittelwert mit  $s_{em}$ , getrennt nach Zusatz ○ = Mono (n = 15), ● = CIS (n = 10), □ = 5-FU (n = 10).

**Abbildung 28:** Monotherapie mit Dabrafenib im Vergleich mit der jeweiligen Kombinationstherapie von 5-FU und Cisplatin.

### 3.6.5 Statistischer Vergleich

Tab. 12 verdeutlicht den Vergleich zwischen der Mono- und den Kombinationsversuchen. Die Zeile Mono-Kombi vergleicht alle Mittelwerte der Mono- und Kombinationsversuche über alle Konzentrationen. Die Interaktion beschreibt die Parallelität der Dosiswirkungskurven.

Tabelle 12: Vergleich zwischen Mono- und Kombinationstherapie.

Quelle		FG	F	p <sub>PS</sub>
<b>Mono- und Kombinationstherapie mit 5-FU</b>				
Lapatinib	Mono-Kombi	1	1.14	0.19
	Interaktion	6	4.90	0.01*
Pazopanib	Mono-Kombi	1	2.58	0.04*
	Interaktion	6	6.34	0.13
Trametinib	Mono-Kombi	1	0.00	0.85
	Interaktion	6	1.22	0.61
Dabrafenib	Mono-Kombi	1	0.06	0.09
	Interaktion	6	1.16	0.02*
<b>Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin</b>				
Lapatinib	Mono-Kombi	1	1.90	<0.01 **
	Interaktion	6	5.81	<0.01 **
Pazopanib	Mono-Kombi	1	3.58	0.02 *
	Interaktion	6	1.65	0.15
Trametinib	Mono-Kombi	1	0.04	0.12
	Interaktion	6	0.83	0.09
Dabrafenib	Mono-Kombi	1	0.06	0.22
	Interaktion	6	3.28	0.01 **

FG= Statistische Freiheitsgrade, F= Statistischer F-Wert, 5-FU= 5-Fluoruracil, p<sub>PS</sub>= zweifaktorielle Rangvarianzanalyse mit Messwiederholungen auf einem Faktor nach Puri und Sen.

## 4 Diskussion

Entsprechend der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister (GEKID) erkrankten im Jahr 2013 etwa 13.800 Menschen in Deutschland an einem oralen Plattenepithelkarzinom [31, 32]. Das PEC ist mit 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die sechsthäufigste Tumorerkrankung [143]. Zu den Grundsäulen der Behandlung des oralen PEC gehören die Tumoresektion mit Neck Dissection, die Radiatio und die Chemotherapie [144]. Trotz innovativer Konzepte in der medikamentösen Tumorthherapie, wie z.B. die monoklonalen Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab für die Therapie des rezidivierten/metastasierten PEC, zeigt sich seit Dekaden eine unveränderte, schlechte 5-Jahres-Überlebensrate von 55–60 % [2, 3]. Neben der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern haben sich TKI als weiterer Therapiefortschritt bei verschiedenen Tumorentitäten etabliert. TKI blockieren spezifische Tyrosinkinase-Rezeptoren und nachstehende Signalkaskaden von Tumorerkrankungen, was sich als vielversprechende Therapiealternative zeigte.

Tumorentstehung und Progression ist ein komplexes System aus wechselseitiger Interaktion des Tumors mit seiner Umgebung, sog. TME (Tumor microenvironment). Durch vermehrte Proliferation hervorgerufene Zirkulationsstörung entsteht eine Hypoxie des Gewebes und damit Ausschüttung von proangiogenen Faktoren, wie EGF, VEGF und PFGF. Sind entsprechende Rezeptoren überexprimiert oder alteriert, können Proliferation mit Hemmung der Apoptose und Neoangiogenese sowie Metastasierung die pathophysiologische Konsequenz sein. Im oralen PEC zeigen sich Mutationen bzw. Überexpressionen dieser Rezeptoren in wesentlichen Mengen und stehen im Verhältnis zur Gesamtüberlebensrate der Patienten.

Häufig vorkommende Therapie-Resistenzen können entweder aufgrund spezieller Zelleigenschaften oder als Reaktion der Zelle auf eine applizierte Chemo-, Hormon- oder Strahlentherapie entstehen. Auch durch einen sog. Tyrosinkinasenshift, der eine vermehrte Expression anderer, alternativer RTK beschreibt, die in die gleiche Endstrecke münden, können sich Resistenzen

entwickeln. Um diesen entgegen zu wirken, scheint eine Kombinationstherapie, die zum einen Einfluss auf das Tumorwachstum durch DNA-Interaktion ausübt, zum anderen zielgerichtet überexprimierte oder mutierte Signalwege blockiert, sinnvoll, um die Überlebensrate der Patienten zu verbessern [27].

5-FU Bereits 1979 konnte 5-FU in einer Studie von *Amer et al.* in der Behandlung von HNSCC Patienten eine Ansprechrate von 31 % gezeigt werden [145]. Viele Kombinationen mit 5-FU haben sich im Laufe der Jahre etabliert. Die Untersuchung der Wirkung von 5-FU auf die hier gegebenen PEC-Zelllinien sollte zum einen bisher festgestellte inhibitorische Effekte bestätigen und Unterschiede zwischen den Zelllinien zeigen sowie für die Bestimmung von  $IC_{50}$  für nachfolgende Kombinationsversuche dienen. In der vorliegenden Arbeit zeigte 5-FU an den Zelllinien PC52, SCC9 und SCC68 von allen getesteten Substanzen das stärkste zytotoxische Potential in der Monotherapie. Im niedrigen mikromolaren Bereich von 3,125  $\mu$ M konnte in allen Zelllinien eine Zellreduktion auf durchschnittlich 55 % erreicht werden. Analog dazu wurden ähnliche Ergebnisse in der Publikation von *Aderhold et al.* beschrieben. Dabei konnte 5-FU mit einer Konzentration von 0,5  $\mu$ mol/ml in HNSCC-Zelllinien die Expression von angiogenen Faktoren signifikant reduzieren [146].

Cisplatin ist ein zu den Platinverbindungen gehörendes Zytostatikum, das durch Bildung von Platinkomplexen die DNA-Replikation hemmt. In der Therapie von metastasierenden oder rezidivierenden PEC ist es als wirksames Medikament etabliert und stellt das Rückgrat der medikamentösen Tumorthherapie hierbei dar. Jedoch gehören Cisplatin-Resistenzen zu den großen Problemen aktueller Chemotherapien [147-150]. Eine Überexpression der MDR-Proteine MRP 1 und 2 (Multi-Drug-Resistance Related Protein, Effluxpumpen) konnte in HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden [151, 152]. Durch die Kombination von Cisplatin mit anderen Substanzklassen erhofft man sich das Wirksamkeitsprofil zu verbessern und diese verminderte Akkumulation zu verhindern. Hierbei können TKI, die Einfluss auf die Aktivität wie auch Expression von MDR-Transporter haben, eine entscheidende Rolle spielen. Cisplatin zeigte in PC1-1 und PC13-1 die stärkste Wirksamkeit von allen untersuchten Substanzen. Bei beiden konnte der Wirkstoff eine Zellreduktion auf 9 % erreichen. Das

Wirksamkeitsprofil von Cisplatin ist annähernd gleich stark wie das von 5-FU, zeigt jedoch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien. Ihr gemeinsamer Angriffsort im Zellkern scheint ursächlich. Die Ergebnisse zeigen Übereinstimmungen mit der Literatur. Wie in der Studie von *Mandic et al.*, in welcher die Wirksamkeit von Cisplatin in EGFR-Positiven HNSCC-Zelllinien durch EGFR-Stimulation verbessert wurde [153].

Lapatinib ist ein Dual-Inhibitor. Er ist in der Lage reversibel sowohl die Phosphorylierung des EGF(ErbB1)- als auch des HER2(ErbB2)-Rezeptors zu hemmen [154, 155]. Über Bindung an deren intrazelluläre ATP-Bindungsstellen werden die Tyrosinkinasen dieser Rezeptoren blockiert [155]. Amplifikationen und Mutationen von EGFR und HER2 sind bekannte starke onkogene Treiber und beide nachweislich im PEC überexprimiert [156-158]. Sie können alleine das ungehemmte Wachstum von Tumorzellen indizieren. Diesbezüglich konnte in vielen klinischen Studien dargestellt werden, dass EGFR- und HER2-Proteine Biomarker für ein aggressives Wachstum und deutlich schlechtere Prognose sowie verkürzte Überlebenszeit sind [154, 159]. Zusätzlich spielen erworbene Amplifikationen dieser Gene eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Resistenzen, daher ist es von besonderem Interesse weitere Inhibitoren mit neuen Kombinationen zu erörtern.

In der anti-EGFR-Therapie des HNSCC mittels *target therapies* ließen sich unterschiedliche Ergebnisse erkennen [160, 161]. Präklinische Studien zeigten antiproliferative Effekte bei gezielter Hemmung des EGFR Signalwegs mittels verschiedener Therapiestrategien, welche jedoch *in vivo* nur bei einem Teil der Patienten zu beobachten ist [162, 163]. Auch nach effektiver Blockade des Rezeptors bleiben alternative Signalwege bestehen, die weiteres Tumorstadium verursachen. Auch das refraktäre Verhalten der Tumorzellen nach bestimmter Inkubationszeit geht mit einer Wirkreduktion der Substanzen einher [164]. Der durch die FDA 2006 zugelassene monoklonale Antikörper Cetuximab zeigte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse bei *in vitro* Untersuchungen, jedoch wies er klinisch lediglich eine Ansprechrate von 10-13 % auf. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass EGFR-Mutationen speziell im Exon 20 (ca. 5 %) mit einer sekundären TKI-Resistenz assoziiert sind. Die meisten

Resistenzen basieren auf Mutationen im Bereich der Kinase-Domäne der betreffenden Gene, welche die Bindung der spezifischen Inhibitoren verhindert. Auch eine Überexpression anderer ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Bildung von Heterodimeren verwandter Rezeptor-Tyrosinkinasen wurden beobachtet. Erste Erfolge in der Überwindung von Resistenzen konnten durch die Kombination von Cetuximab mit Afatinib (Giotrif®) in HNSCC-Zellen *in vitro* und *vivo* gezeigt werden [165]. Auch Lapatinib soll in der HNSCC-Therapie Verwendung finden. Seine geringe Molekülgröße ermöglicht das Passieren der Blut-Hirn-Schranke und kann damit zur Therapie von zerebralen Metastasen eingesetzt werden [166].

Die untersuchten PEC-Zelllinien zeigen in der durchgeführten PCR eine starke Expression von EGFR in allen Zelllinien außer PC52, was einen starken zytotoxischen Effekt nach Bebrütung der Kulturen mit dem Medikament Lapatinib vermuten lässt. Im direkten Vergleich mit dem herkömmlichen Chemotherapeutikum Cisplatin liegt die mittlere inhibitorische Konzentration um ein Vielfaches höher. Nicht jedoch im Vergleich mit 5-FU. Hier konnte Lapatinib geringere IC<sub>50</sub>-Werte in den Zelllinien PC1-1 und PC13-1 erreichen. In diesen führte der TKI bereits im niedrigen mikromolaren Bereich zu einer starken Reduktion der Zellzahl. Mit einer maximalen Zellzahlreduktion von 17,644 ± 7,146 % (PC1-1) und 16,461 ± 0,788 % (PC13-1) zeigte Lapatinib das stärkste zytotoxische Potential von allen untersuchten TKI. Der Angriffspunkt EGFR scheint hier ein wesentlicher Vorteil zu sein, welcher in über 90 % aller PEC überexprimiert ist [167, 168]. Die geringere Wirkung auf PC52-Zellen könnte durch eine Überexpression anderer ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen erklärt werden. Anderenfalls könnte auch die Ausbildung von Heterodimeren verwandter Rezeptor-Tyrosinkinasen (ErbB-Familie) ursächlich sein. Die PCR ergab bei dieser Zelllinie entsprechend nur eine mittelhohe Gen-Expression von EGFR. Im Vergleich mit den TKI Pazopanib, Trametinib und Dabrafenib zeigt Lapatinib die geringsten IC<sub>50</sub>-Werte, welche sich in einer Bandbreite (1,125-31,366 µM) der getesteten herkömmlichen Chemotherapeutika befindet. Ähnlich positive Ergebnisse mit Lapatinib bestätigen auch Daten anderer Arbeitsgruppen. Unter *Diaz et al.* erreichte man nach der Verabreichung von

Lapatinib über 24 h in einer 2  $\mu$ M-Konzentration eine Hemmung des Zellwachstums von 35 % [169]. In der Studie von *Schrader et al.* konnte der Zusatz von Lapatinib die Wirkung von Cisplatin in HNSCC-Zelllinien verbessern [161], weshalb auch an den hier verwendeten PEC-Zelllinien Kombinationen mit verschiedenen Wirkstoffgruppen vorgenommen wurden. Auch *Harrington et al.* zeigte, dass die Kombination von Lapatinib und Radiochemotherapie in der Phase-II-Studie mit fortgeschrittenen HNSCC zu einer verbesserten Ansprechrate und erhöhten PFS, sowie OS [170].

In der vorliegenden Studie wurde Lapatinib mit 5-FU und Cisplatin kombiniert. Die Kombinationstherapie mit 5-FU ergab keinen deutlich synergistischen Effekt. Zwar zeigt die Zelllinie PC13-1 eine kleinere  $IC_{50}$  in der Kombination mit 5-FU im Vergleich zur Monotherapie, dieser Unterschied fällt jedoch sehr gering aus. Vorausgegangene Zelllinienversuche mit Erlotinib und 5-FU von *Brands et al.* ergaben ähnlich wie hier keine positiven Effekte. Ebenso scheint die Kombinationstherapie mit Cisplatin und Lapatinib keine additiven/synergistischen Effekte auszulösen.

Letztlich zeigte Lapatinib den erwarteten starken inhibitorische Effekt auf die EGFR-positiven PEC-Tumorzellen. Jedoch erbringen die Kombinationsversuche nicht den auf Grundlage von  $IC_{50}$  gewünschten synergistischen Effekt. Hinsichtlich der Zellzahlreduktion konnte aber eine Potenzierung der Ansprechrate durch 5-FU und Cisplatin auf Lapatinib gezeigt werden. Negative Wechselwirkung der Wirkstoffe können aufgrund der unterschiedlichen Angriffsorte ausgeschlossen werden. Der mäßige Effekt der Kombinationen kann anhand von alternativen Aktivierungswegen von ErbB-Familienmitgliedern wie auch die Aktivierung von RTK erklärt werden. RTK (z.B. MET), welche im Downstream nachgeschaltete Effektoren wie z.B. RAS/RAF/MEK/ERK aktivieren, können zu Zellproliferation und Hemmung der Apoptose führen. Auch andere Stimuli wie Hypoxie oder Aktivierung der Angiogenese-Signaltransduktion können als alternative Wege nicht außer Acht gelassen werden.

Pazopanib ist ein Multi-TKI und besitzt damit mehrere Angriffsorte verschiedener Signalwege. Der Multi-TKI inhibiert überwiegend VEGF-Rezeptor-1, -2 und -

3 sowie die Rezeptoren PDGFR- $\alpha$  und - $\beta$ , FGFR-1 und -3, c-FMS und den Stammzellofaktor-Rezeptor c-Kit und soll dadurch entscheidenden Einfluss auf die Neoangiogenese und somit das Tumorstadium und den Tumorstadium nehmen. *Broekmann et al.* hat den Vorteil der multi-targeted Therapie mittels TKI im Vergleich zur mono-targeted Therapie näher erörtert [171]. Entscheidender Vorteil ergibt sich bei Tumoren, welche einer Überexpression von mehreren Kinasen nachweisen, die zur Karzinogenese beizutragen scheinen. In diesem Zusammenhang wurden NSCLC und AML (Acute myeloid leukaemia) genannt. Jedoch ist die individuelle Tumorstadiumbiologie ausschlaggebend, welche Art der Therapie erfolgreicher ist. Auch an den hier verwendeten PEC-Zelllinien soll der Nutzen von TKI, die mehrere *targets* zum Ziel haben anhand von Pazopanib untersucht werden.

Schon vor vierzig Jahren konnten *Folkman* und Kollegen den signifikanten Einfluss angiogener Faktoren/ Rezeptoren auf das Tumorstadium nachweisen [172]. Als sog. *hallmark of cancer* stellt die Neoangiogenese einen komplexen Prozess der Gefäßneubildung dar, die durch die komplexe Interaktion verschiedener angiogener Faktoren und ihrer Rezeptoren induziert wird [173, 174]. Als Mitglied der VEGF-Familie repräsentiert VEGF-A den potentesten Stimulator der Angiogenese [175, 176]. Dieser ist im PEC überexprimiert und korreliert mit schlechterem DFS (disease free survival), OS (overall survival) und höherer Metastasierungsrate [177-181]. Steigende Expressionslevel von normaler Mundschleimhaut über Cis bis hin zum PEC lassen ein frühes Ereignis in der Transformation der Zellen vermuten [182]. Der meist diskutierte VEGFR Antikörper ist Bevacizumab. Dieser Antikörper bindet an VEGFR, hindert diesen an der Bindung mit seinem korrespondierenden Rezeptor und unterbindet so die Signaltransduktion [183-185]. Die Resultate dieser Therapiestrategie stellen sich jedoch sehr heterogen dar. So konnte Bevacizumab in der von *Fujita et al.* durchgeführten *in vitro* Untersuchung in HNSCC-Zelllinien keinen anti-proliferativen Effekt zeigen. Hingegen waren *in vivo*-Untersuchungen an Xenotransplantaten effektiver, wo enorme Antitumoreffekte beobachtet wurden. Des Weiteren zeigte die Kombination von Bevacizu-

mab mit Paclitaxel steigende Ansprechraten [186]. Starke Blutungen sind jedoch Teil problematischer Nebenwirkungen [187].

Die genaue Rolle der maßgeblichen Rezeptoren zur Entwicklung und Progression des PEC ist noch nicht gänzlich geklärt. Einzelnen Studien konnten die Überexpression von VEGFR1 und VEGFR2 im PEC aufzeigen [22, 188]. *Pentheroudakis et al.* konnten hohe Transkriptionsaktivität für VEGFR1+3, die zum Zeitpunkt des Rezidivs durch pro-angiogene Faktoren ausgelöst wurde, verdeutlichen [189]. In allen von uns untersuchten Zelllinien konnte eine Expression von VEGFR1+3 nachgewiesen werden. VEGFR2 konnte ausschließlich in SCC68 in schwacher Expression dargestellt werden. Die Inhibition dieser korrespondierenden Rezeptoren zeigt im Hinblick auf das PEC ebenso heterogene Ergebnisse. Zum einen konnten in Untersuchungen an Xenotransplantationsmodellen eine Tumolvolumenreduktion veranschaulicht werden, auf der anderen Seite blieb jedoch ein Effekt auf die Proliferation in *in-vitro*-Untersuchungen aus [186]. Die Angiogenese-Inhibitoren Axitinib, Vantedanib, Sorafenib und Pazopanib sind derzeit in klinischer Testung unterschiedlicher Phasen und zeigen ebenso heterogene Ergebnisse.

Mit dem *main-target* VEGFR ist die Untersuchung von Pazopanib auch an den hier verwendeten PEC-Zellen von besonderem Interesse, da hochregulierte Angiogenese durch VEGFR-Expression auch ein wichtiger Bestandteil häufiger Resistenzen gegenüber EGFR-Inhibitoren sein können. Zu genannten Studien konnten vergleichbare Ergebnisse im getesteten Konzentrationsrange von 100  $\mu\text{M}$  bis 800  $\mu\text{M}$  gezeigt werden. Dabei war der antiproliferative Effekt in der Tumorzelllinie PC1-1 mit einer Zellzahlreduktion auf  $20,059 \pm 3,147$  % und einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $62,647 \pm 1,191$   $\mu\text{M}$  am stärksten ausgeprägt. Im Vergleich zu den anderen TKI musste für Pazopanib, um vergleichbare zytotoxische Effekte darzustellen, eine höhere Ausgangskonzentration von 800  $\mu\text{M}$  gewählt werden. Ein annähernd resistentes Verhalten zeigte SCC9 mit einer maximalen Zellzahlreduktion auf  $52,921 \pm 12,211$  %. In dieser Zelllinie konnte erst ab einer Konzentration von über 100  $\mu\text{M}$  ein zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Die Vermutung, dass Pazopanib aufgrund seines Wirkspektrums ein stärkeres zytotoxisches Potential auf die Zelllinien besitzt, konnte nicht bestätigt werden.

Im Vergleich mit den TKI Lapatinib, Trametinib und Dabrafenib zeigt Pazopanib die zweithöchsten IC<sub>50</sub>-Werte, welche sich in einer Bandbreite von 62,6-170,9 µM befinden. Abb. 10 zeigt jedoch, dass die von Pazopanib inhibierten RTK in den untersuchten PEC-Zelllinien im Vergleich zu den *targets* der anderen TKI nur schwach exprimiert sind. Demnach kann die geringe Präsenz vom *main-target* VEGFR2 Ursache für das geringere Wirksamkeitsprofil sein.

Die erhofften synergistischen oder additiven Effekte konnten in der Kombinationstherapie mit 5-FU nicht beobachtet werden. Der Zusatz von 5-FU zeigte erst ab einer Konzentration von 800 µM Pazopanib ein besseres Wirkpotential als die Monotherapie. Jedoch stellt dies den Vorteil einer möglichen Dosisreduktion durch die Kombination der Wirkstoffe in Frage und zeigt zudem einen klinisch nicht umsetzbaren Dosisbereich. In Bezug auf die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte zeigte die Kombination mit Cisplatin nur in SCC9 einen synergistischen Effekt. In der Summe konnte jedoch die Kombination mit Cisplatin keine zufriedenstellenden Ergebnisse darstellen. Bei Betrachtung der Abb. 26 ergab die Kombination von Cisplatin bzw. 5-FU eine Verschlechterung des Wirksamkeitsprofils von Pazopanib. Die Ergebnisse aus den Kombinationsversuchen lassen eine inhibierende Interaktion der Wirkstoffgruppen vermuten. Dies kann sich unter anderem durch ein Löslichkeitsproblem oder eine verringerte Bindungsaffinität von Pazopanib an den RTK manifestieren. *Hamberg* und Kollegen belegten das Haupttarget für Pazopanib als VEGFR2, welcher in unseren Zelllinien nur minimal exprimiert ist. Dies könnte trotz dem breiten Spektrum exprimierter Rezeptoren ein Grund für die mäßige Wirksamkeit des verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitors sein [181]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei *Canter et al.* in *in vitro* renal cell carcinoma (RCC) Zelllinienversuchen [190]. Ebenso könnten durch Pazopanib induzierte ATP-binding cassette (ABC) Transporter, die u.a. Cisplatin zum Substrat haben können, für die schlechte Wirksamkeit der Kombinationstherapie ursächlich sein und eine sog. multidrug resistance (MDR) hervorrufen [191, 192]. Die Ergebnisse aus der Studie von *Paesler et al.* konnten an den untersuchten PEC-Zelllinien nicht bestätigt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass sich die zunächst hoch signifikante Ansprechrate ( $p < 0,01^{***}$ ) der verschiedenen Tumorzelllinien auf Pazopanib in der Monothe-

rapie durch die Zugabe von 5-FU bzw. Cisplatin annähert ( $p_{5-FU}=0.46$  und  $p_{Cis}=0.29$ ) und damit Pazopanib auf alle Zelllinien ähnlich wirkt.

Der FGFR-Signalweg ist an Prozessen wie Geweberegenerierung, -neubildung und Angiogenese beteiligt [193]. Ihre Dysregulation führt zur Beeinflussung nachgeschalteter Signalkaskaden wie z.B. dem Ras/MAPK-Signalweg [194, 195]. Folglich kann FGFR ein mögliches *target* zur Blockierung der Gefäßneubildung in der Therapie des PEC darstellen [196]. *Ipenburg* und Kollegen konnten die prognostische Wertigkeit der FGFR1-Expression in Krebsassoziierten Fibroblasten (CAF) verdeutlichen, jedoch scheint eine Aussage über die restlichen Rezeptoren im Hinblick auf aktuelle Literatur begrenzt und widersprüchlich [197]. So bleibt aufgrund aktueller Studien ihre Bedeutung für das PEC unklar. Es zeigt sich eine Expressions-Bandbreite dieser Rezeptoren im PEC von 12-100% [198-200]. Ähnliche heterogene Expression zeigt sich auch in den hier untersuchten Zelllinien. In Abb. 10 dargestellt, zeigt sich eine starke Expression von FGFR2 in allen Zelllinien, FGFR1 ist nur in PC52 und SCC68 stark exprimiert, sowie FGFR4 in SCC9. FGFR3 zeigt eine unterschiedlich schwache Expression. Die vergleichsweise schlechte Wirkung Pazopanibs auf die Zelllinien findet hierdurch keine Erklärung. Vielmehr könnte hier ebenso die Tatsache, dass VEGFR2 das Haupttarget des Inhibitors ist, eine entscheidende Rolle spielen. Der Vorteil des sog. *multi-targeted* Inhibitors mit einer gleichzeitigen einhergehenden Blockade mehrerer Signalwege scheint hier nicht zum Tragen zu kommen.

Trametinib Der mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalweg spielt gemeinsam mit dem PI3K-Signalweg eine entscheidende Rolle in der EGFR-vermittelten Regulation pro-angiogener Faktoren [201] und weist in 8 % der Fälle Mutationen im PEC auf [60, 188, 202]. Ein vielversprechendes *target* des MAPK-Signalwegs stellt MEK als einziger Aktivator von extracellular regulated kinase (ERK) [188], die wiederum für Wachstum, Migration und Proliferation der Zelle verantwortlich ist, dar. Dieser enthält in 33 % der Fälle aktivierende Mutationen im PEC [203]. In PEC Zellen korreliert die Aktivierung von MEK mit Cetuximab – und Bestrahlungsresistenzen [204-207]. Die zielgerichtete Inhibition von MEK1/2 mittels des TKI U0126 zeigte Wachstumsinhibition und

Bestrahlungssensitivierung *in vitro* [208-210]. Ebenso scheint eine MEK-Aktivierung direkt mit Resistenzen gegenüber PI3K-Inhibitoren zu korrelieren [211]. Trametinib dient als reversibler MEK1/2-Inhibitor. Verwendung findet dieser TKI seit 2013 in der Therapie von BRAF V600E-mutierten Melanomen [212]. In der vorliegenden Arbeit wies die Inkubation mit Trametinib antiproliferative Effekte auf. In den Zelllinien PC1-1 und PC13-1 konnte bereits im niedrigen mikromolaren Bereich (1,563  $\mu\text{M}$ ) eine starke Reduktion gezeigt werden. Der TKI erwies in PC1-1 das stärkste zytotoxische Potential mit einer maximalen Zellzahlreduktion auf  $18,987 \pm 3,059 \%$ . Auch in der Zelllinie SCC68 konnte sich die Zellzahl ähnlich wie in PC13-1 auf einen Wert von  $23,516 \pm 1,469 \%$  reduzieren. Diese starken antiproliferativen bzw. zytotoxischen Effekte scheinen direkt mit der starken Rezeptorexpression zu korrelieren. Die geringere Rezeptorexpression in Zelllinie SCC9 scheint mit einem schwächeren zytotoxischen Effekt einherzugehen. In vergleichbaren Studien zeigen sich ähnliche Ergebnisse. So konnte *Wirtz et al.* wie auch *Kang et al.* in *in-vitro*-Untersuchungen an PEC Zelllinien einen ebenso antiproliferativen Effekt aufzeigen. Die ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentrationen scheinen in einer weiten Bandbreite zu liegen.

Seit 2014 findet Trametinib in der Kombination mit Dabrafenib Verwendung in der Therapie von BRAF-mutierten metastasierenden Melanomen [126]. Auch die Kombination aus Vemurafenib und Trametinib weist eine signifikante Erhöhung der Apoptose und Hochregulation von BIM (Bcl-2-like protein 11) im Vergleich der einzelnen Substanzen auf. Die Arbeitsgruppe von *Joshi et al.* beschrieb diesen Effekt bei der Behandlung von Patienten mit BRAF-mutierten NSCLC [213]. Synergistische Effekte in der Kombinationstherapie bestehend aus Trametinib und dem selektiven PI3K-Inhibitor „HS-173“ an PEC-Zelllinien konnte von *Michmerhuizen et al.* aufgezeigt werden [214]. In der Kombination von Trametinib und 5-FU reagierten analog wie in der Monotherapie die Tumorzelllinien PC1-1 und PC13-1 am sensibelsten. Eine durch die Kombination stark erhöhte Zellzahlreduktion konnte in PC13-1 mit  $15,978 \pm 5,425 \%$  beobachtet werden. PC52 und SCC9 zeigten wie bereits in der Monotherapie eine geringere Sensitivität im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Durch den

Zusatz von 5-FU wurde jedoch in SCC9 eine höhere Zellreduktion als in der Trametinib-Monotherapie erreicht. Auf Grundlage der IC<sub>50</sub>-Werte konnte ein synergistischer Effekt in der Kombination mit 5-FU bei den Zelllinien PC1-1 und PC52 festgestellt werden.

Die Zugabe von Cisplatin zeigte in PC13-1 mit einer maximalen Zellzahlreduktion von 13,674 ± 7,176 % eine Verbesserung des zytotoxischen Potentials von Trametinib. Allerdings zeigen die IC<sub>50</sub>-Werte keine Veränderung. Zusammenfassend konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Mono- und Kombinationstherapie festgestellt werden, jedoch sind tendenziell bessere Zahlen bezüglich der Zellzahlreduktion durch die Wirkstoffkombination mit Cisplatin in den Zelllinien PC1-1, PC52 und SCC68 hervorgegangen. Trotz stärkerer Überexpression von MEK1/2 in SCC9, konnte Trametinib in dieser Zelllinie keine stärkeren inhibitorischen Effekte erzielen. Die Ursache der geringfügig verbesserten Ansprechrate in der Kombination kann durch etwaige Resistenzen gegenüber verwendeten Adjuvantien hervorgehen oder einer inhibitorischen Interaktion der Wirkstoffe zugrunde liegen. Resistenzen können unter anderem durch Aktivierung alternativer Aktivierungswege oder ABC-Transportern hervorgerufen werden.

Dabrafenib (Tafinlar®) hemmt das mutierte BRAF(BRAF(mut))-Protein mit BRAF(V600E) und BRAF(V600K)-Genotyp. Die Inhibition führt zu einer verringerten MEK- und ERK-Phosphorylierung, welche unter anderem Teil der RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade sind, die einen der wichtigsten Signalwege für das Überleben von HNSCC-Zellen darstellt [215]. In HNSCC kann RAS durch HRAS-Mutation oder durch Upstream-Signalisierung aktiviert werden. Dabrafenib fungiert als RAF-Inhibitor, der die anschließende Aktivierung von MEK/ERK verhindert und zu einer Abhängigkeit von MEK/ERK für das Zellüberleben führt. Es folgt eine Hemmung der Zellproliferation durch G1-Zyklusarrest und anschließend Zelltod [216]. Viele präklinische Studien konnten das inhibitorische Potential von Dabrafenib auf BRAF-mutierte Tumorzelllinien herausarbeiten. In der Literatur konnte die Arbeitsgruppe *Rheault et al.* eine überzeugende Hemmung durch Dabrafenib an B-Raf-V600E mutierten Melanomzelllinien und kolorektalen Tumorzelllinien beschreiben. Bei allen

wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert im nanomolaren Bereich ermittelt [217]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch an kolorektalen Tumorzelllinien von *Hirschi et al.* 2014 veröffentlicht [218]. *Weber et al.* zeigte jedoch, dass das Vorkommen von BRAF-Mutationen in HNSCC mit 3% relativ selten ist. Trotzdem zeigen sich HNSCC-Patientengruppen, welche sich sensitiv auf eine BRAF-Inhibition verhalten [219].

Auf Grund des *targets* wurde Dabrafenib primär als Kontrolle in die vorliegende Arbeit mit einbezogen. Zwar zeigt die durchgeführte Rezeptorexpressionsanalyse eine überdurchschnittlich starke Expression des Rezeptors, aber aufgrund des geringen Vorkommens in HNSCC-Zellen, ist man primär von einer mäßigen Wirkung des applizierten TKI ausgegangen [219, 220].

Ein antiproliferativer bzw. zytotoxischer Effekt konnte ab einer Konzentration von 75 µM beobachtet werden. Die Tumorzelllinien PC1-1 und PC13-1 reagierten am sensibelsten und zeigten bei einer Konzentration von 600 µM die stärkste Zellreduktion auf 25,606 ± 3,090 % und 22,585 ± 9,160 %. Das geringste zytotoxische Potential wurde in der Zungenkarzinomzelllinie SCC9 mit einer maximalen Zellzahlreduktion auf 65,492 ± 8,163 % bei der maximalen Dosis von 600 µM beobachtet. Im direkten Vergleich der einzelnen TKI zeigt Dabrafenib mit Abstand den höchsten IC<sub>50</sub>-Wert. Ebenfalls können synergistische/additive Effekte in der Kombinationstherapie mit 5-FU und Cisplatin in der Summe nicht bestätigt werden. Eine Rekrutierung alternativer Aktivierungswege, fehlende Rezeptorexpression oder die Aktivierung von ABC-Transportern könnten ursächlich sein. *Corcoran et al.* zeigt in der 2018 veröffentlichten Arbeit, dass die mangelnde Wirksamkeit von BRAF-Inhibitor Dabrafenib in kolorektalen Karzinomen und BRAF(V600E)-Melanomen auf eine adaptive Rückkopplungsreaktivierung der MAPK-Signalgebung zurückzuführen ist, welche häufig den EGFR vermittelt wird, welcher wiederum in 90% der Fälle im hier untersuchten HNSCC überexprimiert ist [221]. Der Verlust der negativen Rückkopplung induziert die RAS-Aktivität und Aktivierung anderer RAF-Kinase, die die Wirkung des BRAF-Inhibitors umgehen und den MAPK-Signalweg wiederherstellen. Die dargestellten Ergebnisse können Rückschluss auf die mäßige Wirksamkeit an den hier untersuchten HNSCC-Zelllinien geben. Trotz

der mäßigen Ansprechrate in der hiesigen Untersuchung scheint BRAF V600E ein ansprechendes Onkogen und *target* in anderen Tumorentitäten zu sein. So zeigte der BRAF-Inhibitor Vemurafenib (Zelboraf®) nicht nur in Melanomen eine gute Ansprechrate, sondern auch wie in der Studie von *Hyman et al.* dargestellt in multiplen non-Melanom-Karzinomen (NSCLC, Schilddrüsenkarzinom) [222-224]. Ein wichtiger Anhaltspunkt scheint die Kombination von BRAF- und EGFR-Inhibierung, welche eine verbesserte MAPK-Unterdrückung hervorruft und zur Tumorregression führt.

Die Kombinationstherapie aus Dabrafenib und 5-FU bzw. Cisplatin zeigt in der vorliegenden Arbeit mit der Monotherapie vergleichbare Ergebnisse. Die Tumorzelllinien PC1-1 und PC13-1 zeigen die größte Sensitivität gegenüber der applizierten Kombination mit 5-FU. Ein synergistischer Effekt kann nach Berechnung des Kombinationsindex ausschließlich für PC1-1 angenommen werden. Die maximale Zellzahlreduktion verstärkt sich nach Zugabe des Zytostatikums von  $22,585 \pm 9,160$  % auf  $20,437 \pm 13,588$  %. Die Zelllinie SCC9 weist die geringste Sensitivität gegenüber der Kombinationstherapie mit 5-FU auf. Ebenso zeigt sich für die Zelllinie PC13-1 ein synergistischer Effekt in der Kombination mit Cisplatin. In Bezug auf die maximale Zellzahlreduktion zeigen beide Kombinationen in allen Zelllinien außer PC1-1 (DAB/Cis) ein stärkeres zytotoxisches Potential als die Monotherapie. Das homogene Ansprechverhalten der Zelllinien in der Dabrafenib-Monotherapie ( $p_{5-FU}=0.09$ ;  $p_{Cis}=0.22$ ; Tab.12) weist durch den Zusatz von 5-FU und Cisplatin signifikante Unterschiede auf. Anhand des Vergleichs der Interaktion wirkt die Kombination bei einer bestimmten Konzentration von Dabrafenib ( $\geq 300$   $\mu$ M) besser als die Monotherapie ( $p_{5-FU}=0.02$ ;  $p_{Cis}=0.01$ ; Tab.12). Diese gemessenen Konzentrationen liegen jedoch nicht im klinisch anwendbaren Bereich. Zusammenfassend stellt sich eine Erhöhung der  $IC_{50}$ -Werte dar, das einen antagonistischen Effekt vermuten lässt. Die Tatsache, dass Cisplatin im Verlauf zur Hochregulation von ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) und ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2), denen Dabrafenib als Substrat dient, führt, könnte ursächlich für diesen Umstand sein [225, 226]. Des Weiteren

können ABC Transporter für einen Efflux von 5-FU aus der Zelle verantwortlich sein und für eine Reduzierung der Wirksamkeit sorgen [227].

Schlussfolgernd konnten die großen Erwartungen in der Therapie des PEC mittels TKI nicht erfüllt werden. Einzelne kleine positive Effekte zeigten sich zwar in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie. Eine vielversprechend signifikante Verbesserung zu der herkömmlichen Chemotherapie blieb jedoch aus. Ursächlich könnte die Aktivierung alternativer Signalwege sein, die trotz Inhibition des spezifischen Rezeptors zum Fortlauf der Signalkaskade führt. Zum anderen ist die Heterogenität des PEC ein Grund für das erschwerte Ansprechen der Therapie. Für eine weitere reduzierte Wirksamkeit der Medikamente tragen ABC Transporter bei. Ähnlich heterogene Ergebnisse zeigen auch andere Studien, weshalb weiterhin ein großer Fortschritt in der Therapie des PEC mit TKI ausbleibt.

## 5 Zusammenfassung

Mutationen und Expressionsänderungen im Bereich der RTK sind Bestandteil der Pathogenese des oralen PEC. Insbesondere die Überexpression des EGFR ist mit 90 % die am häufigsten auftretende Veränderung, jedoch zeigen auf diese Mutationen zielgerichtete Therapie-Formen nicht die gewünschten Erfolge. Angesichts der sich schnell entwickelnden Platinresistenzen und der schlechten 5-Jahre-Überlebensrate von 55–60 %, scheint die Identifikation innovativer Therapieregime durch Kombinationstherapien mittels TKI ein möglicher Ansatz.

Die vorliegende Untersuchung sollte die Wirksamkeit von Lapatinib, Pazopanib, Trametinib, Dabrafenib und in der Monotherapie sowie in Kombination mit herkömmlichen Zytostatika 5-FU und Cisplatin auf das orale PEC untersuchen. Alle Versuche wurden dabei an humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien (PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68) durchgeführt.

Die einzelnen Zelllinien zeigten differentielle Ansprechraten bezüglich der applizierten Mono- und Kombinationstherapien, sowie unterschiedliche RTK Expressionen. Ein direktes Verhältnis zwischen Wirkpotential der untersuchten TKI und Rezeptorexpression scheint nicht zu bestehen. Die TKI konnten in allen Zelllinien eine Zellreduktion hervorrufen. Besonders sensibel reagierten die Zellen auf EGF-Inhibitoren (Lapatinib und Trametinib). Lapatinib ist mit einer kumulativen  $IC_{50}$  von 15,69  $\mu\text{M}$  der wirkungsstärkste TKI in der Monotherapie, gefolgt von Trametinib (17,71  $\mu\text{M}$ ), Pazopanib (108,47  $\mu\text{M}$ ) und Dabrafenib (152,18  $\mu\text{M}$ ). Eine Überlegenheit von Pazopanib als *multi-targeted* TKI gegenüber der *single-targeted therapy* konnte nicht dargestellt werden. Dabrafenib wurde primär aufgrund des *targets* als Kontrolle in die Arbeit mit einbezogen und zeigte eine erwartete mäßige Wirkung bei allen Tumorzelllinien. Zusammenfassend liegen die ermittelten inhibitorischen Konzentrationen der Monotherapie teilweise massiv über denen der herkömmlichen Chemotherapeutika. Dieser Sachverhalt könnte auf die Aktivität alternativer Signalkaskaden und/oder die wesentliche Heterogenität des Tumors zurückzuführen sein.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Kombinationstherapie mit Cisplatin. Auch hier scheinen die EGFR-Inhibitoren Lapatinib und Trametinib aufgrund einer niedrigen  $IC_{50}$  überlegen zu sein. In der Kombinationstherapie mit Cisplatin zeigt Trametinib sogar mit einer kumulativen  $IC_{50}$  von 18,66  $\mu\text{M}$  ein stärkeres inhibitorisches Potential als Lapatinib (38,45  $\mu\text{M}$ ). Jedoch wird bei näherer Betrachtung deutlich, dass Kombinationen mit Cisplatin ausschließlich in den Versuchsreihen mit Dabrafenib und Lapatinib eine Verbesserung bezüglich der max. Zellzahlreduktion ergaben. Ursache könnte unter anderem der Einfluss von ABC-Transportern sein, welche Cisplatin als Substrat haben. Das gleiche Bild zeigt sich für die Kombination mit 5-FU, sodass sich an der Reihenfolge der TKI nichts ändert, allerdings Dabrafenib von der Kombination erneut am meisten profitiert. Additive Effekte mit 5-FU konnten für zwei von fünf Zelllinien mit Trametinib und für eine von fünf Zelllinien mit Dabrafenib und Lapatinib festgestellt werden.

Die hohen Erwartungen an die *targeted therapy* durch die Inhibition verschiedener Tyrosinkinase im oralen PEC konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr scheinen diese ihre Limitation in der Komplexität des Tumors zu finden, was sich auch in nur leichten additiven Effekten in den untersuchten Kombinationstherapien mit herkömmlichen Chemotherapeutika widerspiegelt. Weitere Studien scheinen nur wenig sinnvoll. Jedoch zeigen andere Vertreter der zielgerichteten Therapie, die Substanzklassen der second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC)-mimetics vielversprechende Ergebnisse in ersten eigenen Zelllinienversuchen, so dass eine Fortführung dieser sinnvoller erscheint.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kopke, L.F. and B. Konz, [*Micrographic surgery. A current methodological assessment*]. *Hautarzt*, 1995. **46**(9): p. 607-14.
2. Howaldt, H.P., et al., [*Results of the DOSAK tumor register*]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2000. **4 Suppl 1**: p. S216-25.
3. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
4. Forastiere, A.A., *Is there a new role for induction chemotherapy in the treatment of head and neck cancer?* *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(22): p. 1647-9.
5. Forastiere, A.A., et al., *Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(22): p. 2091-8.
6. Forastiere, A.A., et al., *Head and neck cancer: recent advances and new standards of care*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(17): p. 2603-5.
7. Marur, S. and A.A. Forastiere, *Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment*. *Mayo Clin Proc*, 2008. **83**(4): p. 489-501.
8. Cooper, J.S., et al., *Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(19): p. 1937-44.
9. Gelbard, A., et al., *Combination chemotherapy and radiation of human squamous cell carcinoma of the head and neck augments CTL-mediated lysis*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(6): p. 1897-905.
10. Kater, B., *Investigation of the apoptosis-inducing and drug resistance-overcoming properties of novel organometallic compounds with special respect to a ferrocene amino acid derivative*, in *Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin*. 2014, Freie Universität Berlin. p. 65.
11. Zander, T. and M. Hallek, [*Tyrosine kinase inhibitors in oncology*]. *Internist (Berl)*, 2011. **52**(5): p. 595-600.
12. Bennisroune, A., et al., *Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. **50**(1): p. 23-38.
13. Saranath, D., et al., *Amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor gene in human oropharyngeal cancer*. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1992. **28B**(2): p. 139-43.
14. Grandis, J.R. and D.J. Tweardy, *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer*. *Cancer Res*, 1993. **53**(15): p. 3579-84.
15. Genomics, c.f.C. *Cross-cancer alteration summary for EGFR (6 studies / 1 gene)*. Available from:

- [http://www.cbioportal.org/cross\\_cancer.do?cancer\\_study\\_list=&cancer\\_study\\_id=all&data\\_priority=0&case\\_ids=&gene\\_set\\_choice=user-defined-list&gene\\_list=EGFR%0D%0A&clinical\\_param\\_selection=null&tab\\_index=tab\\_visualize&Action=Submit-crosscancer/overview/0/EGFR%0A/hnsc\\_broad%2Chnsc\\_jhu%2Chnsc\\_tcga%2Chnsc\\_tcga\\_pub%2Cnpc\\_nusingapore%2Cacyc\\_mskcc](http://www.cbioportal.org/cross_cancer.do?cancer_study_list=&cancer_study_id=all&data_priority=0&case_ids=&gene_set_choice=user-defined-list&gene_list=EGFR%0D%0A&clinical_param_selection=null&tab_index=tab_visualize&Action=Submit-crosscancer/overview/0/EGFR%0A/hnsc_broad%2Chnsc_jhu%2Chnsc_tcga%2Chnsc_tcga_pub%2Cnpc_nusingapore%2Cacyc_mskcc)  
[15.03.2015]
16. Rubin Grandis, J., et al., *Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Cancer*, 1996. **78**(6): p. 1284-92.
  17. Ang, K.K., et al., *Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma*. *Cancer Res*, 2002. **62**(24): p. 7350-6.
  18. Chung, C.H., et al., *Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(25): p. 4170-6.
  19. Temam, S., et al., *Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(16): p. 2164-70.
  20. Keren, S., et al., *Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: a meta-analysis*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(3): p. 2285-95.
  21. Lalla, R.V., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003. **129**(8): p. 882-8.
  22. Neuchrist, C., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Laryngoscope*, 2001. **111**(10): p. 1834-41.
  23. Fribley, A.M., *Targeting Oral Cancer*. Vol. 1. 2016, Springer®.
  24. Meyer, S.H., C.; Vogt, T., *Die Rolle der Rezeptortyrosinkinasen in der Angiogenese*. *Der Hautarzt*, 2002. **53**(9): p. 629-643.
  25. Druker, B.J., *Molecularly targeted therapy: have the floodgates opened?* *Oncologist*, 2004. **9**(4): p. 357-60.
  26. Krebsforschungszentrum, d.D. *Zielgerichtete Krebstherapie*. 2013; Available from: <https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/moderne-krebstherapien.php>. [12.12.2018]
  27. Grunwald, V. and M. Hidalgo, *Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(12): p. 851-67.
  28. *Deutsche Leitlinie: Plattenepithelkarzinom der Haut, der Lippen und der Augenlider*. Available from: [http://www.krebsgesellschaft.de/download/leitlinie\\_spinaliom\\_ado\\_2005.pdf](http://www.krebsgesellschaft.de/download/leitlinie_spinaliom_ado_2005.pdf). [12.12.2018]
  29. Marshall Austin, R., *Plattenepithelkarzinom*.
  30. Schwenzer, N.E., M., *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde. 2011.

31. <http://www.krebshilfe.de/deutsche-krebshilfe.html>. [20.08.2016]
32. (GEKID), G.d.e.K.i.D. 2013; Available from: [http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen\\_D.php?Method=INCIDENCE\\_EU&ICD10=C00-C14&Year\\_from=2008&Year\\_to=2012&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on](http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=INCIDENCE_EU&ICD10=C00-C14&Year_from=2008&Year_to=2012&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on). [15.03.2013]
33. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(4): p. 225-49.
34. Hashim, D., et al., *Hormone factors play a favorable role in female head and neck cancer risk*. Cancer Med, 2017. **6**(8): p. 1998-2007.
35. Sturgis, E.M., et al., *XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis*. Carcinogenesis, 2000. **21**(12): p. 2219-23.
36. Rothenberg, S.M. and L.W. Ellisen, *The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma*. J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 1951-7.
37. Zhou, G., Z. Liu, and J.N. Myers, *TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response*. J Cell Biochem, 2016. **117**(12): p. 2682-2692.
38. Velleuer, E. and R. Dietrich, *Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma*. Mol Cell Pediatr, 2014. **1**(1): p. 9.
39. Manyam, B.V., et al., *Inferior outcomes in immunosuppressed patients with high-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation therapy*. J Am Acad Dermatol, 2015. **73**(2): p. 221-7.
40. Dayyani, F., et al., *Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)*. Head Neck Oncol, 2010. **2**: p. 15.
41. Metelmann, H.R., et al., *[Treatment of curatively inoperable mouth cancers]*. Fortschr Kiefer Gesichtschir, 1992. **37**: p. 71-2.
42. Shingaki, S., et al., *Squamous cell carcinomas of the mandibular alveolus: analysis of prognostic factors*. Oncology, 2002. **62**(1): p. 17-24.
43. Krebsgesellschaft, D. © *Leitlinienprogramm Onkologie | S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom*. 2012; Available from: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/007\\_100OLk\\_S3\\_Mundhoehlenkarzinom\\_112012-122015.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007_100OLk_S3_Mundhoehlenkarzinom_112012-122015.pdf). [20.05.2015]
44. Breuninger, H.S., G.; Kortmann, R.-D., *Leitlinie Plattenepithelkarzinom*. Deutsche Krebsgesellschaft, 2005.
45. Bernier, J., *Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation*. Semin Radiat Oncol, 2009. **19**(1): p. 3-10.
46. Lamont, E.B. and E.E. Vokes, *Chemotherapy in the management of squamous-cell carcinoma of the head and neck*. Lancet Oncol, 2001. **2**(5): p. 261-9.
47. Bernier, J. and J.S. Cooper, *Chemoradiation after surgery for high-risk head and neck cancer patients: how strong is the evidence?* Oncologist, 2005. **10**(3): p. 215-24.

48. Pignon, J.P., et al., *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients*. *Radiother Oncol*, 2009. **92**(1): p. 4-14.
49. Kuhnt, T., et al., *Aggressive simultaneous radiochemotherapy with cisplatin and paclitaxel in combination with accelerated hyperfractionated radiotherapy in locally advanced head and neck tumors. Results of a phase I-II trial*. *Strahlenther Onkol*, 2003. **179**(10): p. 673-81.
50. *A phase III randomised trial of cisplatin, methotrexate, cisplatin + methotrexate and cisplatin + 5-FU in end stage squamous carcinoma of the head and neck*. Liverpool Head and Neck Oncology Group. *Br J Cancer*, 1990. **61**(2): p. 311-5.
51. Wehling, M., *Klinische Pharmakologie*. 2005: p. 357-359.
52. Forastiere, A.A., et al., *Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study*. *J Clin Oncol*, 1992. **10**(8): p. 1245-51.
53. Reisner, K.H., R., Wulf, *Die Strahlentherapie von Hautkarzinomen aus heutiger Sicht*. *Dtsch Arztebl* 2005. **102**(20): p. A-1454 / B-1217 / C-1153.
54. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 567-78.
55. De Andres, L., et al., *Randomized trial of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil versus carboplatin and fluorouracil in patients with stage IV-M0 head and neck cancer*. *J Clin Oncol*, 1995. **13**(6): p. 1493-500.
56. Lokich, J. and N. Anderson, *Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature*. *Ann Oncol*, 1998. **9**(1): p. 13-21.
57. Cohen, E.E., et al., *Phase II trial of gefitinib 250 mg daily in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(23): p. 8418-24.
58. Soulieres, D., et al., *Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(1): p. 77-85.
59. Machiels, J.P., et al., *Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(5): p. 583-94.
60. Mountzios, G., T. Rampias, and A. Psyrris, *The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(10): p. 1889-900.
61. Ayllon Barbellido, S., et al., *Gene therapy in the management of oral cancer: review of the literature*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2008. **13**(1): p. E15-21.
62. Ganly, I., D.S. Soutar, and S.B. Kaye, *Current role of gene therapy in head and neck cancer*. *Eur J Surg Oncol*, 2000. **26**(4): p. 338-43.

63. Astsaturon, I., R.B. Cohen, and P. Harari, *EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. **7**(7): p. 650-65.
64. Schoffski, P., et al., *Docetaxel and cisplatin: an active regimen in patients with locally advanced, recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Results of a phase II study of the EORTC Early Clinical Studies Group*. *Ann Oncol*, 1999. **10**(1): p. 119-22.
65. Glisson, B.S., et al., *Phase II Trial of docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(6): p. 1593-9.
66. Guigay, J., et al., *Cetuximab, docetaxel, and cisplatin as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a multicenter, phase II GORTEC study*. *Ann Oncol*, 2015.
67. Pignon, J.P., et al., *Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*. *Lancet*, 2000. **355**(9208): p. 949-55.
68. Bertino, E.M., et al., *A Phase I Trial to Evaluate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Cetuximab and Lenalidomide in Advanced Colorectal and Head and Neck Cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2016. **15**(9): p. 2244-50.
69. Blaszczyk, W., et al., *Clinical value of monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma*. *Med Oncol*, 2017. **34**(4): p. 60.
70. Wagener, C.M., O., *Molekulare Onkologie*. Vol. 3. 2010. 206-217.
71. Ullrich, A. and J. Schlessinger, *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. *Cell*, 1990. **61**(2): p. 203-12.
72. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
73. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. *Nature*, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
74. Klinac, D., et al., *Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 54.
75. McArthur, G., *Exploring the Pathway: The RAS/RAF/MEK/ERK Pathway Fact Sheet*. ASCO ANNUAL MEETING, 2015.
76. Montmayeur, J.P., et al., *The platelet-derived growth factor beta receptor triggers multiple cytoplasmic signaling cascades that arrive at the nucleus as distinguishable inputs*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(51): p. 32670-8.
77. Stuttfeld, E. and K. Ballmer-Hofer, *Structure and function of VEGF receptors*. *IUBMB Life*, 2009. **61**(9): p. 915-22.
78. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 211-25.
79. Rassow, J.H., K., *MLP Duale Reihe Biochemie*. 2008.

80. Alves, F.H., W., *Tyrosinkinaseinhibitoren Ein Ansatz zur Pathogeneseorientierten Tumortherapie*. *Der Internist*, 1997. **38**(11): p. 1074-1082.
81. Favoni, R.E. and A. de Cupis, *The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(2): p. 179-206.
82. Gish, G., et al., *Biochemical analysis of SH2 domain-mediated protein interactions*. *Methods Enzymol*, 1995. **254**: p. 503-23.
83. Karlsson, T., et al., *Molecular interactions of the Src homology 2 domain protein Shb with phosphotyrosine residues, tyrosine kinase receptors and Src homology 3 domain proteins*. *Oncogene*, 1995. **10**(8): p. 1475-83.
84. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
85. Vorsteher, N.F., *Expressionsmuster und prognostische Relevanz der menschlichen Wachstumsfaktorrezeptoren (HER) in Plattenepithelkarzinomen der Zervix*. 2010, Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin.
86. Oka, K., T. Nakano, and T. Arai, *c-erbB-2 Oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix*. *Cancer*, 1994. **73**(3): p. 664-71.
87. Prost, S., et al., *Association of c-erbB2-gene amplification with poor prognosis in non-inflammatory breast carcinomas but not in carcinomas of the inflammatory type*. *Int J Cancer*, 1994. **58**(6): p. 763-8.
88. Harari, P.M., *Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology*. *Endocr Relat Cancer*, 2004. **11**(4): p. 689-708.
89. Weiss, J., et al., *Interaction potential of the multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor dovitinib with drug transporters and drug metabolising enzymes assessed in vitro*. *Pharmaceutics*, 2014. **6**(4): p. 632-50.
90. Deininger, M.W. and B.J. Druker, *Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib*. *Pharmacol Rev*, 2003. **55**(3): p. 401-23.
91. Hochhaus, A.B., G.; Brümmendorf, T.H. *Leitlinien: Chronische Myeloische Leukämie (CML)*. 2013; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myeloische-leukaemie-cml>. [12.12.2018]
92. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 7099-109.
93. Kaiser, P.K., *Antivasculare endotheliale Wachstumsfaktorsubstanzen und ihre Entwicklung: therapeutische Implikationen in ophthalmologischen Erkrankungen*. *Am J Ophthalmol*, 2006. **142**(4): p. 660-8.
94. Ott, I.G., R., *Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika*. *Pharmazie in unserer Zeit*, März 2006. **35**(2): p. 124-133.

95. Voigt, W.D., A.; Schmoll, H.-J., *Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz*. Pharmazie in unserer Zeit, März 2006. **35**(2): p. 134-143.
96. Lippert, B.B., W., *Platin-Komplexe in der Krebstherapie*. Chemie in unserer Zeit, 2004. **17**(6): p. 190-199.
97. RoteListe®. *Cisplatin 0,5 mg/ml Lösung medac Infusionslösung*. 2016; Available from: <http://online.rote-liste.de/suche/praep/7851>. [20.08.2016]
98. Yoshiba, S., et al., *Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest*. Oral Oncol, 2009. **45**(2): p. 109-15.
99. Yasumatsu, R., et al., *The role of dihydropyrimidine dehydrogenase expression in resistance to 5-fluorouracil in head and neck squamous cell carcinoma cells*. Oral Oncol, 2009. **45**(2): p. 141-7.
100. RoteListe®. *5-FU HEXAL® 50 mg/ml Injektionslösung*. 2016; Available from: <http://www.patienteninfo-service.de/a-z-liste/f/5-fu-hexalR-50-mgml-injektionsloesung/>. [12.12.2018]
101. [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000795/WC500044958.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000795/WC500044958.pdf). [12.12.2018]
102. Bonomi, P., *Clinical studies with non-irressa EGFR tyrosine kinase inhibitors*. Lung Cancer, 2003. **41 Suppl 1**: p. S43-8.
103. Xia, W., et al., *Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways*. Oncogene, 2002. **21**(41): p. 6255-63.
104. Baselga, J.B., I.; Eidtmann, H.; Di Cosimo, S., *Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial*. The Lancet, 2012. **379**(9816): p. 633-640.
105. Geyer, C.E., et al., *Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(26): p. 2733-43.
106. Cameron, D., et al., *A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **112**(3): p. 533-43.
107. Zhou, X., et al., *Lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone for HER2+ (ErbB2+) metastatic breast cancer: quality-of-life assessment*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **117**(3): p. 577-89.
108. RoteListe®, *Tyverb® 250 mg Filmtabletten*. 2015.
109. Agency, E.M., *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels: Tyverb*.
110. KEGG, *DRUG: D08108 Lapatinib*. 2015.
111. [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/001141/WC500094273.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/001141/WC500094273.pdf). [12.12.2018]
112. Al-Marrawi, M.Y. and B. Rini, *Pazopanib for the treatment of renal cancer*. Expert Opin Pharmacother, 2011. **12**(7): p. 1171-89.

113. Keisner, S.V. and S.R. Shah, *Pazopanib: the newest tyrosine kinase inhibitor for the treatment of advanced or metastatic renal cell carcinoma*. *Drugs*, 2011. **71**(4): p. 443-54.
114. Pick, A.M. and K.K. Nystrom, *Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma*. *Clin Ther*, 2012. **34**(3): p. 511-20.
115. Sleijfer, S., et al., *Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European organisation for research and treatment of cancer-soft tissue and bone sarcoma group (EORTC study 62043)*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(19): p. 3126-32.
116. van der Graaf, W.T., et al., *Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. *Lancet*, 2012. **379**(9829): p. 1879-86.
117. <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/2010016-Votrient.pdf>. [12.12.2018]
118. GlaxoSmithKline. *Produktinformation: Votrient*. Available from: [https://www.gsksource.com/gskprm/en/US/adirect/gskprm?cmd=ProductDetailPage&product\\_id=1336067580985&featureKey=603422-nlmhighlights](https://www.gsksource.com/gskprm/en/US/adirect/gskprm?cmd=ProductDetailPage&product_id=1336067580985&featureKey=603422-nlmhighlights). [20.08.2015]
119. RoteListe®, *Votrient® 200 mg/-400 mg Filmtabletten*. [2015]
120. KEGG. *DRUG: D05380 Pazopanib*. 2015; Available from: [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?dr:D05380](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?dr:D05380). [12.12.2018]
121. Lange, F., et al., *Biological and molecular effects of small molecule kinase inhibitors on low-passage human colorectal cancer cell lines*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 568693.
122. Falchook, G.S., et al., *Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(8): p. 782-9.
123. Masuda, S. and J.C. Izpisua Belmonte, *Trametinib for patients with advanced melanoma*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(10): p. e409; author reply e409-10.
124. Salama, A.K. and K.B. Kim, *Trametinib (GSK1120212) in the treatment of melanoma*. *Expert Opin Pharmacother*, 2013. **14**(5): p. 619-27.
125. DRUG, F.U.S.F. *FDA grants regular approval to dabrafenib and trametinib combination for metastatic NSCLC with BRAF V600E mutation*. FDA 2017; Available from: <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm564331.htm>. [12.12.2018]
126. Dossett, L.A., R.R. Kudchadkar, and J.S. Zager, *BRAF and MEK inhibition in melanoma*. *Expert Opin Drug Saf*, 2015: p. 1-12.
127. European Commission, P.H.; Available from: [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140630128759/anx\\_128759\\_de.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140630128759/anx_128759_de.pdf). [14.05.2016]
128. GlaxoSmithKline. *Produktinformation: Mekinist*. Available from: <https://www.gsksource.com/gskprm/htdocs/documents/MEKINIST-PI-PIL.PDF>. [14.05.2016]
129. KEGG, *DRUG: D10175 Trametinib*. 2015.

130. Menzies, A.M., G.V. Long, and R. Murali, *Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma*. *Drug Des Devel Ther*, 2012. **6**: p. 391-405.
131. Ballantyne, A.D. and K.P. Garnock-Jones, *Dabrafenib: first global approval*. *Drugs*, 2013. **73**(12): p. 1367-76.
132. Garnett, M.J. and R. Marais, *Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(4): p. 313-9.
133. Greaves, W.O., et al., *Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma*. *J Mol Diagn*, 2013. **15**(2): p. 220-226.
134. Gibney, G.T. and J.S. Zager, *Clinical development of dabrafenib in BRAF mutant melanoma and other malignancies*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013. **9**(7): p. 893-9.
135. Long, G.V., et al., *Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(11): p. 1087-95.
136. KG, G.G.C. *Dossier zur Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V. 2011*; Available from: [https://www.g-ba.de/downloads/92-975-388/2013-09-19\\_Modul1\\_Dabrafenib.pdf](https://www.g-ba.de/downloads/92-975-388/2013-09-19_Modul1_Dabrafenib.pdf). [12.12.2018]
137. Agency, E.M. *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Tafinlar® (Dabrafenib)*. Available from: [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20141121130071/anx\\_130071\\_de.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20141121130071/anx_130071_de.pdf). [12.12.2018]
138. GlaxoSmithKline. *Produktinformation: Tafinlar*. Available from: <http://gsksource.com/gskprm/htdocs/documents/TAFINLAR-PI-MG.PDF>. [14.05.2016]
139. RoteListe®, *Tafinlar® 50 mg/-75 mg Hartkapseln*. 2015.
140. KEGG. *DRUG: D10064 Dabrafenib*. 2015; Available from: [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?dr:D10064](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?dr:D10064). [12.12.2018]
141. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. *Adv Enzyme Regul*, 1984. **22**: p. 27-55.
142. Tallarida, R.J., *The interaction index: a measure of drug synergism*. *Pain*, 2002. **98**(1-2): p. 163-8.
143. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(2): p. 74-108.
144. Thiele, O.C., et al., *The role of elective supraomohyoidal neck dissection in the treatment of early, node-negative oral squamous cell carcinoma (OSCC): a retrospective analysis of 122 cases*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2012. **40**(1): p. 67-70.
145. Amer, M.H., M. Al-Sarraf, and V.K. Vaitkevicius, *Factors that affect response to chemotherapy and survival of patients with advanced head and neck cancer*. *Cancer*, 1979. **43**(6): p. 2202-6.
146. Aderhold, C., et al., *Chemotherapeutic alteration of VEGF, PDGF and PDGFRalpha/beta expression under 5-FU vs. docetaxel in HPV-*

- transformed squamous cell carcinoma compared to HPV-negative HNSCC in vitro.* Anticancer Res, 2013. **33**(5): p. 1951-61.
147. Gu, F., et al., *Expression of Stat3 and Notch1 is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma.* Oncol Rep, 2010. **23**(3): p. 671-6.
148. Bauer, J.A., et al., *Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL.* Mol Cancer Ther, 2005. **4**(7): p. 1096-104.
149. Schuler, P.J., et al., *In vitro chemosensitivity of head and neck cancer cell lines.* Eur J Med Res, 2010. **15**(8): p. 337-44.
150. Liang, X.J., et al., *Mislocalization of membrane proteins associated with multidrug resistance in cisplatin-resistant cancer cell lines.* Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5909-16.
151. Welters, M.J., et al., *Role of glutathione, glutathione S-transferases and multidrug resistance-related proteins in cisplatin sensitivity of head and neck cancer cell lines.* Br J Cancer, 1998. **77**(4): p. 556-61.
152. Hirata, S., et al., *Expression of drug resistance-related genes in head and neck squamous cell carcinomas and normal mucosa.* Jpn J Cancer Res, 2000. **91**(1): p. 84-90.
153. Mandic, R., et al., *Cisplatin resistance of the HNSCC cell line UT-SCC-26A can be overcome by stimulation of the EGF-receptor.* Anticancer Res, 2009. **29**(4): p. 1181-7.
154. Bence, A.K., et al., *Phase I pharmacokinetic studies evaluating single and multiple doses of oral GW572016, a dual EGFR-ErbB2 inhibitor, in healthy subjects.* Invest New Drugs, 2005. **23**(1): p. 39-49.
155. Untch, M., *Biologika verbessern Behandlungschancen bei Brustkrebs* Journal Onkologie, 2007 Mar. (Zeitschrift online - Ausgabe 01-07).
156. Brunner, K., et al., *EGFR (HER) family protein expression and cytogenetics in 219 squamous cell carcinomas of the upper respiratory tract: ERBB2 overexpression independent prediction of poor prognosis.* Anal Quant Cytol Histol, 2010. **32**(2): p. 78-89.
157. Cavalot, A., et al., *Prognostic impact of HER-2/neu expression on squamous head and neck carcinomas.* Head Neck, 2007. **29**(7): p. 655-64.
158. Beckhardt, R.N., et al., *HER-2/neu oncogene characterization in head and neck squamous cell carcinoma.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1995. **121**(11): p. 1265-70.
159. Chung, C.H., et al., *Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression.* Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 489-500.
160. Rusnak, D.W., et al., *The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo.* Mol Cancer Ther, 2001. **1**(2): p. 85-94.
161. Schrader, C., et al., *Combined effects of lapatinib and cisplatin on colony formation of head and neck squamous cell carcinoma.* Anticancer Res, 2012. **32**(8): p. 3191-9.

162. Erjala, K., et al., *Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(13): p. 4103-11.
163. Rubin Grandis, J., et al., *Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(11): p. 824-32.
164. Schroeder, R.L., C.L. Stevens, and J. Sridhar, *Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer*. Molecules, 2014. **19**(9): p. 15196-212.
165. Quesnelle, K.M. and J.R. Grandis, *Dual kinase inhibition of EGFR and HER2 overcomes resistance to cetuximab in a novel in vivo model of acquired cetuximab resistance*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(18): p. 5935-44.
166. Junker, A., *HER2-positiver Brustkrebs: „Kleines Molekül“ Lapatinib hilft auch bei Hirnmetastasen*. Dtsch Arztebl, 2007(104(30): A-2146 / B-1900 / C-1836).
167. Weichselbaum, R.R., et al., *Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in head and neck cancer cell lines*. Head Neck, 1989. **11**(5): p. 437-42.
168. Mandic, R., et al., *Variations of EGF-R surface expression in squamous cell carcinomas of the head and neck region*. Anticancer Res, 2001. **21**(5): p. 3413-8.
169. Diaz, R., et al., *Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 188.
170. Harrington, K., et al., *Randomised Phase II study of oral lapatinib combined with chemoradiotherapy in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: rationale for future randomised trials in human papilloma virus-negative disease*. Eur J Cancer, 2013. **49**(7): p. 1609-18.
171. Broekman, F., E. Giovannetti, and G.J. Peters, *Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted?* World J Clin Oncol, 2011. **2**(2): p. 80-93.
172. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth*. Ann Intern Med, 1975. **82**(1): p. 96-100.
173. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
174. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
175. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
176. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1029-39.

177. Mineta, H., et al., *Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas*. Br J Cancer, 2000. **83**(6): p. 775-81.
178. Eisma, R.J., J.D. Spiro, and D.L. Kreutzer, *Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma*. Am J Surg, 1997. **174**(5): p. 513-7.
179. Akervall, J., et al., *A novel panel of biomarkers predicts radioresistance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Eur J Cancer, 2014. **50**(3): p. 570-81.
180. Khademi, B., et al., *Prognostic and predictive value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Oral Maxillofac Surg, 2014. **18**(2): p. 187-96.
181. Hamberg, P., J. Verweij, and S. Sleijfer, *(Pre-)clinical pharmacology and activity of pazopanib, a novel multikinase angiogenesis inhibitor*. Oncologist, 2010. **15**(6): p. 539-47.
182. Sauter, E.R., et al., *Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(4): p. 775-82.
183. Presta, L.G., et al., *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders*. Cancer Res, 1997. **57**(20): p. 4593-9.
184. Kim, K.J., et al., *The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies*. Growth Factors, 1992. **7**(1): p. 53-64.
185. Chen, H.X., R.E. Gore-Langton, and B.D. Cheson, *Clinical trials referral resource: Current clinical trials of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab*. Oncology (Williston Park), 2001. **15**(8): p. 1017, 1020, 1023-6.
186. Fujita, K., et al., *Anti-tumor effects of bevacizumab in combination with paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma*. Oncol Rep, 2007. **18**(1): p. 47-51.
187. Hapani, S., et al., *Increased risk of serious hemorrhage with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis*. Oncology, 2010. **79**(1-2): p. 27-38.
188. Warner, B.M.G., J., *Targeting Oral Cancer*. Emerging Molecular Targets in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 2016: Springer International Publishing.
189. Pentheroudakis, G., et al., *Transcriptional activity of human epidermal growth factor receptor family and angiogenesis effectors in locoregionally recurrent head and neck squamous cell carcinoma and correlation with patient outcome*. J Oncol, 2009. **2009**: p. 854127.
190. Canter, D., et al., *Are all multi-targeted tyrosine kinase inhibitors created equal? An in vitro study of sunitinib and pazopanib in renal cell carcinoma cell lines*. Can J Urol, 2011. **18**(4): p. 5819-25.
191. Minocha, M., et al., *Enhanced brain accumulation of pazopanib by modulating P-gp and Bcrp1 mediated efflux with canertinib or erlotinib*. Int J Pharm, 2012. **436**(1-2): p. 127-34.

192. Cui, H., et al., *ABC Transporter Inhibitors in Reversing Multidrug Resistance to Chemotherapy*. *Curr Drug Targets*, 2015. **16**(12): p. 1356-71.
193. Cross, M.J. and L. Claesson-Welsh, *FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition*. *Trends Pharmacol Sci*, 2001. **22**(4): p. 201-7.
194. Bar-Sagi, D. and J.R. Feramisco, *Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation*. *Cell*, 1985. **42**(3): p. 841-8.
195. Noda, M., et al., *Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line*. *Nature*, 1985. **318**(6041): p. 73-5.
196. Brooks, A.N., E. Kilgour, and P.D. Smith, *Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(7): p. 1855-62.
197. Ipenburg, N.A., et al., *Fibroblast Growth Factor Receptor Family Members as Prognostic Biomarkers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review*. *Target Oncol*, 2016. **11**(1): p. 17-27.
198. Freier, K., et al., *Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC)*. *Oral Oncol*, 2007. **43**(1): p. 60-6.
199. Drugan, C.S., I.C. Paterson, and S.S. Prime, *Fibroblast growth factor receptor expression reflects cellular differentiation in human oral squamous carcinoma cell lines*. *Carcinogenesis*, 1998. **19**(6): p. 1153-6.
200. Hase, T., et al., *Correlation of basic fibroblast growth factor expression with the invasion and the prognosis of oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2006. **35**(3): p. 136-9.
201. Bancroft, C.C., et al., *Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines*. *Int J Cancer*, 2002. **99**(4): p. 538-48.
202. Lui, V.W., et al., *Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(7): p. 761-9.
203. Leelahavanichkul, K., et al., *A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Mol Oncol*, 2014. **8**(1): p. 105-18.
204. Wheeler, D.L., et al., *Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members*. *Oncogene*, 2008. **27**(28): p. 3944-56.
205. Zhang, L., et al., *ERBB3/HER2 signaling promotes resistance to EGFR blockade in head and neck and colorectal cancer models*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(5): p. 1345-55.
206. Huang, S., et al., *Dual targeting of EGFR and HER3 with MEHD7945A overcomes acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 824-33.

207. Quesnelle, K.M., et al., *Preclinical modeling of EGFR inhibitor resistance in head and neck cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2012. **13**(10): p. 935-45.
208. Ma, X., et al., *Inhibition of tumor growth by U0126 is associated with induction of interferon-gamma production*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(4): p. 771-83.
209. Malemud, C.J., et al., *U0126, an Inhibitor of MEK1/2, Increases Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Apoptosis, but not Interleukin-6 Induced Apoptosis in C-28/I2 Human Chondrocytes*. *J Autoimmune Disord*, 2015. **1**(1).
210. Stegeman, H., et al., *Combining radiotherapy with MEK1/2, STAT5 or STAT6 inhibition reduces survival of head and neck cancer lines*. *Mol Cancer*, 2013. **12**(1): p. 133.
211. Mazumdar, T., et al., *A comprehensive evaluation of biomarkers predictive of response to PI3K inhibitors and of resistance mechanisms in head and neck squamous cell carcinoma*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(11): p. 2738-50.
212. Wright, C.J. and P.L. McCormack, *Trametinib: first global approval*. *Drugs*, 2013. **73**(11): p. 1245-54.
213. Joshi, M., et al., *Trametinib with or without vemurafenib in BRAF mutated non-small cell lung cancer*. *PLoS One*, 2015. **10**(2): p. e0118210.
214. Michmerhuizen, N.L., et al., *Differential compensation mechanisms define resistance to PI3K inhibitors in PIK3CA amplified HNSCC*. *Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2016. **1**(2): p. 44-50.
215. Mazumdar, T., et al., *Drug-induced RAF dimerization is independent of RAS mutation status and does not lead to universal MEK dependence for cell survival in head and neck cancers*. *Anticancer Drugs*, 2015. **26**(8): p. 835-42.
216. King, A.J., et al., *Dabrafenib; Preclinical Characterization, Increased Efficacy when Combined with Trametinib, while BRAF/MEK Tool Combination Reduced Skin Lesions*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e67583.
217. Rheault, T.R., et al., *Discovery of Dabrafenib: A Selective Inhibitor of Raf Kinases with Antitumor Activity against B-Raf-Driven Tumors*. *ACS Med Chem Lett*, 2013. **4**(3): p. 358-62.
218. Hirschi, B., et al., *Genetic targeting of B-RafV600E affects survival and proliferation and identifies selective agents against BRAF-mutant colorectal cancer cells*. *Mol Cancer*, 2014. **13**: p. 122.
219. Weber, A., et al., *Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Oncogene*, 2003. **22**(30): p. 4757-9.
220. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. *Sci Signal*, 2013. **6**(269): p. p11.
221. Corcoran, R.B., et al., *Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAF(V600E)-Mutant Colorectal Cancer*. *Cancer Discov*, 2018. **8**(4): p. 428-443.
222. Hyman, D.M., et al., *Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(8): p. 726-36.
223. Grippo, J.F., et al., *A phase I, randomized, open-label study of the multiple-dose pharmacokinetics of vemurafenib in patients with BRAF*

- V600E mutation-positive metastatic melanoma*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014. **73**(1): p. 103-11.
224. Agency, E.M. *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Zelboraf® (Vemurafenib)*. 2012; Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002409/WC500124317.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002409/WC500124317.pdf). [12.12.2018]
225. Wu, C.P. and V.A. S, *The pharmacological impact of ATP-binding cassette drug transporters on vemurafenib-based therapy*. *Acta Pharm Sin B*, 2014. **4**(2): p. 105-11.
226. Zhang, Q., et al., *Role of ABCG2 expression driven by cisplatin in platinum-containing chemotherapy for gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(39): p. 6630-6.
227. Pratt, S., et al., *The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(5): p. 855-63.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Strukturformel von Cisplatin ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ) [Eigene Darstellung] [97]	14
<b>Abbildung 2:</b> Strukturformel von 5-Fluorouracil ( $\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2\text{O}_2$ ) [Eigene Darstellung] [100]	15
<b>Abbildung 3:</b> Strukturformel von Lapatinib ( $\text{C}_{41}\text{H}_{40}\text{ClFN}_4\text{O}_{11}\text{S}_3$ ) [Eigene Darstellung] [110]	16
<b>Abbildung 4:</b> Strukturformel von Pazopanib ( $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$ ) [Eigene Darstellung] [120]	17
<b>Abbildung 5:</b> Strukturformel von Trametinib ( $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{FIN}_5\text{O}_4$ ) [Eigene Darstellung] [129]	18
<b>Abbildung 6:</b> Strukturformel von Dabrafenib ( $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$ ) [Eigene Darstellung] [140]	19
<b>Abbildung 7:</b> Belegungsschema einer 96-Well-Mikrotiterplatte (transparent) in den Monotherapieversuchen:	23
<b>Abbildung 8:</b> Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte (transparent) in den Kombinationstherapieversuchen:	26
<b>Abbildung 9:</b> Graphische Darstellung der Bestimmung von $\text{IC}_{50}$ [Eigene Darstellung]	30
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung der mittels PCR nachgewiesenen Rezeptor-Expressionen	32
<b>Abbildung 11:</b> Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Cisplatin auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von $400 \mu\text{M}$ ( $\log_2$ ).	34
<b>Abbildung 12:</b> Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von 5-FU auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von $400 \mu\text{M}$ ( $\log_2$ ).	35
<b>Abbildung 13:</b> Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Lapatinib auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in	

<p>einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200 <math>\mu\text{M}</math> (<math>\log_3</math>).....</p>	36
<p><b>Abbildung 14:</b> Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Pazopanib auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 800 <math>\mu\text{M}</math> (<math>\log_2</math>).....</p>	37
<p><b>Abbildung 15:</b> Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Trametinib auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200 <math>\mu\text{M}</math> (<math>\log_2</math>).....</p>	39
<p><b>Abbildung 16:</b> Graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Dabrafenib auf die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 600 <math>\mu\text{M}</math> (<math>\log_2</math>).....</p>	40
<p><b>Abbildung 17:</b> Kombinationsversuch mit 5-FU – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Lapatinib mit der jeweiligen <math>\text{IC}_{50}</math> von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200 <math>\mu\text{M}</math> (<math>\log_3</math>).....</p>	41
<p><b>Abbildung 18:</b> Kombinationsversuch mit Cisplatin – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Lapatinib mit der jeweiligen <math>\text{IC}_{50}</math> von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200 <math>\mu\text{M}</math> (<math>\log_3</math>).....</p>	42
<p><b>Abbildung 19:</b> Kombinationsversuch mit 5-FU – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Pazopanib mit der jeweiligen <math>\text{IC}_{50}</math> von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 800 <math>\mu\text{M}</math> (<math>\log_2</math>).....</p>	44
<p><b>Abbildung 20:</b> Kombinationsversuch mit Cisplatin – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Pazopanib mit der jeweiligen <math>\text{IC}_{50}</math> von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem</p>	

Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 800 $\mu\text{M}$ (log2).....	45
<b>Abbildung 21:</b> Kombinationsversuch mit 5-FU – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Trametinib mit der jeweiligen $\text{IC}_{50}$ von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200 $\mu\text{M}$ (log2).....	46
<b>Abbildung 22:</b> Kombinationsversuch mit Cisplatin – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Trametinib mit der jeweiligen $\text{IC}_{50}$ von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 200 $\mu\text{M}$ (log2).....	47
<b>Abbildung 23:</b> Kombinationsversuch mit 5-FU – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Dabrafenib mit der jeweiligen $\text{IC}_{50}$ von 5-FU für die Zelllinien PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 600 $\mu\text{M}$ (log2).....	49
<b>Abbildung 24:</b> Kombinationsversuch mit Cisplatin – graphische Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit von Dabrafenib mit der jeweiligen $\text{IC}_{50}$ für 5-FU auf die Zelllinie PC1-1, PC13-1, PC52, SCC9 und SCC68 in einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden und einer Ausgangskonzentration von 600 $\mu\text{M}$ (log2).....	50
<b>Abbildung 25:</b> Monotherapie mit Lapatinib im Vergleich mit der jeweiligen Kombinationstherapie von 5-FU und Cisplatin.....	53
<b>Abbildung 26:</b> Monotherapie mit Pazopanib im Vergleich mit der jeweiligen Kombinationstherapie von 5-FU und Cisplatin.....	55
<b>Abbildung 27:</b> Monotherapie mit Trametinib im Vergleich mit der jeweiligen Kombinationstherapie von 5-FU und Cisplatin.....	56
<b>Abbildung 28:</b> Monotherapie mit Dabrafenib im Vergleich mit der jeweiligen Kombinationstherapie von 5-FU und Cisplatin.....	57

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Wirkstoffe und Medien .....	19
<b>Tabelle 2:</b> Geräte .....	21
<b>Tabelle 3:</b> Software .....	21
<b>Tabelle 4:</b> Laboreigene IC <sub>50</sub> von 5-FU und Cisplatin für die jeweiligen Zelllinien .	24
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Konzentration und Verdünnungs-Logarithmen der verschiedenen TKI .....	25
<b>Tabelle 6:</b> Grenzwerte der Gen-Expression .....	33
<b>Tabelle 7:</b> Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> in Mono- und Kombinationstherapie mit Lapatinib, 5-FU und Cisplatin, sowie zugehörigem K-Wert.....	43
<b>Tabelle 8:</b> Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> in Mono- und Kombinationstherapie mit Pazopanib, 5-FU und Cisplatin, sowie zugehörigem K-Wert. ....	45
<b>Tabelle 9:</b> Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> in Mono- und Kombinationstherapie mit Trametinib, 5-FU und Cisplatin, sowie zugehörigem K-Wert. ....	48
<b>Tabelle 10:</b> Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> in Mono- und Kombinationstherapie mit Dabrafenib, 5-FU und Cisplatin, sowie zugehörigem K-Wert.....	51
<b>Tabelle 11:</b> Vergleich der Zelllinien untereinander in Mono- wie auch Kombinationstherapie. ....	51
<b>Tabelle 12:</b> Vergleich zwischen Mono- und Kombinationstherapie. ....	58
<b>Tabelle 13:</b> Charakterisierung der Interaktion abhängig vom Kombinationsindex, modifiziert nach Chou. ....	94

## 9 Anhang

### 9.1 Charakterisierung der Interaktion abhängig vom Kombinationsindex

Tabelle 13: Charakterisierung der Interaktion abhängig vom Kombinationsindex, modifiziert nach Chou.

Bereich des Kombinationsindexes K	Beschreibung der Interaktion
< 0,1	Sehr starker Synergismus
0,1 – 0,3	Starker Synergismus
0,3 – 0,7	Synergismus
0,7 – 0,85	Mäßiger Synergismus
0,85 – 0,9	Leichter Synergismus
0,9 – 1,1	Additive Wirkung
1,1 – 1,2	Leichter Antagonismus
1,2 – 1,45	Mäßiger Antagonismus
1,45 – 3,3	Antagonismus
3,3 – 10	Starker Antagonismus
> 10	Sehr starker Antagonismus

Synergie besteht dann, wenn der Effekt, der durch Wirkstoffkombination erreicht wird, größer ausfällt als der Effekt der Einzelwirkstoffe. Von einem antagonistischen Effekt spricht man, wenn der tatsächlich erreichte Effekt durch Kombination von Wirkstoffen geringer ist, als der der Einzelsubstanzen. Der Additive Effekt ergibt eine geringe Verbesserung in der zytotoxischen Wirksamkeit.

## 10 Publikation

Teile dieser Dissertation wurden bereits in internationalen Journals publiziert bzw. auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt.

1. Targeting VEGFR and FGFR in head and neck squamosa cell carinoma in vitro  
Brands, R.C.; **Knierim, L.M.**; DeDonno, F.; Steinacker, V.; Seher, A.; Hartmann, S.; Linz, C.; Kübler, A.C.; Müller-Richter, U.D.A.
2. Anti-angiogenetic agents in combination with cisplatin in the therapy of HNSCC  
Brands, R.C.; **Knierim, L.M.**; DeDonno, F.; Seher, A.; Hartmann, S.; Kübler, A.C.; Müller-Richter, U.D.A.  
[under review]

## 11 Danksagung

Mein Dank gilt folgenden Personen, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation zu erarbeiten sowie alle damit verbundenen wissenschaftlichen Versuche an seiner Klinik durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Urs Müller-Richter für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Unterstützung sowie konstruktive Beratung und Betreuung.

Herrn Dr. Dr. Roman C. Brands für die intensive und professionelle Betreuung mit nervenzerreibenden Korrekturen. Vielen Dank für Deine Zeit.

Frau Dr. Imme Haubitz für interessante Anregungen und Gedankengänge im Bereich der Statistik.

Frau Margit Schleyer für immer kollegiale und freundliche Unterstützung im Labor.

Herrn Dr. Axel Seher für seine freundliche Hilfe im Labor bei Fragen und Problemen.

Herrn Heinz Bayer und Dr. Heinz-Georg Brands für die hilfsbereite Unterstützung bezüglich der Korrektur.

Der größte Dank gilt meiner Familie für die emotionale Unterstützung.