

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

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

**Tyrosinkinaseinhibitoren in der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms –
In vitro Evaluation zur Wirksamkeit von Afatinib, Volasertib und Nintedanib in
Kombination mit Cisplatin und SMAC-Mimetics**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
für das Fach der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
an der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Dr. med. Francesco De Donno
aus Köln**

Würzburg, August 2019



Referentenblatt

Referent/Referentin: Prof. Dr. med. dent. Dr. med. Urs Müller-
Richter

Korreferent: Prof. Dr. med. Volker Kunzmann

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2020

Der Promovend ist Zahnarzt und Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom	1
1.2 Multimodales Therapiekonzept	4
1.3 Chemotherapie mit Cisplatin	6
1.4 Rezeptortyrosinkinasen und ihre Inhibitoren	7
1.4.1 Signalweg des EGFR (Epidermal growth factor receptor)	8
1.4.2 Afatinib	10
1.4.3 Signalweg des Vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR)	12
1.4.4 Signalweg des Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)	13
1.4.5 Signalweg des Fibroblast growth factor receptor (FGFR)	13
1.4.6 Nintedanib	14
1.4.7 Zellzyklus und Polo-like-Kinase (PLK)	16
1.4.8 Volasertib	17
1.5 Zelluntergang	17
1.5.1 Apoptose	18
1.5.2 Synthetische SMAC-Analoga (Smac-mimetics)	20
1.6 Fragestellung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Zellkultur	23
2.2 Semiquantitativer Nachweis von Target-Molekülen	24
2.3 Versuchsaufbau und Durchführung	24
2.3.1 Kristallviolett-Assay	24
2.3.2 Statistische Auswertung	25
2.3.3 Stimulation der Zelllinien	27
2.4 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software	29
3. Ergebnisse	31
3.1 Expressionsanalyse von Zielstrukturen	31
3.2 TKI-Monotherapie und Kombinationstherapie mit Cisplatin	34
3.2.1 Afatinib	34
3.2.2 Nintedanib	38
3.2.3 Volasertib	42
3.3 TKI-Monotherapie und Kombinationstherapie mit LCL-161	46

3.3.1 Afatinib	46
3.3.2 Nintedanib	46
3.3.3 Volasertib	47
4. Diskussion	49
5. Zusammenfassung.....	63
6. Anhang	66
6.1 Abbildungsverzeichnis	66
6.2 Tabellenverzeichnis	66
6.3 Literaturverzeichnis	67

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
ABC-G2	ATP-binding-cassette-Transporter G2
BC	Mammakarzinom
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cIAP	Cellular-inhibition-of-apoptosis-protein
CRC	Kolorektales Karzinom
DISC	Death inducing signaling complex
EGF	Epidermal growth factor
EGFR/ErbB1	Epidermal growth factor receptor / Human Epidermal growth factor receptor
EMA	European Medicines Agency's Committee
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ErbB2/HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
ErbB3/HER3	Human epidermal growth factor receptor 3
ErbB4/HER4	Human epidermal growth factor receptor 4
FADD	Fas-associated death domain
FaDu-Zellen	Hypopharynxkarzinomzelllinie
FASL	Fas-Ligand
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GÜ	Gesamtüberleben
Gy	Gray
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom der Kopf- und Halsregion)
HIF-1 α	Hypoxia-induced factor-1 α
HPV	Humanes Papillomavirus
HWZ	Halbwertszeit

IC ₂₀	Wirkstoffkonzentration, die eine Inhibition auf 20 % der Ausgangssubstratkonzentration bewirkt
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Wirkstoffkonzentration (Inhibition auf 50 % der Ausgangssubstratkonzentration)
ICAD	Inhibitor of Caspase-activated-DNase
LTK	Lokale Tumorkontrolle
MTX	Methotrexat
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
PAI-1	Plasminogen-activator-inhibitor
PBD	Polo-box-Domänen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PFÜ	Progressionsfreies Überleben
PI3	Phosphoinositid-3
PFÜ	Progressionsfreies Überleben
PK	Pharmakokinetik
PLC	Phospholipase-C
PLK	Polo-like-Kinase
RAS	Rat sarcoma
RIP-Kinase	Receptor interacting protein-kinase
RMC-Studie	Randomisierte Multicenter-Studie
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SMAC	Second-mitochondria-derived-activator-of-caspases
STAT	Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transcription
sqRT-PCR	Semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction
TF	Tissue factor
TKI	Serin-/Threonin- bzw. Tyrosinkinaseinhibitor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRADD	TNFR1-associated Death Domain Protein
TRAF	TNF-Rezeptor-associated-factor-1
TRAIL	TNF-assoziierter-Apoptose-induzierender-Ligand
UICC	Union internationale contre le cancer (dt. Internationale Vereinigung gegen Krebs)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-(1-3)	Vascular endothelial growth factor receptor (1-3)
XiAP	X-linked-inhibition-of-apoptosis-protein

1. Einleitung

1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

Mit einer weltweiten Inzidenz von etwa 600.000 Fällen pro Jahr zählt das orale Plattenepithelkarzinom zu den häufigsten Tumoren der Kopf- und Halsregion. Allein in Deutschland ließ sich laut Robert Koch-Institut für das Jahr 2012 eine Inzidenz von etwa 17.500 Fällen und eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 51-61 % ermitteln. Vergleicht man diese epidemiologischen Maßzahlen mit vorausgehenden Jahren, so fällt auf, dass die Erkrankungs- und Sterberaten seit dem Jahr 2000 für Frauen kontinuierlich angestiegen sind. Dagegen sind die Raten für Männer auf einem deutlich höheren Niveau nahezu stabil. Es lässt sich lediglich eine leicht verringerte Mortalität für erkrankte Männer erfassen [1].

Wie auch bei anderen soliden Tumorentitäten stellt sich die Pathogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms als multifaktorielles Bild dar. Trotz zahlreicher Studien zur Analyse und Identifikation verschiedener Risikofaktoren in den letzten Jahrzehnten ist der Mechanismus der Tumorentstehung noch nicht gänzlich verstanden. Es lassen sich dabei grundlegend mechanische, toxische, infektiöse und genetische Einflüsse voneinander differenzieren. Zu den häufigsten Risikofaktoren gehören Tabak- und Alkoholkonsum sowie die damit verbundene Aufnahme kanzerogener Substanzen wie Nitrosamine und aromatische Kohlenwasserstoffe. Zelluläre Kontrollmechanismen und die DNA-Synthese können durch die Interaktion mit Alkohol oder Tabak fehlerhaft ablaufen [2]. Bei der Inaktivierung dieser Kontrollmechanismen spielt das Tumorsupressorgen-p53 eine zentrale Rolle. Es dient vor allem der Zellzykluskontrolle und kann neben oben genannten Einflüssen auch durch virale Infekte seine Funktion verlieren [3]. Als wichtigste Erreger mit onkogener Potenz gelten hierbei die Serotypen 16 und 18 des humanen Papillomavirus (HPV), welche in Untersuchungen in 10 % aller Fälle nachgewiesen werden konnten [4, 5].

Das orale Plattenepithelkarzinom entsteht in aller Regel aus präkanzerösen Vorläuferläsionen. Zu den allgemeinen Symptomen dieser malignen Erkrankung zählen Schmerzen, Schwellungen, vermehrtes Fremdkörpergefühl, unklare Blutungen sowie Sensibilitäts- und Schluckstörungen. Auch spezifische Befunde wie Schleimhautdefekte, Ulzerationen sowie Leuko- oder Erythroplakien können diagnostisch wegweisend sein [6]. Das klinische Bild des oralen Plattenepithelkarzinoms erscheint heterogen. Daher ist es umso wichtiger, tumorverdächtige Veränderungen rasch durch diagnostische Verfahren abzuklären. Hier bieten Probeexzisionen oder Bürstenbiopsien mit nachfolgender histopathologischer Begutachtung verlässliche Möglichkeiten zur Diagnosestellung und Risikoabschätzung. In Abhängigkeit vom diagnostischen Staging und der pathologischen Begutachtung sollte eine Zuordnung des Mundhöhlenkarzinoms in die Tumorstadien 0 bis 4 erfolgen. Diese orientieren sich an der TNM-Klassifikation nach UICC und beschreiben unter anderem die Tumorausdehnung, den Metastasierungsgrad sowie den regionären Lymphknotenbefall. Die Systematik dieser Stadien kann Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1 – Tumorstadien von Kopf- und Halstumoren [7]

Stadien	T	N	M	
0	Cis	N0	M0	<p>T-Stadium:</p> <p>Cis: Carcinoma in situ T1: ≤ 2 cm, DOI* ≤ 5 mm T2: ≤ 2 cm, DOI > 5 mm und ≤ 10 mm > 2 cm bis ≤ 4 cm und DOI ≤ 10 mm T3: > 4 cm oder DOI ≤ 10 mm T4a: Moderat fortgeschritten *T4b: Stark fortgeschritten*</p> <p>N-Stadium:</p> <p>N0: Keine regionären LK-Metastasen N1: Metastase solitär ipsilateraler LK ≤ 3 cm, ENE-* N2a: Metastase solitärer ipsi-/kontralateraler LK ≤ 3 cm ENE+, oder > 3 bis ≤ 6 cm ENE-N2b: Metastasen multipler ipsilateraler LK ≤ 6 cm, ENE- N2c: Metastasen bilateraler, kontralateraler LK ≤ 6 cm, ENE- N3a: Metastase in LK ≤ 6cm, ENE- N3b: Metastase solitärer LK > 3cm, ENE+ oder Metastase multipler ipsilateraler, kontralateraler oder bilateraler LK mit ENE+</p> <p>M-Stadium:</p> <p>M0: Keine Fernmetastasen M1: Fernmetastasen</p> <p>* <i>Klassifikation gemäß der Ausbreitung entlang definierter anatomischer Strukturen</i></p> <p>* DOI = Invasionstiefe</p> <p>* ENE+/- = Kapselüberschreitendens Wachstum positiv/ negativ</p>
I	T1	N0	M0	
II	T2	N0	M0	
III	T1,	N1	M0	
	T2, T3	N0, N1	M0	
IVa	T1,	N2	M0	
	T2, T3 T4a	N0, N1, N2	M0	
IVb	Jedes T	N3	M0	
	T4b	Jedes N	M0	
IVc	Jedes T	Jedes N	M1	

Neben der oben genannten Klassifizierung der anatomischen Tumorausbreitung, ist die Erhebung histopathologischer Tumorcharakteristika von großer Bedeutung für ein erfolgreiches Therapiekonzept. Darunter ist die Einteilung in Gradingstufen und die Subtypisierung des Plattenepithelkarzinoms zu nennen. Auch eine Infiltration der Venen, Lymphgefäße oder Perineuralscheiden sowie die Eindringungstiefe des Primärtumors und ein kapselüberschreitendes Wachstum an Lymphknotenmetastasen sind hierbei wertvolle prädiktive Parameter [8].

Für die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms sollte auf Basis der Staging-Untersuchung in interdisziplinärer Zusammenarbeit zunächst die Frage der Heilbarkeit gestellt werden. Für einen kurativen Behandlungsansatz stehen hierbei die Erreichbarkeit tumorfreier Resektionsgrenzen sowie die postoperative Lebensqualität im Vordergrund [6]. Tumoren im Stadium I und II können in den meisten Fällen durch lokale Resektion erfolgreich behandelt

werden. Hier werden in der Fachliteratur Erfolgsraten von 65-90 % beschrieben [9]. Dagegen wird ab dem Stadium III häufig eine multimodale Kombinationstherapie aus operativer Tumorresektion, Bestrahlung und eventueller Chemotherapie notwendig. Im Falle von Fernmetastasen, Rezidiven oder Inoperabilität sollte das Tumorleiden als inkurabel eingestuft und palliativ behandelt werden. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 43,9 % für die Stadien III und IV erscheinen die derzeitigen Behandlungskonzepte weiterhin nur mäßig erfolgversprechend [10].

1.2 Multimodales Therapiekonzept

Für die chirurgische Therapie des Primärtumors hat sich die Resektion mit intraoperativer histologischer Schnellschnittuntersuchung bewährt. Jeder operativen Tumorentfernung, die mit einem Verlust von Funktion und Ästhetik des Kausystems einhergeht, sollte eine primäre oder zeitverzögerte Rekonstruktion folgen. Unabhängig von der anatomischen Tumorausdehnung sollte trotz eines klinisch unauffälligen Lymphknotenbefundes (cN0) zusätzlich eine elektive zervikale Lymphadenektomie vorgenommen werden [11], da okkulte Lymphknotenmetastasen mit einer Wahrscheinlichkeit von 20-40 % auftreten können [12]. Dagegen kann im Falle eines auffälligen Lymphknotenbefundes (cN+) eine angemessene radikale oder modifizierte radikale Lymphknotenausräumung durchgeführt werden [13].

Nach alleiniger Tumorresektion für ein Stadium größer als II werden in der Literatur hohe Rezidivraten beschrieben, welche die Notwendigkeit einer Bestrahlung ggf. in Kombination mit systemischer Chemotherapie deutlich machen [14]. Grundlegend werden für diese Maßnahmen verschiedene Behandlungsalgorithmen diskutiert.

Eine alleinige Anwendung systemischer Chemotherapeutika mit Cisplatin, 5-Fluorouracil oder Taxanen wird dabei ausschließlich im palliativen Therapieansatz empfohlen [15]. Dagegen kann eine alleinige Bestrahlung im kurativen Ansatz Verwendung finden. Untersuchungen von Mendenhall, Stringer [16] zu dieser Arbeitshypothese konnten zeigen, dass der Benefit für

wenig entdifferenzierte kleine Mundhöhlenkarzinome (T1, N0, G1-G2) dem einer operativen Tumorresektion gleichgesetzt werden kann.

Sowohl neoadjuvante Radiochemotherapiekonzepte als auch die Induktionschemotherapie, haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung verloren. Letztere ist als systemische präoperative Chemotherapie vor radikaler Behandlung fortgeschrittener Mundhöhlenkarzinome zu verstehen. Hierzu konnte bislang bei Anwendung von Cisplatin und 5-FU in Studien kein signifikant verbessertes Outcome erzielt werden [14]. untersuchen.

Die adjuvante Radiotherapie konnte sich mit starkem Konsens als Standardtherapie für das lokal fortgeschrittene orale Plattenepithelkarzinom etablieren [18]. Dabei ist die Beurteilung histopathologischer Risikofaktoren für das Auftreten eines lokalen Rezidivs essenziell. Zu diesen gehören ein Resektionsgrad $> R0$, ein positiver oder kapselüberschreitender Lymphknotenbefall sowie eine perineurale oder vaskuläre Tumordinfiltration. Bei Vorliegen mindestens eines dieser Kriterien sollte daher für fortgeschrittene Tumoren des Stadiums T2-T3 sowie resektable T4-Tumoren eine Indikationsstellung zur adjuvanten Bestrahlung erfolgen. Diese wird in der Regel in akzelerierter, konventionell fraktionierter oder hyperfraktionierter Form angewendet und sollte aus Gründen der Strahlentoxizität eine Gesamtdosis von 70 Gy nicht überschreiten. In Fällen mit besonders hohem Rezidivrisiko oder bei inoperablen, nicht metastasierten Tumoren wird die Anwendung einer adjuvanten Radiochemotherapie postuliert. Dabei konnte besonders für Patienten im Alter unter 60 Jahren ein signifikanter Überlebensvorteil von 22-24 % gegenüber der Vergleichsgruppe mit alleiniger Strahlentherapie nachgewiesen werden [19]. Aktuell treten Kombinationen aus immunonkologischen Konzepten und herkömmlichen Ansätzen der adjuvanten Radiochemotherapie in den Vordergrund. Seit 2018 vergleicht die sogenannte ADRISK-Studie die Wirksamkeit einer adjuvanten Radiochemotherapie mit Cisplatin gegenüber einer adjuvanten Radiochemotherapie mit Cisplatin und Zusatz von Pembrolizumab. Diese deutsche randomisierte multicenter-Studie befindet sich im Augenblick in der Phase der Datenerhebung und wird voraussichtlich 2022 ausgewertet werden.

1.3 Chemotherapie mit Cisplatin

Cisplatin (*cis*-Diammino-dichlorido-platin; DDP) stellt einen Schwermetallkomplex bestehend aus einem zentralen Platin-Atom und jeweils zwei Chlorid- sowie Amminliganden. Als Zytostatikum findet es Anwendung in der Chemotherapie des oralen Plattenepithelkarzinoms [20]. Die ursprüngliche Form des Cisplatin (DDP) stellt ein inaktives Prodrug dar, welches sich nach intravenöser Applikation in der extrazellulären Flüssigkeit anreichert. Die Aufnahme nach intrazellulär erfolgt durch passive Diffusion und aktiv durch Kupfertransporter [21]. Letztlich resultiert die zytosolische Aufnahme in einer Bildung von stark nukleophilen Aqua-Cisplatin-Komplexen, welche mit intrazellulären Bestandteilen Addukte bilden können [21]. Zu diesen zählen die DNA und RNA, Mitochondrien oder das zelluläre Glutathion. Verschiedene Quervernetzungen führen so zu einem Funktionsverlust der Erbsubstanz. Der zytotoxische Effekt des Cisplatins entfaltet sich durch die Inhibition der Replikation und Proteinsynthese sowie durch den Funktionsverlust zellulärer Reparaturmechanismen. Die Konsequenz dieser Zellschädigung liegt schließlich in der Einleitung des programmierten Zelluntergangs [22]. Der hier involvierte Induktionsweg ist zurzeit jedoch noch nicht vollständig geklärt. Im Rahmen der adjuvanten Radiochemotherapie des Mundhöhlenkarzinoms hat sich die Anwendung von Cisplatin als Standardverfahren etabliert. Es kam in Studien bei Abwesenheit von Cisplatin zu signifikanten Verschlechterungen des Outcomes, sodass es unter den Zytostatika eine zentrale Rolle einnimmt [19, 23]. Bezüglich der Interaktion mit ionisierender Strahlung ergibt sich zudem ein synergistischer Effekt durch den oxygenierenden Charakter des Wirkstoffs [24]. Die Darreichung erfolgt in der Regel alle drei bis vier Wochen und sollte mindestens eine kumulative Dosis von 200 mg/m² (Körperoberfläche) erreichen [14]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen von Cisplatin zählen die Neuro-, Oto- und Nephrotoxizität sowie Störung der Hämatopoese und der Elektrolytwerte. Zudem können gastrointestinale Komplikationen wie Diarrhoe oder eine Emesis auftreten. Neben der Toxizität und dem Nebenwirkungsprofil stellen Resistenzmechanismen entarteter Zellen einen weiteren limitierenden Faktor für die klinische Anwendung von Cisplatin dar. Grundlegend ist hier zwischen

Veränderungen der intrazellulären Wirkstoffkonzentration und modulierenden Faktoren für die Apoptose zu unterscheiden. Ein Aufnahmedefizit, eine erhöhte Wirkstoffinaktivierung oder ein verstärkter Efflux-Transport können auf diese Weise zu einer Verringerung des zytostatischen Potenzials führen. Daneben kann die Apoptoseneigung der Zelle durch eine Überexpression bestimmter Rezeptoren, den Funktionsverlust des p53-Suppressorgens oder durch Alteration spezieller Signalwege verringert werden [22].

1.4 Rezeptortyrosinkinasen und ihre Inhibitoren

Rezeptortyrosinkinasen gehören zur Gruppe der Proteinkinasen. Im menschlichen Genom sind circa 90 dieser Kinasen kodiert, von denen 58 als membrangebundene Rezeptortyrosinkinasen (RTK) exprimiert werden. Die restlichen Vertreter dieser Gruppe werden nach ihrer Synthese frei im Zytosol oder im Zellkern gelöst [25]. Nach Bindung eines spezifischen Liganden phosphorylieren sie sich selbst oder ein Substrat. Die nachgeschalteten Signalkaskaden sorgen auf diese Weise für die Modulation von Wachstum, Zellproliferation, Regeneration und Apoptose. Allerdings können entsprechende Kinasen durch verschiedene Dysfunktionen auch zur neoplastischen Entartung beitragen. So können genetische Mutationen, eine erhöhte Ligandenkonzentration oder eine durch Genamplifikation vermehrte Expression zur Überaktivierung und Fehlregulation des jeweiligen Signalwegs führen.

Sogenannte monoklonale Antikörper (z.B.: Cetuximab) stellen immunoaktive Substanzen dar, welche mit Wachstumsfaktoren um die Bindungsstelle des entsprechenden Targets konkurrieren und somit den Signalweg inhibieren.

Durch gezielte Anwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), sogenannten "small molecules", kommt es hingegen zur reversiblen oder irreversiblen Bindung an den Kinase-Domänen der RTK mit der Folge einer Blockade nachgeschalteter Kaskaden der Signaltransduktion. Durch die Realisierung dieses pharmakologischen Konzepts entstanden in den letzten zwei Dekaden zahlreiche neue Wirkstoffe. Einer der ersten Vertreter dieser Klasse ist das seit 2003 zugelassene Imatinib. Es ist als spezifischer Inhibitor gegen die ABL-

Kinase gerichtet, welche durch eine Dysregulation und Überaktivierung für die Entstehung der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) verantwortlich ist. Auch für die zielgerichtete Therapie von Karzinomen konnten TKI eine zentrale Rolle einnehmen. Im Jahr 2005 konnte Erlotinib, ein EGFR/HER1-Inhibitor, zur Behandlung des NSCLC (nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms) zugelassen werden. Für das EGFR-mutierte NSCLC dagegen erwies sich der EGFR-Inhibitor Gefitinib als besonders wirksam, wobei es hier 2009 erstmalig zur Zulassung in Europa kam.

In der vorliegenden Studie wurden die Wirksamkeiten der TKI Afatinib und Nintedanib sowie des Serin- / Threoninkinase-Inhibitors Volasertib in Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin und Smac-mimetics an fünf Zelllinien des Plattenepithelkarzinom der Kopf- und Halsregion („Head and neck squamous cell carcinoma“ - HNSCC) evaluiert.

Afatinib ist ein oraler TKI, der alle Vertreter der ErbB-Rezeptorfamilie irreversibel inhibiert. Dieser Wirkstoff konnte 2003 für die USA von der FDA zur Behandlung des fortgeschrittenen EGFR-mutierte NSCLC zugelassen werden [26]. Nintedanib stellt einen TKI gegen Rezeptoren des VEGF, FGF und PDGF dar. Als sogenannter „Triple-Angiokinaseinhibitor“ hemmt er dabei unter anderem die Signaltransduktion der Angiogenese und Neovaskularisierung. Im Oktober 2013 wurde Nintedanib durch die europäische Arzneimittel-Agentur in Kombination mit Docetaxel, einem Zytostatikum aus der Gruppe der Taxane, für die Zweitlinientherapie des fortgeschrittenen NSCLC) in Europa zugelassen. Volasertib, ein Vertreter der Serin- / Threoninkinaseinhibitoren, bindet und blockiert die kernständige Polo-like-Kinase-1 (PLK1). Dieses Targetprotein wird in Zellen mit hoher Teilungsrate exprimiert, da es maßgeblich für die Regulation von Zellzyklus und Zellteilung verantwortlich ist [27]. Volasertib konnte bislang nicht zugelassen werden.

1.4.1 Signalweg des EGFR (Epidermal growth factor receptor)

Der „Epidermal growth factor“ (EGF) wurde erstmalig im Jahr 1962 als auto- bzw. parakrin wirksamer Wachstumsfaktor beschrieben. Das Peptid aus 53 Aminosäuren stimuliert hierbei durch Bindung an Rezeptoren der ErbB-Familie

Wachstum, Proliferation und Differenzierung von Zellen. Neben dem EGF können auch andere Wachstumsfaktoren die Rezeptoren der ErbB-Klasse ansteuern, darunter Amphiregulin, Epiregulin, Neureguline (1-4) und der „Transforming-growth-factor- α “. Zu den Vertretern der ErbB-Familie zählt man vier strukturell verwandte Rezeptortyrosinkinasen (EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4), die aus einer extra- und intrazellulären sowie transmembranären Domäne bestehen. In Anwesenheit eines entsprechenden Liganden kommt es zur Dimerisierung zwischen gleichen oder unterschiedlichen Vertretern der ErbB-Rezeptoren, sodass Homo- oder Heterodimere entstehen. Folglich kommt es durch Auto- und Transphosphorylierung zur Entstehung von Bindungsdomänen für Moleküle des nachfolgenden Downstreams [28]. Zu den angesteuerten Signalproteinen gehören dabei das G-Protein RAS (Rat sarcoma), die ERK (extracellular-signal-related kinase) sowie die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-K), welche die Aktivierung der AKT (Proteinkinase B) und des mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) vermittelt. Eine Gemeinsamkeit dieser Signalwege ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Realisierung lebenswichtiger Funktionen, wie Zellzyklus- und Apoptoseregulation, Angiogenese, Migration und Adhäsion, ermöglichen. Überexpressionen von RTK der ErbB-Familie konnten in soliden Tumoren nachgewiesen werden. Darunter sind das HNSCC, das NSCLC, das Mammakarzinom (BC), das kolorektale Karzinom (CRC) und das maligne Melanom zu nennen [29-31]. Unter HNSCC weisen mehr als 90 % eine Überexpression des EGF-Rezeptors (ErbB1/HER1) auf [32], welche mit einer Verringerung der 5-Jahres-Überlebensrate und damit schlechteren Prognose einhergeht [33]. Für stark entdifferenzierte Kopf- und Halstumoren lassen sich zudem höhere ErbB1-Expressionslevel nachweisen als bei Tumoren mit niedrigerem Grading [34]. Auch kann eine Überexpression des ErbB1 mit einer erhöhten Bestrahlungsresistenz, einer schlechteren lokalen Tumorkontrolle und einem erhöhten Risiko für Fernmetastasen korrelieren [35]. Eine ErbB1-Überexpression kann darüber hinaus durch die Heterodimerisierung mit anderen Vertretern der ErbB-Rezeptorfamilie eine Erhöhung des ErbB2-, ErbB3- und ErbB4-Expressionslevels begünstigen [36].

Unter zusammenfassender Betrachtung dieser Aussagen ergibt sich für die Rezeptoren der ErbB-Familie ein besonders hoher Stellenwert in der zielgerichteten Therapie des HNSCC. Trotz zahlreicher präklinischer und klinischer Studien zum HNSCC konnten bislang jedoch kein eindeutiger prognostischer Marker für das Ansprechen von Anti-EGFR-gerichteter Therapie entdeckt werden.

1.4.2 Afatinib

Als oraler, irreversibler ErbB-Inhibitor stellt Afatinib ein ATP-kompetitives Anilinoquinazolinderivat dar. Durch kovalente Bindung an Cysteinreste wird die Auto- und Transphosphorylierung von EGFR/ErbB1, ErbB2/HER2 und ErbB4/HER4 inhibiert [28]. Durch eine fehlende Transphosphorylierung kommt es zudem zu einer indirekten Hemmung des ErbB3/HER3 [26, 37].

Mit der Entwicklung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab entstanden in den letzten Jahren reversible selektive ErbB-Inhibitoren. In der therapeutischen oder experimentellen Anwendung für das NSCLC bzw. das HNSCC zeigen diese Wirkstoffe zwar einen therapeutischen Effekt, jedoch kommt es hierbei zunehmend zu limitierenden natürlichen oder erworbenen Resistenzmechanismen. Besonders die Aktivierung alternativer Signalwege stellt dabei eine erhebliche Einschränkung von Therapien mit selektiven Wirkstoffen dar. Wheeler et al. [36] konnten diese Aussage durch den Nachweis einer Überexpression an ErbB2 und ErbB3 in Cetuximab-resistenten Zellen untermauern.

In vorherigen Studien konnten die Autoren die Wirksamkeit von Gefitinib an oben genannten Zelllinien untersuchen, wobei sich zwei Zelllinien mit einer EGFR-Überexpression als Gefitinib-resistent erwiesen. Im Vergleich zu Gefitinib war die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Afatinib in allen Zelllinien niedriger. Zudem zeigten sich die Gefitinib-resistenten Zelllinien eindeutig sensibel gegenüber Afatinib.

Zusammenfassend lässt sich anführen, dass Afatinib als „Pan-Inhibitor“ in Tumoren mit EGFR-Mutationen und Resistenzen gegenüber EGFR-Inhibitoren der 1. Generation einen günstigeren therapeutischen Effekt zu haben vermag.

Ein klinisches Multicenter-Studienprogramm „Lux Lung“ zur Anwendung von Afatinib beinhaltet bislang acht randomisierte Phase-III-Studien, deren Ergebnisse maßgeblich zur internationalen Zulassung des Wirkstoffs in der Therapie des NSCLC beitragen. Dieses Studienprogramm identifizierte Afatinib als vielversprechende Therapieoption für das NSCLC.

Ein Studienprogramm namens „Lux Head and Neck“ stellt eine weltweite Phase-III-Studie zur Wirkung von Afatinib an Patienten mit HNSCC dar. Im Rahmen der ersten Studie wurden die Wirksamkeit und Wirkstoffsicherheit von Afatinib als Second-Line-Therapie des, nach platinbasierter Chemotherapie rekurrenten oder metastasierenden, HNSCC mit der von Methothrexat (MTX) verglichen. Bei einem mittlerem Follow-up von 6,7 Monaten zeigten die Studienergebnisse in der Afatinibgruppe (40 mg/d oral) ein PFÜ von 2,6 Monaten gegenüber respektive 1,7 Monaten für MTX (Bolusinjektion 40 mg/w). Des Weiteren wurde für Afatinib eine lokale Tumorkontrolle von 49 % gegenüber 39 % unter MTX beobachtet. Bei Befragung zur individuellen Lebensqualität berichteten 26 % der Patienten unter Afatinib-Therapie über eine Verbesserung spezifischer Krankheitssymptome. In der MTX-Kohorte wurde dieser Effekt in 23 % der Fälle beschrieben. Zudem konnte Afatinib in Subgruppen mit positivem Befund für HPV (p16-Marker) einen größeren Benefit erreichen als MTX. Weitere Studien des Programms sind aktuell in der Phase der Patientenrekrutierung.

In einer weiteren RMC-Studie untersuchten Seiwert et al. [38] die Hypothese, dass Afatinib im metastasierten oder rekurrenten platinrefraktärem HNSCC eine größere Antitumoraktivität habe als Cetuximab. Bei dieser Crossover-Studie aus zwei Phasen wurden Afatinib (50 mg/d oral) und Cetuximab (250 mg/m²/w) auf zwei Kohorten verteilt. In Phase I erfolgte die Therapie bis zur radiologischen, klinischen Tumorprogression und/oder bis zum Auftreten therapielimitierender Nebenwirkungen. In Phase II erfolgte die Umstellung der Afatinib-Therapie auf Cetuximab und umgekehrt. Die Ergebnisse verdeutlichten

keinen eindeutigen Therapievorteil von Afatinib gegenüber Cetuximab, zeigten jedoch einen konstanten Benefit für eine Therapieumstellung. Hier ist ein sogenanntes „Lack of cross-resistance“ zu vermuten, was die Notwendigkeit prädiktiver Tumormarker zur individualisierten Antitumorthherapie verdeutlicht.

1.4.3 Signalweg des Vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR)

Als zentraler Vermittler der Vaskulo- und Angiogenese zählt der Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) zu der Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren. Der Begriff VEGF (Vascular endothelial growth factor) steht für die Familie aller VEGFR-stimulierenden Signalmoleküle. Zu diesen gehört der VEGF mit seinen Subtypen A bis D sowie der Placenta growth factor (PGF). Ebenso sind verschiedene Subtypen des VEGF-Rezeptors zu differenzieren. Hierzu zählen der VEGF-Rezeptor-1, VEGF-Rezeptor-2 und VEGF-Rezeptor-3. Abgesehen von löslichen Varianten des VEGFR1 und VEGFR2 besteht der VEGFR aus einer extrazellulären Domäne mit sieben immunoglobulin-ähnlichen Bindungsstellen sowie einer transmembranären und intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität [39]. Infolge der Ligandenbindung an der extrazellulären Domäne kommt es durch Homo- oder Heterodimerisierung zur Interaktion zwischen den intrazellulären Domänen und somit zu einer Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste, welche die PI3-Kinase und die MAP-Kinase ansteuern [40, 41]. Der VEGFR2 wird vorwiegend durch VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D stimuliert und sorgt in Endothelzellen der Blutgefäße für Proliferation, Migration, Differenzierung und NO-vermittelte Vasodilatation. Zudem vermittelt er die Steigerung vaskulärer Permeabilität und die Angiogenese. VEGFR1 wird dagegen selektiv von dem Signalmolekül VEGF-B gebunden und stimuliert in Blutgefäßendothelzellen die Bildung von Tissue-Factor und Plasminogen-activator-inhibitor sowie die Migration von Monozyten. Der VEGFR3 dient vorwiegend Prozessen der Lymphangiogenese sowie der Proliferation und Migration lymphatischer Endothelzellen [42].

1.4.4 Signalweg des Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)

Unter dem Begriff Platelet-derived growth factor (PDGF) werden die vier Wachstumsfaktoren PDGF A bis D zusammengefasst. Sie kommen in Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen oder Gliazellen, vor und stimulieren die Proliferation und Migration. Zudem spielen sie, ähnlich wie der VEGF, eine wichtige Rolle in der Vaskulo-, Angiogenese und Embryonalentwicklung [43]. Alle Isoformen des PDGF werden von Thrombozyten aus Alpha-Granula sezerniert und bilden Dimere. Dabei kommen PDGF-A und PDGF-B in ihrer aktiven Form als Hetero- oder Homodimere vor. PDGF-C und PDGF-D kommen dagegen nur als Homodimere vor und werden durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form umgewandelt [44]. Zwei Typen der PDGF-Rezeptoren (PDGFR) konnten bislang identifiziert und als PDGF-Rezeptor-Alpha sowie PDGF-Rezeptor-Beta beschrieben werden [45]. Der Aufbau des PDGFR ähnelt mit einer extrazellulären Domäne aus fünf immunoglobulin-ähnlichen Bindungsstellen, einer transmembranären und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, dem des VEGFR. Die Ligandenbindung induziert eine Dimerisierung und somit die Phosphorylierung an Tyrosylresten der zytoplasmatischen Domäne. So kommt es im nachfolgenden Downstream zur Aktivierung der PI3-Kinase und zur ROS-vermittelten Aktivierung des STAT3-Signalwegs [44].

1.4.5 Signalweg des Fibroblast growth factor receptor (FGFR)

Zu den Wachstumsfaktoren der FGF-Familie zählt man bislang 23 Subtypen. FGF lassen sich in nahezu allen körperlichen Geweben nachweisen. Sie regulieren hierbei Zellwachstum und Differenzierung von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Ähnlich wie Wachstumsfaktoren der VEGF- und PDGF-Subfamilie steuern sie Prozesse der Embryonalentwicklung. In adulten Geweben dagegen sorgen sie im Falle von Hypoxie, Ischämie und Gewebeschäden für die Gewebsreparation und Angiogenese [46]. Unter allen Subtypen des FGF lässt sich dem FGF-1 eine besonders hohe Aktivierung der Angiogenese zuschreiben [47]. Der Subtyp FGF-4 kann dagegen häufig in

Tumoren nachgewiesen werden. Es bestehen vier Typen des FGF-Rezeptors, deren Struktur weitgehend der des VEGFR und PDGFR entspricht. Jedoch besteht die extrazelluläre Domäne aus drei Immunglobulin-ähnlichen Bindungsregionen [48]. Die Signalmoleküle Rat-sarcoma (Ras), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase), Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transkription (STAT) und der Phospholipase-C (PLC) werden letztlich durch Aktivierung der FGFR-Kaskade stimuliert.

1.4.6 Nintedanib

Als oral verfügbarer TKI vermag Nintedanib Rezeptoren des Typs VEGFR-1/2/3, FGF-1/2/3 sowie PDGFR α / β zu inhibieren. Hierbei bindet es über seine Indol-Gruppe an die intrazelluläre Kinase-Domäne des jeweiligen Rezeptors. Durch die Bildung von Wasserstoffbindungen mit einem Aminosäurerest der betreffenden ATP-Bindungsstelle kann so die Trans- bzw. Autophosphorylierung inhibiert werden. [49]. Eine Vielfalt von Wechselbeziehungen zwischen dem Tumorstroma und den umliegenden Geweben wie Immunzellen, Blut- und Lymphgefäßen können das Tumorwachstum, das Ausmaß der Invasion und eine Metastasierung fördern. Die Prozesse der Angiogenese und Vaskulogenese können demnach in entarteten Tumoren die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sichern, sowie durch Neovaskularisation eine Invasion umliegender Gewebe bis hin zur Metastasierung begünstigen. Bedingt durch fortschreitendes Tumorwachstum kann eine zunehmende Hypoxie die Bildung von PDGF, FGF und VEGF induzieren [50-52]. Beispielsweise sorgt ein zentrales Sauerstoffdefizit vermittelt durch HIF-1 α (Hypoxia-induced factor-1 α) für eine erhöhte VEGF-A-Expression. Hierbei stellen PDGF-A zusammen mit VEGFR2 und VEGFR3 die wichtigsten Vermittler der Tumor-Angiogenese dar [42]. Die Betrachtung fehlregulierter Signalwege des FGF, VEGF und PDGF als wesentliche Mechanismen zur Entstehung und Progression des HNSCC stellt hierbei die Rationale für die Anwendung des „Triple-Angiogeneseinhibitors“ in dieser Studie dar.

Bislang konnte in zahlreichen Studien eine Überexpression und Amplifikation des FGFR für das HNSCC nachgewiesen werden [53, 54]. Schultz-Hector [55] konnte zudem eine Korrelation zwischen der FGF-Produktion und der Wachstumsrate in Plattenepithelkarzinomen von Menschen und Mäusen nachweisen. Untersuchungen von Margaritescu et al. [56] zeigten eine VEGF-Überexpression in 87 % der Proben oraler Plattenepithelkarzinome. Auch verringerte die Inhibition des VEGFR und seiner Liganden in einer Studie von Tong et al. [57] die Proliferationsrate von Zellen des HNSCC. In Zelllinien des HNSCC sowie im Blutserum HNSCC-erkrankter Patienten konnten darüber hinaus signifikant erhöhte PDGF-Expressionslevel nachgewiesen werden [58]. In derselben Untersuchung sorgte eine selektive Inhibition des PDGF zusätzlich für eine reduzierte VEGF-Expression, sodass hier ein Synergismus beider Wachstumsfaktoren vermutet werden kann.

Neben der Hemmung einer fehlgerichteten Angiogenese und Neovaskularisierung, könnte Nintedanib als „Triple-Angiokinaseinhibitor“ also auch in der Lage sein, synergistische Effekte oben genannter Rezeptoren sowie Tumorresistenzen durch sogenannte „Signalweg-Switches“ zu inhibieren. Hieraus lässt sich ein möglicher Vorteil gegenüber selektiven Inhibitoren ableiten.

Hilberg et al. [49] untersuchten das Wirkungsprofil von Nintedanib in einer experimentellen Studie an humanen Tumorzelllinien und an gesunden Zellen. Durch die Hemmung des MAPK- und AKT-Signalweges induzierte der Wirkstoff Apoptose und Antiproliferation in Perizyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen mit einer konstanten Wirkung von bis zu 32 Stunden nach Darreichung. Zudem wurden humane Tumorzelllinien (u. a. FaDu-Zellen des humanen Hypopharynxkarzinoms) in Xenograft-Modellen hinsichtlich der Tumorperfusion untersucht. Bei oraler Gabe kam es nach drei Tagen in MR-Analysen zu einer Senkung der Tumorperfusion durch Reduktion der Gefäßdichte und Gefäßstabilität.

Die Zulassung von Nintedanib für die Zweitlinien-Therapie des fortgeschrittenen NSCLC basiert maßgeblich auf den Erkenntnissen der LUME-Lung-Studie. Diese stellt eine RMC-Studie der Phase 3 dar, welche die Wirksamkeit einer

Kombinationstherapie aus Docetaxel und Nintedanib verglichen mit einer Docetaxel-Placebo-Kombinationstherapie an Patienten mit rekurrentem NSCLC untersuchte. Erste Analysen nach 7,1 Monaten zeigten ein erhöhtes mittleres PFÜ für die Kombinationstherapie mit Nintedanib sowie ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben [59].

Durch seine Anwendung in der Behandlung der choroidalen Neovaskularisation entwickelte sich Bevacizumab in den letzten Jahren vorallem in der Augenheilkunde zu einem populären Wirkstoff. Dieser stellt einen monoklonalen Antikörper dar, welcher den VEGFR selektiv inhibiert. Auch wenn der Wirkstoff im Vergleich zu Nintedanib nur als "single-agent" zu charakterisieren ist, konnten zahlreiche Studien der Phase II den Nutzen der Kombination mit Chemotherapie und Bestrahlung aufzeigen [60-62].

1.4.7 Zellzyklus und Polo-like-Kinase (PLK)

Polo-like-Kinasen nehmen eine Schlüsselrolle für die Regulation des Zellzyklus und die zelluläre Stressantwort von Eukaryoten ein. Beim Menschen sind vier Formen der PLK (PLK 1-4) beschrieben, von denen die PLK1 bislang am ausführlichsten erforscht ist. Sie gehören zur Gruppe der Serin- / Threoninkinasen und bestehen aus einer N-terminalen katalytischen Domäne sowie einer regulierenden C-terminalen Domäne. Während im Bereich des N-Terminus die ATP-Bindungsstelle befindlich ist, besteht der C-Terminus aus ein bis zwei spezifischen Polo-box-Domänen (PBD). Letztere dienen der Interaktion mit Zielproteinen und der Lokalisierung der PLK in der Zelle. Eine Bindung zwischen der PBD und der katalytischen Domäne verhindert dabei eine Interaktion mit Signalproteinen, wohingegen sich die Funktion der PLK bei Lösung dieser Bindung entfalten kann [63]. Zu den wichtigsten Funktionen der PLK1 gehört der Eintritt in die Mitose, die Zentrosomenreifung, die Ausbildung des Spindelapparates sowie die Bildung des Anaphase-promoting-complex (APC) und die durch Aktin vermittelte Zytokinese der Telophase. Dagegen hat die PLK3 ihre zentrale Funktion in der Aktivierung der Stressantwort, nach Schädigung der DNA oder der Mitosespindel [27]. Die PLK1 wird in physiologisch proliferierenden Zellen normalgradig exprimiert. Zahlreiche

Studien konnten dagegen eine Überexpression in maligne entarteten Zellen belegen. Hierzu gehören unter anderem Zellen der AML, des CRC, des BC, des NSCLC sowie des HNSCC [27, 64]. Untersuchungen von Knecht et al. [65] an Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC konnten durch m-RNA-Analysen für die große Mehrheit eine Überexpression der PLK1 identifizieren. Statistische Analysen dieser Studie zeigten zusätzlich eine günstigere 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit moderater PLK1-Überexpression gegenüber Patienten mit hochgradiger PLK1-Überexpression.

1.4.8 Volasertib

Volasertib gehört zur Gruppe der Dihydropteridinone und bindet selektiv an die ATP-Bindungsstelle der C-terminalen Domäne der Polo-like-Kinasen 1-3. Im Allgemeinen inhibiert Volasertib sowohl gesunde als auch maligne Zellen. In gesunden Zellen bewirkt der Wirkstoff dabei eine reversible Zellzyklusblockade der Phasen G1 und G2. In entarteten Zellen hingegen wird durch Volasertib ein irreversibler Zellzyklusarrest am G2-/M-Übergang mit nachfolgender Apoptose beschrieben [27, 66]. Nur wenige Untersuchungen zur Wirksamkeit von Volasertib für das HNSCC sind in der Literatur beschrieben. Eine präklinische Studie von Krause et al. [67] evaluierte den Effekt von Volasertib auf den Zellzyklus und die Proliferation von Zelllinien des HNSCC, darunter A-431 und FaDu-Zellen, in Kombination mit einer Bestrahlung von 60,5 Gy. Hierbei zeigte Volasertib einen dosisabhängigen antiproliferativen Effekt sowie eine Verringerung der Mitoserate und des Zellüberlebens. Hierbei kam es zu einer signifikant erhöhten lokalen Tumorkontrolle in Kombination mit Bestrahlung.

1.5 Zelluntergang

In der Literatur sind mit der Apoptose, der Nekrose und der Nekroptose drei Hauptmodelle des Zelluntergangs beschrieben. Die Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelluntergangs dar, welche während der Entwicklung und Morphogenese von Geweben essentiell ist. Zudem kann die Apoptose als Reaktion auf interne Stimuli (z. B.: zelluläre Schäden, Veränderung der DNA)

oder als Folge externer Reize (z. B. benachbarte Zellen, extrazelluläre Liganden) induziert werden [68].

Die Nekrose stellt dagegen grundlegend den Prozess eines pathologisch bzw. traumatisch bedingten ungeplanten Zelluntergangs dar, welcher mit einer Inflammationsreaktion einhergeht. Unabhängig vom Energiestoffwechsel kommt es bei der Nekrose zu einem Anschwellen der Zelle mit Auflösung des Nucleus und der Zellmembran sowie einer Zellyse. Lichtmikroskopisch lässt sich eine nekrotisierte Zelle daher deutlich von einer apoptotischen Zelle unterscheiden. Die Prozesse der Nekrose und Apoptose wurden bislang stets diametral zueinander verstanden. Das Prinzip der Nekroptose rückt diese klare Einteilung jedoch zunehmend in den Hintergrund. Sie konnte als programmierte Form der Nekrose identifiziert werden.

1.5.1 Apoptose

Der Prozess der Apoptose durchläuft mehrere Phasen. Hierzu gehören die Initiationsphase, die Exekutionsphase sowie die Phagozytose- und Degradationsphase. Die Initiation der Apoptose kann dabei sowohl durch extrazelluläre wie auch durch intrazelluläre Faktoren beeinflusst werden. Entsprechend wird in der Literatur zwischen extrinsischer und intrinsischer Initiation unterschieden [68]. Die extrinsische Initiation kann weiterhin auf zwei Wegen erfolgen. Als direkter Weg kann die Bindung von Granzym-B an die extrazelluläre Zellmembran angesehen werden. Die Protease Granzym-B wird von aktivierten zytotoxischen T-Zellen oder natürlichen Killerzellen gebildet und sorgt nach Aufnahme ins Zytosol für die Apoptoseinduktion [69].

Die extrinsische Initiation wird zusätzlich durch Bindung extrazellulärer Liganden (Todesliganden) an speziellen Rezeptoren (Todesrezeptoren) der Zellmembran eingeleitet. Zu den am besten erforschten Todesliganden zählen hierbei FAS-Ligand (CD95-L), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und TNF-assoziiertes Apoptose-induzierendes Ligand (TRAIL) [68]. Sie binden Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (Todesrezeptoren), welche spezifische Signalkaskaden ermöglichen [70]. Dies lässt sich am Beispiel des TNF-Signalwegs anschaulich beschreiben.

Die Tumornekrosefaktoren TNF- α und TNF- β sind zentrale Mediatoren von Entzündungsreaktionen und Apoptose. Bindet TNF einen TNF-Rezeptor (TNF-R) kommt es zu einer Rezeptortrimerisierung. Intrazelluläre, funktionelle Domänen (Death-Domänen) dieser drei Rezeptor-Monomere können so miteinander interagieren und die Anheftung eines Adapterproteins TRADD (TNFR1-associated Death Domain Protein) ermöglichen [71].

Zusätzlich wird das Protein RIP-Kinase-1 (Receptor interacting protein-kinase) rekrutiert. Dieses vermag mit einer eigenen Todesdomäne an den TNF-Rezeptor, TRADD und FADD zu binden, sodass es zu einer Komplexbildung kommt. Der somit entstehende, membrangebundene Komplex-1 wird gebildet von RIP-1, TNF-R, TRADD, TRAF (TNF-Rezeptor-associated-factor) und cIAP (cellular-inhibition-of-apoptosis-protein). Die Bindung von RIP-1 zu Komplex-1 wird hierbei mithilfe einer Ubiquitylierung des Proteins durch cIAP ermöglicht. Auf diese Weise initiiert Komplex-1 die Signalwege der Inflammation (NF- κ B-Pathway oder die MAP-Kinase-Kaskade). Eine fehlende Ubiquitylierung von RIP-1 dagegen ermöglicht die Bildung des als "DISC" (Death-inducing-signaling-complex) bezeichneten Komplex-2. Dieser wird gebildet durch TRADD, FADD (Fas-associated death domain), der Caspase-8 und RIP-1. Eine Verminderung oder Blockade der cIAP-Proteine kann somit zu einer vermehrten Umwandlung von Komplex-1 in Komplex-2 führen und folgend die extrinsische Apoptose induzieren. Durch die Aktivierung der Caspase-8 wird die RIP-Kinase inhibiert und die Exekutionsphase initiiert. Caspasen stellen dabei Cysteinproteasen dar, welche die Apoptose durch proteolytische Spaltung vorantreiben.

Die intrinsische Initiation der Apoptose wird durch zelluläre Stimuli wie DNA-Schädigung oder Tumorsuppressoren (z. B. p53) initiiert. In der Folge kommt es durch die Hemmung des antiapoptotischen Bcl-2-Gens zu einer vermehrten Expression der Proteine BAD und BAX. Diese werden als Dimere in die äußere Mitochondrienmembran eingebaut, sodass es zu einer Permeabilitätssteigerung kommt. Sie führt zum Austritt von Cytochrom-c, Protonen, Calciumionen und proapoptotischen Faktoren wie SMAC (Second-mitochondria-derived-activator-

of-caspases) [68]. Cytochrom-c bildet mit dem Apoptosis-activating-factor (APAF-1) und der Procaspase-9 einen als "Apoptosom" beschriebenen Komplex [72]. Das Resultat des Apoptosoms ist die Aktivierung der Caspase-9 mit folgender Einleitung der Exekutionsphase.

SMAC stellt in diesem Zusammenhang einen endogenen Inhibitor der IAP-Proteine (z. B.: cIAP) dar. Diese Inhibition erfolgt an der N-terminalen Domäne und vermag somit die inhibitorische Wirkung der IAP-Proteine auf Caspasen zu unterbinden [73].

Zu Beginn der Exekutionsphase kommt es zur Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Zu ihren Substraten zählen sogenannte ICAD (Inhibitor of Caspase-activated-DNase), Zellzyklusregulatoren, Membranproteine, Phospholipide und Proteine des Zytoskeletts sowie der Zelladhäsion. Eine vermehrte Aktivierung von DNasen sorgt für die apoptotische DNA-Fragmentierung. Spaltungen von Zellzyklus- und Zelladhäsionsproteinen sorgen für die Bildung intrazellulärer Vesikel (Apoptotic bodies) und deren Abschnürung. Zudem gelangt Phosphatidylserin, durch die Umverteilung der Membranbestandteile an die extrazelluläre Domäne der Vesikelmembran. Dieses wird von Rezeptoren spezieller Zellen erkannt und phagozytiert. Hierdurch wird die Phase der Phagozytose und Degradation eingeleitet [72].

1.5.2 Synthetische SMAC-Analoga (Smac-mimetics)

Als endogene Apoptoseinhibitoren zählen cIAP-1, cIAP-2 und XIAP zu den Proteinen der IAP-Familie (Inhibition-of-apoptosis-proteins). cIAP-1 und cIAP-2 blockieren die extrinsische Apoptose durch die Verhinderung der Bildung von Komplex-2 (DICS). XIAP (X-linked-inhibition-of-apoptosis-protein) dagegen bindet und inhibiert die Exekutions-Caspasen 3, 7 und 9 und kann somit antiapoptotisch wirken. In Studien an Tumoren des HNSCC konnte eine Überexpression von cIAP-1 und cIAP-2 mit einer erhöhten Rate lymphogener Metastasen und einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden [74, 75]. Diese Erkenntnisse machen IAP-Proteine zu attraktiven Zielstrukturen in der Antitumorthherapie des HNSCC. Auf der Basis dieser Rationale wurden in der letzten Dekade sogenannte SMAC-Mimetics entwickelt. Sie stellen

Analoga des physiologisch aus Mitochondrien stammenden SMAC (Second-mitochondria-derived-activator-of-caspases) dar. Vertreter dieser Substanzgruppe sind dazu in der Lage, proapoptotisch zu wirken und den Apoptoseresistenzen entarteter Zellen entgegenzuwirken. Für die Vertreter Debio-1143 und SM-164 konnten in präklinischen Studien bereits radiosensibilisierende Effekte nachgewiesen werden [76, 77]. Einen sensibilisierenden Effekt gegenüber, durch Gemcitabine induzierter Apoptose, konnten Sun et al. [78] für den Vertreter GTA/GTC an Zellen des HNSCC nachweisen. In der vorliegenden Studie wurde der Wirkstoff LCL-161 verwendet. LCL-161 ist ein oral verfügbarer, monovalenter Inhibitor der IAP-Vertreter XIAP und cIAP-1. Präklinisch konnte für eine Monotherapie mit LCL-161 bereits ein Antitumoreffekt für solide Tumoren demonstriert werden [79]. Auch in Kombination mit Paclitaxel konnte LCL-161 das Zellüberleben von NSCLC-Zellen durch Apoptoseinhibition reduzieren [73].

Brands et al. [80] untersuchten die Wirkung von LCL-161 in Mono- und Kombinationstherapie mit Fas-Ligand (FAS-L) an fünf Zelllinien des HNSCC. FAS-L konnte in dieser Untersuchung das Zellüberleben in drei von fünf Zelllinien senken. Dieser Effekt wurde durch die Kombinationsanwendung mit LCL-161 signifikant verstärkt. Zudem konnte eine FAS-L-resistente Zelllinie durch Kombinationsanwendung mit LCL-161 für Apoptose sensibilisiert werden. Als grundlegender Mechanismus wurde in Western-blot-Analysen hierzu eine Degradation von cIAP-1 nachgewiesen.

1.6 Fragestellung

Wie stellt sich der zellreduktive Effekt der verwendeten TKI (Afatinib, Nintedanib, Volasertib) in Monotherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Cisplatin dar?

Zeigt die Kombinationstherapie der TKI (Afatinib, Nintedanib, Volasertib) mit Cisplatin antagonistische oder synergistische Effekte gegenüber einer Monotherapie mit dem jeweiligen TKI oder Cisplatin?

Ist die Kombinationsanwendung aus TKI (Afatinib, Nintedanib, Volasertib) und dem Smac-Analogon LCL-161 einer Monotherapie mit TKI bezüglich des zellreduktiven Effektes überlegen?

Kann LCL-161 die untersuchten Zelllinien für Apoptose sensibilisieren?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die untersuchten Zelllinien wurden ursprünglich durch das Tumorzentrum der Universität Pittsburgh (UPCI) zur Verfügung gestellt [81]. Die Zellen des fortgeschrittenen HNSCC sind hierbei zur Herstellung von Dauerkulturen immortalisiert und kryokonserviert worden. Die Entitäten der Tumorzelllinien sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 2 – Ursprung und TNM-Status der verwendeten Zelllinien [82]

Zelllinie	Ursprung	TNM
PC-1	Larynxkarzinom der Glottis	pT2N0M0 G2
PC-13	Orales Plattenepithelkarzinom des Retromolarraums	pT4N1M0 G3
PC-52	Primäres Karzinom der aryepiglottischen Falte	pT2N0M0 G2
SCC-9	Primäres Zungengrundkarzinom	pT4N3M0 G2
SCC-68	Primäres Zungenkarzinom	pT4N0M0 G1

Die aufgeführten Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und einem und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Ein Mediumwechsel fand vier Mal pro Woche statt. Dem Medium (Dulbecco's modified eagle medium® - DMEM) wurden 10% fetales Kälberserum (FCS), Glutamin (1 %) sowie Streptomycin (1 %) zugesetzt. Nach drei Tagen erfolgte das Anlegen von Subkulturen. Die adhärennten Zellen wurden hierzu, nach Absaugen des verbrauchten Mediums, mit einem Puffermedium (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline®) abgespült und mittels Trypsin/EDTA vom Zellflaschenboden abgelöst. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien erfolgte ein Austausch des Nährmediums sowie das Splitting im Verhältnis 1:3 (PC-52, SCC-9), 1:4 (SCC-68) und 1:10 (PC-1, PC-13).

2.2 Semiquantitativer Nachweis von Target-Molekülen

Zur Quantifizierung der Genexpression relevanter Zielproteine in den jeweiligen Zelllinien wurde das Verfahren der sqRT-PCR (Semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction) angewendet. Zunächst wurde für jede Zelllinie ein Zellhomogenisat erstellt, aus dem nach Zentrifugation und unter Verwendung des RNeasy[®]-Mini-Kits reine Ribonukleinsäure (RNA) isoliert wurde. Die Konzentration der RNA konnte daraufhin photometrisch mithilfe des NanoDrop-2000-Spectrophotometers (260/280nm) bestimmt werden. Für die Synthese komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) kam das QuantiTect[®]-Reverse-Transcription-Kit zur Anwendung (1µg RNA/Probe). Die Amplifikation der cDNA wurde mithilfe des Real-Time-PCR-Detections-Systems[®] (CFX96) durchgeführt. Zuvor wurden den Proben 25 µl des QuantiTect[®]-SYBR[®]-Green-PCR-Kit sowie 1,5 µl eines genspezifischen QuantiTect[®]-Primers beigefügt (Tabelle 5). Jedes Experiment wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und jede Messung zweifach vorgenommen.

Für die semiquantitative Analyse wurde die Delta-C_T-Methode herangezogen [83]. Hierbei wird die relative Expressionsrate eines nachzuweisenden Gens im Verhältnis zu dem ubiquitär exprimierten Gen β-Aktin bestimmt. Dieses zählt zu den sogenannten "hauseigenen Genen" der Zelle und wird in nahezu allen Zellen exprimiert wird.

2.3 Versuchsaufbau und Durchführung

2.3.1 Kristallviolett-Assay

Zur Untersuchung der Zellreduktion genannter Wirkstoffe wurde der Kristallviolett-Test angewendet. Dieses Verfahren ermöglicht eine Quantifizierung der Zellzahl durch die spektralphotometrische Messung des Farbstoffs Kristallviolett und somit der Anfärbbarkeit der Zellen. Nach dem Detachment der kultivierten Zellen aus Zellkulturflaschen mittels Trypsin/EDTA erfolgte ihre Überführung in Zellsuspensionen. Daraufhin wurde die Zellzahl jeder Suspension mithilfe des Casy-Zellzählsystems[®] ermittelt. Auf der Basis dieser Zellzählung erfolgte die Aussaat von 10.000 Zellen pro Well auf

Mikrotiterplatten. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (37° Celsius, 5 % CO₂-Gehalt) erfolgte ein erneuter Wechsel des Nährmediums (DMEM-Dulbecco's modified eagle medium) und die Stimulation der Zellen. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und jede Zellkavität für 12 Minuten mit einem Gemisch aus 0,1 % Kristallviolett und 20 % Methanol versetzt. Hiernach erfolgten eine vierfache gründliche Waschung der Mikrotiterplatten mit destilliertem Wasser sowie eine Lufttrocknung über 24 Stunden. Zur photometrischen Quantifizierung wurden jeder Zellkavität 100 µl Methanol hinzugefügt, um die in den Wells befindlichen Zellen zu lösen. Durch einen Mikrotiterplattenleser (ELISA-Reader®) erfolgte nach 10 Minuten eine Absorbionsmessung bei 595 nm.

2.3.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels Excel 2010® sowie SPSS-Statistic-20®. Die durch Absorbionsmessungen ermittelten Absolutwerte einzelner Messungen wurden als Relativmaß zum Kontrollwert nach einer Inkubation von 72 Stunden normalisiert, in Prozent aufgeführt und als Dosiswirkungskurven dargestellt. Um einen von der Substratkonzentration unabhängigen Parameter für die Effektivität des Wirkstoffes zu erhalten, wurde die zelllinienspezifische halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) eines jeden Wirkstoffes bestimmt. Sie kann als diejenige Wirkstoffkonzentration angesehen werden, die zu einer halbmaximalen Inhibition der Zielsubstanz führt. Sie kann mithilfe von Verdünnungsreihen unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen und Logarithmierungen geometrisch bestimmt oder errechnet werden. Die Ausgangskonzentrationen der Verdünnungsreihen orientierten sich an den Herstellerangaben. Die grafische Darstellung wurde durch eine Lotfällung aus den Dosiswirkungskurven ermittelt. Die mathematische Berechnung erfolgte mittels MEDAS® (Grund EDV-Systeme, Margetshöchheim). Die Ober- und Untergrenzen der relativen Zellzahl wurden hierbei jeweils durch die Koordinatenpaare x_2 und y_2 respektive x_1 und y_1 definiert, logarithmiert und linear interpoliert (Abbildung 1).

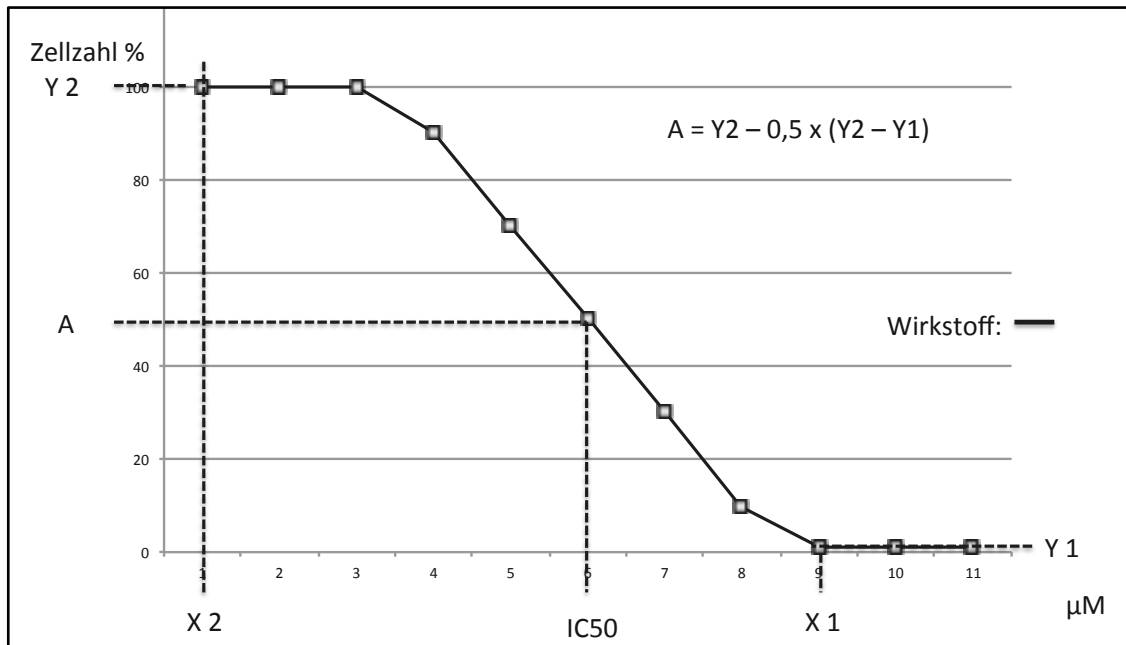


Abbildung 1 – Dosiswirkungskurve und graphische Darstellung der IC₅₀

Die Dosiswirkungskurven einiger Messungen ließen aufgrund des Verdünnungsbereiches lediglich eine sinnhafte grafische beziehungsweise rechnerische Ermittlung des IC₂₀-Wertes zu. Er ist als diejenige Wirkstoffkonzentration anzusehen, die zu einer Inhibition der Zielsubstanz um 20 % führt. Auf diese Weise konnten die zelllinienspezifischen Effekte innerhalb der gleichen Wirkstoffgruppe verglichen werden. Für weiterführende Untersuchungen, welche einen IC₅₀-Wert erforderten, wurde in einem solchen Fall auf den IC₅₀-Wert aus Herstellerangaben zurückgegriffen. Zur Analyse der Mittelwertunterschiede wurden T-Tests (Anwendungen A, B und D) sowie Wilcoxon-Tests (Anwendung C) durchgeführt.

2.3.3 Stimulation der Zelllinien

Die Stimulation der Zellen erfolgte für die jeweiligen Wirkstoffe gemäß definierter Stimulationsmuster, welche den Interventionen A bis C zugeordnet werden können (Tabelle 3). Für jede Intervention wurden mindestens drei repräsentative Messungen je Wirkstoff und Zelllinie gemittelt.

Tabelle 3 – Übersicht der Interventionen

Muster	Interventionen	Anzahl Stichproben (n _{Ges})
A	TKI – Monotherapie	50
B	TKI und CP – Kombinationstherapie	45
C	TKI und LCL-161	15

Ziel der Anwendungen A und B war die Bestimmung der Zellzahlreduktion sowie der spezifischen IC₅₀/IC₂₀ der Wirkstoffe Afatinib, Nintedanib und Volasertib in Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin. Im Unterschied zur Monotherapie (A) wurde für die Kombinationsanwendung (B) das Medium zuvor mit der zelllinienspezifischen IC₅₀ für Cisplatin versetzt. Die dafür benötigten Daten wurden in vorausgehenden Untersuchungen durch Mitglieder der Studiengruppe für alle verwendeten Zelllinien festgelegt und bereitgestellt (Tabelle 4). Die IC₅₀-Werte der TKI-Monotherapie wurden zudem für die Stimulationen der Anwendung C weiterverwendet.

Tabelle 4 – Mittlere Inhibitorische Konzentration von Cisplatin [82]

Wirkstoff	IC ₅₀ (µM)				
	PC-52	SCC-68	SCC-9	PC-1	PC-13
Cisplatin	5	14	14	14	1
	0,8*	2,5*	2,5*	0,18*	0,18*

*Angabe des IC₂₀-Wertes

Das Ziel der Anwendung C war der Vergleich der Zellzahlreduktion der Wirkstoffe Afatinib, Nintedanib und Volasertib in Mono- und Kombinationstherapie mit dem Smac-Analogon LCL-161.

Hierzu wurden die TKI in mittlerer inhibitorischer Konzentrationen appliziert. Weiterhin wurde der Wirkstoff LCL-161 in halbmaximaler inhibitorischer Konzentration (3,3 μ M; Herstellerangaben) allein oder in Kombination mit den jeweiligen TKI angewendet.

Für die Anwendungen A und C dienten Bestückungen mit reinem Nährmedium (DMEM- Dulbecco's modified eagle medium) als Kontrollwerte. Für die Kontrollwerte der Intervention B wurde das Nährmedium zusätzlich mit der zelllinienspezifischen IC_{50} für Cisplatin versetzt.

2.4 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

Tabelle 5 – Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

Wirkstoffe	Hersteller
Afatinib	BIBW2992, Selleckchem, USA
Cisplatin	Cis-Diammindichloroplatin 1 mg/ml Teva GmbH, Germany
LCL-16	MedChem Express LLC, Sollentuna, Sweden
Nintedanib	BIBF1120, Selleckchem, USA
Volasertib	BI6727, Selleckchem, USA
Verbrauchsmaterialien	
Aqua B. Braun	Braun
CASY clean	Roche Diagnostics
CASY cups	Roche Diagnostics
CASY ton	Roche Diagnostics
Cellstar Tube	Greiner bio-one
Dimethylethylsulfoxid (DMSO)	Life technologies GmbH
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Sialine (DPBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einweg Petrischale	Thermo Scientific
Eppendorf epT.I.P.S Motion	Eppendorf AG
Eppendorf Serological Piptes	Eppendorf AG
Eppendorf Tube	Eppendorf AG
Fetales Kälberserum	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glutamin	Deutschland
Methanol	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Microwell Platten, 96 wells	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich
Pipettenspitzen für Mikroliterpipetten Typ Eppendorf	Kat-Nr. L2143 Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,25%/0,53 mM)	Eppendorf AG
Varispenser plus	Biochrom KG
Zellkulturflaschen	Eppendorf AG Nunc GmbH und Co. KG
Geräte	
Brutschrank	Thermo Scientific
Casy cell counter, Analyzer System (Zellzählssystem)	Casy, Roche, Penzberg, Deutschland

ELISA-Reader Infinite F50	Tecan Trading AG
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Eppendorf Easypet 3	Eppendorf AG
Light Cycler	Roche Diagnostics
Mehrkanalpipetten Typ Eppendorf	Eppendorf AG
Research Plus multi 8-channel	
Nano-Drop-2000-Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Pipette Typ Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG
Pipettenhilfe Typ accu - jet pro	Eppendorf AG
Steribank Safe 2020	Thermo Scientific
Universal 320R Zentrifuge	Hettich Lab Technology
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad Typ 1083	Gesellschaft für Labortechnik
Kommerziell erworbene Kit-Systeme	
RNeasy® Mini-Kit	QIAGEN®, Venlo, Niederlande
QuantiTect® Rev.-transcription-kit	QIAGEN®, Venlo, Niederlande
QuantiTect® SYBR® Green-PCR-kit	QIAGEN®, Venlo, Niederlande
QuantiTect® Gene-specific-primer	QIAGEN®, Hilden, Deutschland
QT00999957 (EGFR_vc.1)	
QT00012719 (PDGFRA_1)	
QT00082327 (PDGFRB_1)	
QT00102837 (FGFR1_1)	
QT00098560 (FGFR2_1)	
QT01000685 (FGFR3_1)	
QT00027636 (FGFR4_1)	
QT00027638 (VEGFR)	
QT00027631 (PLK)	
Software	
Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Light Cycler relative qualification software	Roche Diagnostics
RdrOLE Software	Tecan
SPSS statistics 20	IBM Watson
MEDAS®	Grund EDV-Systeme, Margetshöchheim

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von Zielstrukturen

Die Gene relevanter Rezeptoren wurden als Zielstrukturen der Expressionsanalyse betrachtet. Abbildung 2 stellt die Auswertung getrennt nach Zelllinien und den jeweiligen Rezeptoren sowie deren Subtypen dar. Die Expressionslevel des EGFR wurden durch vorausgehende Analysen der Studiengruppe zur Verfügung gestellt [84]. Auf der y-Achse befinden sich die Relativwerte der Genexpression in Bezug auf die Expression des Houskeeping-Gens β -Aktin. Für den Vergleich der Zelllinien untereinander wurden unterschiedliche Genexpressionslevel wie folgt definiert: (E1) sehr starke Expression ($\geq 0,1$), (E2) starke Expression (0,09 - 0,001), (E3) mittelstarke Expression ($\leq 0,0009$ - 0,0001), (E4) schwache Expression ($\leq 0,00009$).

Die Zelllinie PC-1 zeigt eine sehr starke Expression für PLK ($0,383471037 \pm 0,122$) und FGFR-2 ($0,124 \pm 0,135$). Die Expression der Gene für EGFR ($0,0025$), VEGFR-1 ($0,0011 \pm 0,001$) und FGFR-4 ($0,0073 \pm 0,0035$) ist als stark zu charakterisieren. Ein mittelstarkes Expressionslevel zeigt sich dagegen für die Rezeptoren VEGFR-3 ($0,00061 \pm 0,0004$), FGFR-1 ($0,0008 \pm 0,0005$), FGFR-3 ($0,00021 \pm 0,000036$), PDGFR-A ($0,00032 \pm 0,0002$) und PDGFR-B ($0,00015 \pm 0,000076$). VEGFR-2 ist nicht nachweisbar.

Für die Zelllinie SCC-9 lässt sich ein sehr starkes Expressionslevel ausschließlich für FGFR-2 ($0,114 \pm 0,079$) ermitteln. Für die Zielstrukturen EGFR ($0,004$), PLK ($0,05 \pm 0,013$) und FGFR-4 ($0,035 \pm 0,036$) lässt sich das Expressionsverhalten als stark beschreiben. Für VEGFR-1 ($0,0006 \pm 0,0005$), VEGFR-3 ($0,00068 \pm 0,0007$), FGFR-1 ($0,0004 \pm 0,0003$), FGFR-3 ($0,00085 \pm 0,0011$) sowie PDGFR-B ($0,00019 \pm 0,00008$) zeigt sich ein mittelstarkes Expressionslevel. Bei nicht nachweisbarem VEGFR-2 lässt sich außerdem eine schwache Expression für PDGFR-A ($0,000038 \pm 0,000043$) beobachten.

Für PC-13 kommt es zur stärksten Ausprägung von PLK mit Expressionswerten von $0,23 \pm 0,007$. Ein starkes Expressionsniveau liefert die Analyse von PC-13

für die Zielstrukturen EGFR (0,008), VEGFR-3 (0,0012 ± 0,0008), FGFR-1 (0,0018 ± 0,0012), FGFR-2 (0,043 ± 0,016), FGFR-4 (0,0048 ± 0,0022). Für die Rezeptoren VEGF-1 (0,0001 ± 0,00009) und FGFR-3 zeigt sich ein mittelstarkes Expressionslevel. Nur schwach ist dagegen die Expression der Gene für den PDGFR-A (0,00007 ± 0,000067) und PDGFR-B (0,00008 ± 0,00006) ausgeprägt. VEGFR-2 ist auch hier nicht nachzuweisen.

Die Betrachtung der Zelllinie PC-52 liefert sehr starke Expressionswerte für PLK (0,11 ± 0,016) sowie FGFR-1 (0,13 ± 0,14). Ein starkes Expressionsniveau lässt sich für EGFR (0,0015), FGFR-2 (0,029 ± 0,051), FGFR-3 (0,0028 ± 0,0026) und FGFR-4 (0,002 ± 0,0031) bestimmen. Unter allen Zelllinien ergeben sich bei PC-52 die höchsten Expressionswerte für FGFR-1 und FGFR-3. Ein mittleres Expressionslevel kann für VEGFR-1 (0,0001 ± 0,0002) und PDGFR-B (0,00011 ± 0,00005) betrachtet werden. Neben einer nur schwachen Expression von PDGFR-A ist VEGFR-2 nicht nachzuweisen.

Die Zelllinie SCC-68 zeigt ebenfalls ein sehr starkes Expressionsniveau für PLK (0,34 ± 0,019). Für die Zielstrukturen EGFR (0,0125), VEGFR-3 (0,0025 ± 0,002), FGFR-1 (0,046 ± 0,06), FGFR-2 (0,084 ± 0,12) und FGFR-4 (0,0034 ± 0,0035) kann ein starkes Expressionslevel beobachtet werden. Im Vergleich der einzelnen Zelllinien untereinander fällt auf, dass SCC-68 die höchsten Expressionswerte für VEGFR-3 liefert. Neben einer mittleren Expression für VEGF-1 (0,0002 ± 0,0001) und PDGFR-A (0,0001 ± 0,00011) kann für das Gen des VEGFR-2 (0,000008 ± 0,00001) lediglich ein schwaches Expressionslevel nachgewiesen werden. Allerdings ist SCC-68 unter allen untersuchten Zelllinien die Einzige, die den Nachweis einer Expression dieses Rezeptors zulässt.

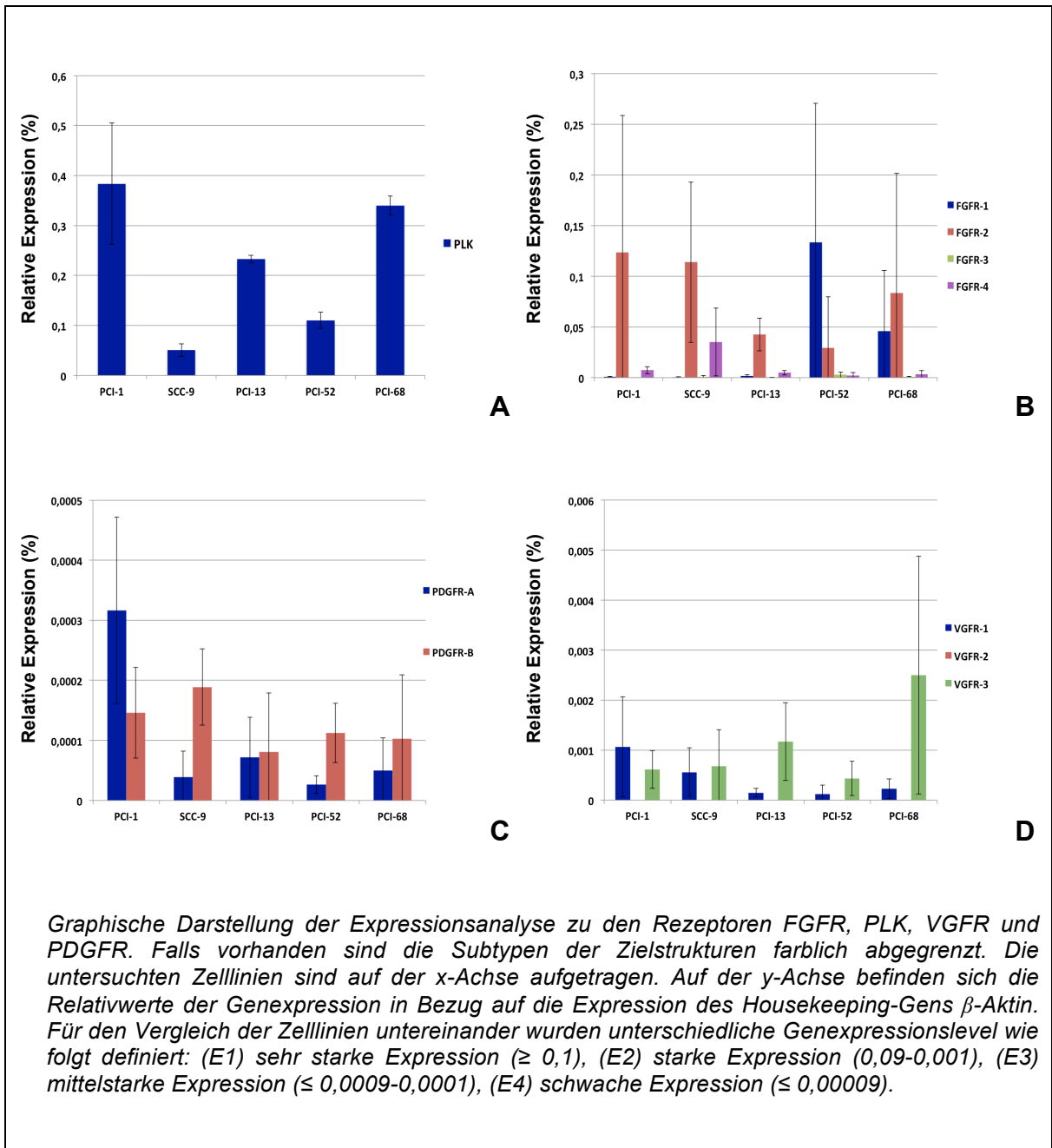


Abbildung 2 – Relative Expression der Zielstrukturen

3.2 TKI-Monotherapie und Kombinationstherapie mit Cisplatin

3.2.1 Afatinib

Die Wirksamkeit von Afatinib in Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin ist in Abbildung 3 dargestellt. Hierbei wurde für den TKI eine Log-2-Verdünnungsreihe mit einer Range von 0,04 bis 10 μM verwendet. Die Inkubation der entsprechenden Tumorzelllinien zeigt im Überblick ein heterogenes Ansprechverhalten mit marginalen Unterschieden der Ansprechraten. Für einige der Zelllinien ist ein deutlicher Abfall der Zellzahl bereits in den niedrigen Dosisstufen zu beobachten, welcher zusätzlich die Bestimmung des IC_{20} -Wertes notwendig machte. Tabelle 6 zeigt die erhobenen IC_{50} - bzw. IC_{20} -Werte der Anwendungen im Überblick.

Monotherapie

Bei Betrachtung der Zelllinie PC-52 ergibt sich eine maximale Zellzahlreduktion bis auf $11,20 \pm 2,68$ % der Ausgangszellzahl, wobei sich eine mittlere inhibitorische Konzentration von $3,3 \mu\text{M}$ ergibt. Ein vergleichbarer zytoreduktiver Effekt findet sich bei der Zelllinie PC-13 ($10,48 \pm 2,24$ %). Für SCC-68 resultiert im Vergleich aller Zelllinien untereinander die höchste maximale Zellzahlreduktion bis auf $5,32 \pm 3,99$ % sowie eine entsprechende IC_{50} von $1,7 \mu\text{M}$. Eine ähnlich hohe maximale Zytoreduktion auf $5,61 \pm 4,44$ % des Ausgangswertes kann für PC-1 festgestellt werden. Für SCC-9 konnte die relative Zellzahl auf $19,84 \pm 11,75$ % gesenkt werden. Die zugehörige IC_{50} liegt bei $1,2 \mu\text{M}$. Im Vergleich der Zelllinien untereinander ergibt sich somit die niedrigste mittlere inhibitorische Konzentration für SCC-9, gefolgt von SCC-68 und PC-52. Für die Zelllinien PC-1 und PC-13 machte eine hohe Reduktion der Zellzahl (< 50 %) in den niedrigen Verdünnungsbereich die Erhebung des IC_{20} -Wertes notwendig. Diese Werte liegen bei $2,0 \mu\text{M}$ (PC-1) beziehungsweise $3,4 \mu\text{M}$ (PC-13). Im direkten zeigen sich bezüglich der IC_{20} aller Zelllinien jedoch nur unwesentliche Unterschiede in den Ansprechraten.

Kombinationstherapie

Die Kombinationsanwendung aus Afatinib und Cisplatin ruft für die Zelllinie PC-52 die höchste maximale Zellzahlreduktion von bis zu $7,17 \pm 4,54$ % hervor. Die entsprechende mittlere inhibitorische Konzentration liegt hier bei $2,2 \mu\text{M}$. Die zweithöchste maximale Zytoreduktion ergibt sich für SCC-68 ($7,99 \pm 6,74$ %). Mit einer maximalen Reduktion der Zellzahl von bis zu $9,45 \pm 8,67$ % ordnet sich die Zelllinie PC-13 auf Rang 3 ein. Die beiden niedrigsten zytoreduktiven Effekte konnten für die Zelllinien SCC-9 ($22,86 \pm 19,19$ %) sowie PC-1 ($16,98 \pm 15,62$ %) festgestellt werden. Beim zelllinienspezifischen Vergleich der IC_{50} resultiert für die Zelllinie SCC-9 ein besonders niedriger Wert von $0,3 \mu\text{M}$. Die mittlere inhibitorische Konzentration der Zelllinien PC-52 liegt mit $2,2 \mu\text{M}$ höher. Für die Zelllinien SCC-68 sowie PC-13 wurde jeweils ein IC_{20} -Wert von $2,2 \mu\text{M}$ respektive $1,9 \mu\text{M}$ erhoben. Betrachtet man die Ergebnisse der IC_{20} so sind für drei von fünf Zelllinien nur marginale Unterschiede zu erkennen. Der Wirkungseffekt auf Zellen der Linie PC-52 zeigt sich allerdings im Vergleich zu den übrigen Zelllinien mit bestimmbarer IC_{20} etwas abgeschwächt. Das Ansprechen der Zelllinie PC-1 auf die Kombinationsanwendung ließ leider keine Berechnung des IC-Wertes zu.

Vergleich der Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin

Hinsichtlich der zelllinienspezifischen Zytoreduktion sind im Überblick keine signifikanten Unterschiede zwischen der Mono- und der Kombinationstherapie zu erkennen. Der Vergleich der IC_{20} -Werte pro untersuchte Zelllinie zeigt nur sehr geringe Abweichungen auf (Tabelle 6). Grafisch unterliegt für PC-1 die maximale Zytoreduktion unter Verwendung der Kombinationstherapie der maximalen Zytoreduktion unter Monotherapie deutlich ($16,98 \pm 15,62$ % gegenüber $5,61 \pm 4,44$ %). Ebenso wird, bei Betrachtung der Dosiswirkungskurven für die Zelllinie PC-52 im Verdünnungsbereich von 0 bis $2,5 \mu\text{M}$ ein stärkerer zytoreduktiver Effekt der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie hervorgerufen. Ein Vergleich der mittleren inhibitorischen Konzentrationen unterstreicht diesen Unterschied zwar, zeigt aber keine Signifikanz. Hier resultiert für die Anwendung mit Cisplatin ein IC_{50} -Wert von $2,2$

µM gegenüber 3,3 µM für die alleinige Anwendung von Afatinib. Für die Zelllinien SCC-68 sowie SCC-9 ergibt sich im mittleren Konzentrationsbereich (0,08 - 2,5 µM) grafisch eine höhere Zellzahlreduktion für die Kombinationsanwendung. Für SCC-9-Zellen findet sich hierbei eine mittlere inhibitorische Konzentration von 0,3 µM für die Kombinationstherapie wieder. Diese erscheint gegenüber einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 1,2 µM für die Monotherapie verringert, jedoch bleiben auch hier signifikante Unterschiede aus.

Tabelle 6 – IC₅₀ (µM) Afatinib in Mono- und Kombinationstherapie

Wirkstoff Zelllinie	IC ₅₀ (µM)				
	PC-52	SCC-68	SCC-9	PC-1	PC-13
Afatinib	3,3	1,7	1,2		
	5,47*	2,73*	3,79*	2,0*	3,4*
Afatinib + Cisplatin	2,2		0,3	**	
	5,24*	2,2*	2,02*		1,9*

*Angabe des IC₂₀-Wertes, ** IC-Wert nicht bestimmbar

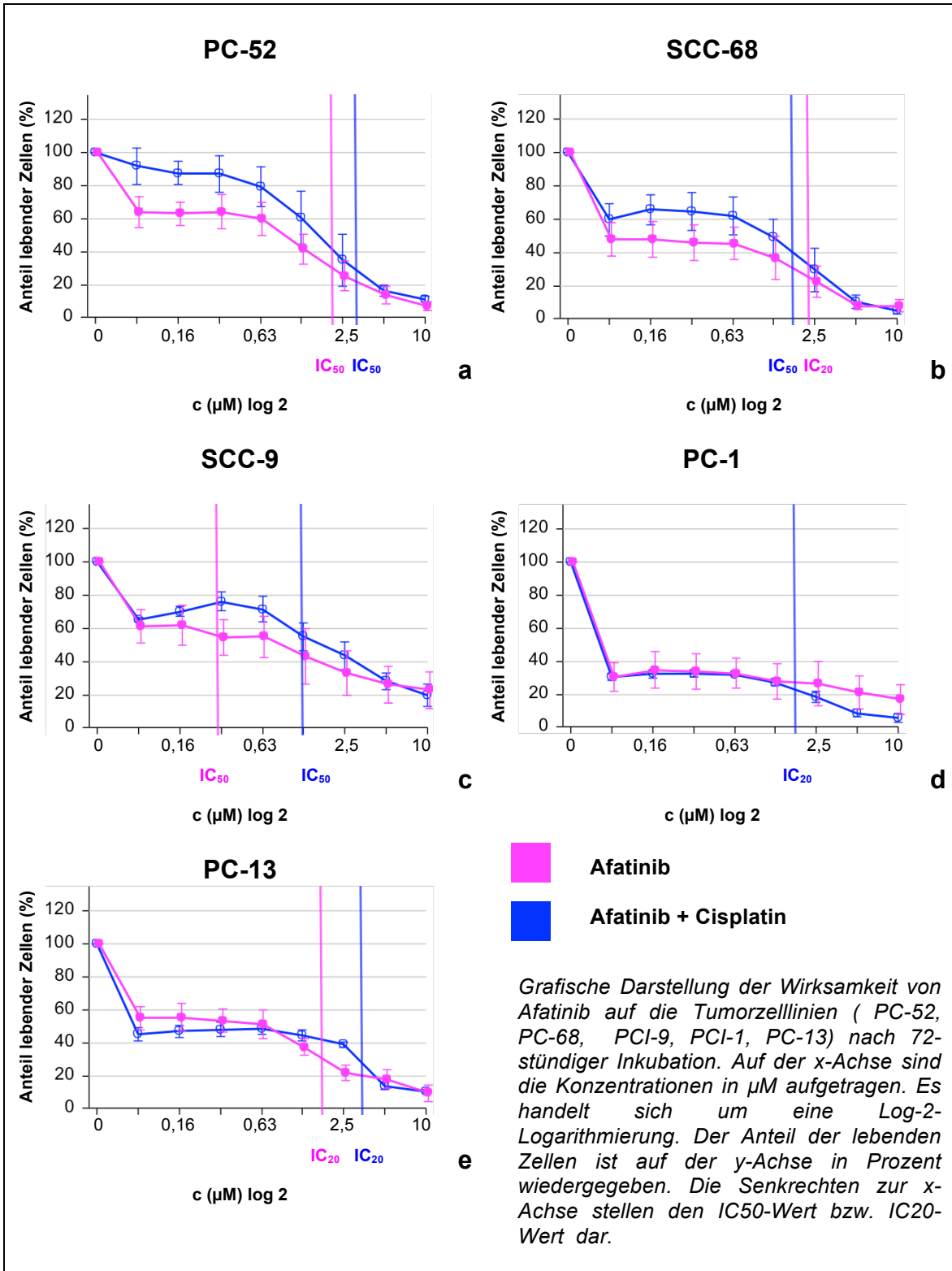


Abbildung 3 – Afatinib in Mono- und Kombinationstherapie

3.2.2 Nintedanib

Die Wirksamkeit von Nintedanib in Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin ist in Abbildung 4 dargestellt. Hierbei wurde für den TKI eine Log-2-Verdünnungsreihe in einem Bereich von 0,4 bis 100 μM verwendet. Die Inkubation der entsprechenden Tumorzelllinien zeigt im Überblick ein differenziertes und konzentrationsabhängiges Ansprechverhalten. Tabelle 7 zeigt die erhobenen IC_{50} - bzw. IC_{20} -Werte der Anwendungen im Überblick.

Monotherapie

Unter allen Zelllinien wird für SCC-68 die höchste Reduktion der Zellzahl auf $6,12 \pm 1,68 \%$ erreicht. Die zugehörige IC_{50} liegt bei $19,2 \mu\text{M}$. Eine ähnlich hohe Zytoreduktion ist für die Zelllinien PC-1 ($6,22 \pm 5,4 \%$) und PC-13 ($6,57 \pm 2,32 \%$) zu erkennen. Die entsprechenden zelllinienspezifischen IC_{50} -Werte liegen bei $2,5 \mu\text{M}$ respektive $23,4 \mu\text{M}$. Eine vergleichsweise weniger stark ausgeprägte maximale Zellzahlreduktion geht aus den Dosiswirkungskurven der Zelllinien PC-52 und SCC-9 hervor. Hier können Werte von bis zu $15,12 \pm 4,84 \%$ (PC-52) sowie $18,73 \pm 4,5 \%$ (SCC-9) erhoben werden. Für die Zelllinie PC-52 ergibt sich ein IC_{50} -Wert von $35,1 \mu\text{M}$. Die mittlere inhibitorische Konzentration für SCC-9 liegt bei $14,4 \mu\text{M}$. Bei vergleichender Betrachtung der IC_{50} -Werte, lässt sich der niedrigste Wert mit großem Abstand für die Zelllinie PC-1 identifizieren. Der höchste Wert der mittleren inhibitorischen Konzentration lag für Zellen der Linie PC-52 vor.

Kombinationstherapie

Bei dieser Anwendung wurde die höchste maximale Reduktion der Zellzahl mit relativen Werten von bis zu $3,2 \pm 1,39 \%$ ebenfalls für die Zelllinie SCC-68 ermittelt. Bei Betrachtung aller Anwendungen von Nintedanib in Kombinationstherapie können keine vergleichbaren zytoreduktiven Effekte beobachtet werden. Gleichzeitig imponiert bereits in niedrigen Dosisstufen eine Zytoreduktion auf unter 50% , sodass eine Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration nicht möglich war. Die IC_{20} liegt bei $9,1 \mu\text{M}$. Der zytoreduktive Effekt der Kombinationsanwendung auf die Zelllinien PC-1 ($13,04$

$\pm 15,66 \%$), SCC-9 ($13,39 \pm 11,28 \%$) sowie PC-13 ($13,86 \pm 3,41 \%$) stellt sich vergleichbar dar und ist als mittelgradig zu charakterisieren. Die niedrigste maximale Reduktion der Zellzahl findet sich hingegen für die Zelllinie PC-52 ($17 \pm 16,53 \%$) wieder. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse resultieren vergleichbare IC_{50} -Werte für die Zelllinien PC-13 und PC-1. Die Zelllinien SCC-9 und PC-52 zeigen mit $8,7 \mu\text{M}$ bzw. $7,9 \mu\text{M}$ höhere IC_{50} -Werte und damit ein etwas schwächeres Ansprechen auf die Wirkstoffkombination.

Vergleich der Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin

Bei Betrachtung aller Zelllinien fällt auf, dass partiell signifikante Unterschiede in der Zellzahlreduktion zwischen alleiniger Anwendung von Nintedanib und der Kombinationsanwendung zu erkennen sind. Für PC-52 (4a) wird im Verdünnungsbereich von $0,8$ bis $25 \mu\text{M}$ eine signifikant erhöhte Reduktion der Zellzahl für die Kombinationsanwendung deutlich ($p_t < 0,01$). Auch der Vergleich der mittleren inhibitorischen Konzentrationen unterstreicht diesen Unterschied. Hier wird eine Erniedrigung von $35,1 \mu\text{M}$ unter Monotherapie auf $7,9 \mu\text{M}$ für die Anwendung mit Cisplatin ersichtlich. Bei Betrachtung der Zelllinie SCC-68 ergibt sich derselbe Effekt in noch deutlicherer Ausprägung. Hier zeigt sich für die Kombinationstherapie eine signifikant erhöhte Zellzahlreduktion im gesamten Verdünnungsbereich ($p_t < 0,05$). Ein Vergleich der IC_{20} -Werte zeigt hier durch die kombinierte Anwendung eine Erniedrigung von $35, 37$ auf $9,1 \mu\text{M}$. Der Vergleich zwischen Mono- und Kombinationstherapie ergibt allerdings bei Betrachtung der Zelllinien SCC-9 sowie PC-1 keine signifikanten Unterschiede. Für PC-13 resultiert im niedrigen Dosisbereich ($0,4 - 3,2 \mu\text{M}$) kein Unterschied. Für den Verdünnungsbereich zwischen $3,2$ und $50 \mu\text{M}$ lässt sich dagegen eine signifikante Erhöhung der Zellzahlreduktion aufzeigen ($p_t < 0,05$). Für diese Zelllinie kann unter Verwendung der Kombinationstherapie außerdem eine Erniedrigung der IC_{50} von $23,4 \mu\text{M}$ auf $4,6 \mu\text{M}$ erreicht werden.

Tabelle 7 – IC₅₀ (µM) Nintedanib in Mono- und Kombinationstherapie

Wirkstoff	IC₅₀ (µM)				
	PC-52	SCC-68	SCC-9	PC-1	PC-13
Nintedanib	35,1	19,2 35,37*	14,4	2,5	23,4
Nintedanib + Cisplatin	7,9	9,1*	8,7	5,8	4,6

*Angabe des IC₂₀-Wertes

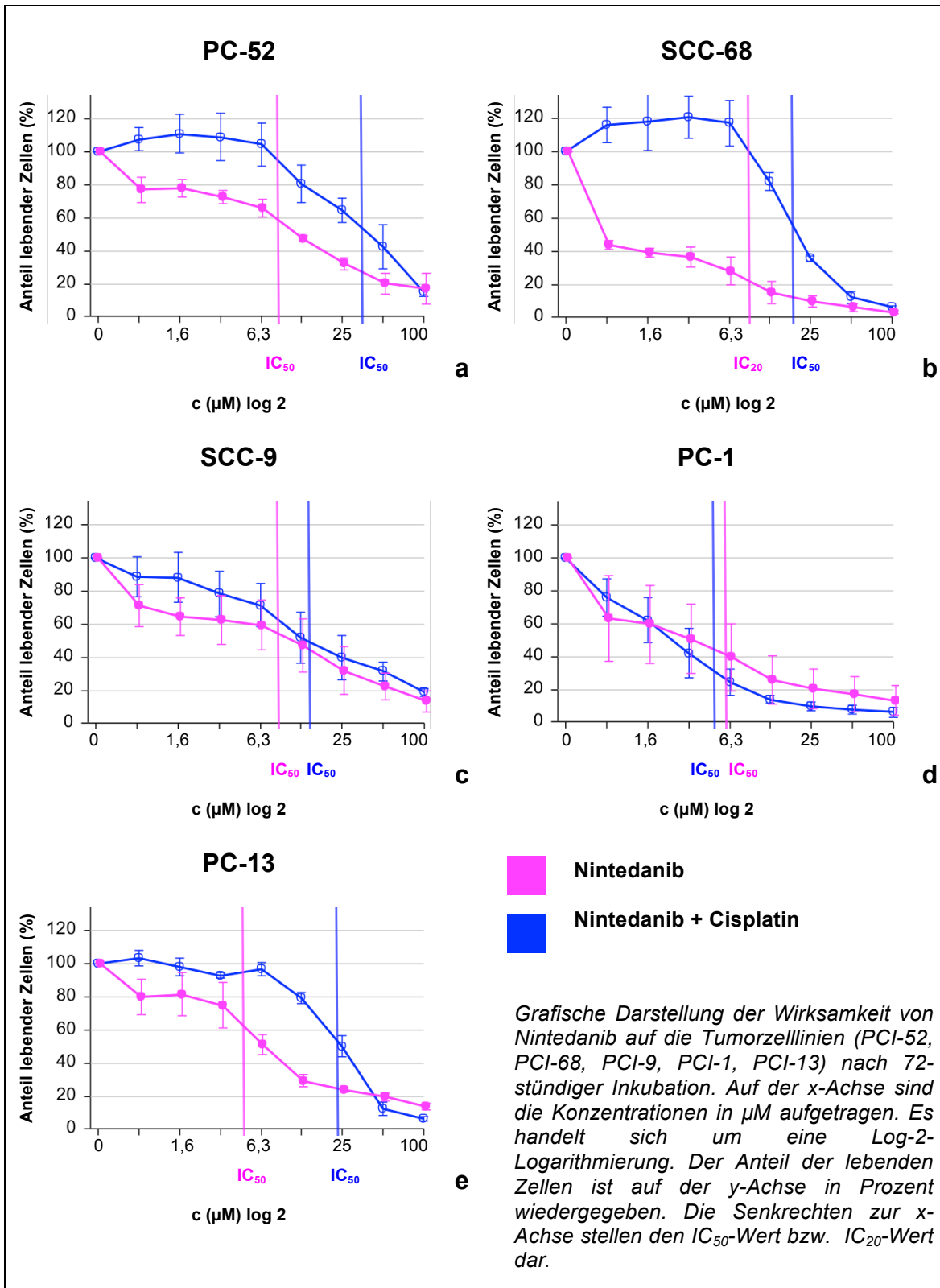


Abbildung 4 – Nintedanib in Mono- und Kombinationstherapie

3.2.3 Volasertib

Die Wirksamkeit von Volasertib in Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin ist in Abbildung 5 dargestellt. Hierbei wurden für den TKI Log-3-Verdünnungsreihen verwendet. Ein Verdünnungsbereich von 5 nM bis 10 µM kam bei der Stimulation der Zelllinien SCC-68, PC-1 und PC-13 zum Einsatz. Die Zelllinien PC-52 und SCC-9 wurden dagegen mit Wirkstoffkonzentrationen von 0,5 nM bis 1 µM versetzt. Alle Dosiswirkungskurven der Anwendungen in Mono- und Kombinationstherapie zeigen einen starken Abfall der Ausgangszellzahl bereits im niedrigen Dosisbereich. Aus diesem Grund wurden für alle Zelllinien ausschließlich IC₂₀-Werte bestimmt und miteinander verglichen. Tabelle 8 zeigt die erhobenen IC₂₀-Werte aller Anwendungen im Überblick.

Monotherapie

Die stärkste Reduktion der Zellzahl ist unter Verwendung von Volasertib für die Zelllinie SCC-9 wiederzufinden. Hierbei kommt es zu einer Zellzahlerniedrigung bis auf $0,16 \pm 5,54$ % des Ausgangswertes. Die maximalen zytoreduktiven Effekte für die Zelllinien SCC-68 und PC-1 sind mit relativen Werten von $6,46 \pm 0,6$ % beziehungsweise $6,89 \pm 3,07$ % ähnlich ausgeprägt. Am geringsten ausgeprägt war die maximale Zellzahlreduktion für die Zelllinien PC-52 ($11,69 \pm 7,44$ %) und PC-13 ($10,96 \pm 1,38$ %). Der niedrigste IC₂₀-Wert ergibt sich mit 7 nM für die Tumorzelllinie PC-13. Auf dem zweiten Rang befindet sich mit einem IC₂₀-Wert von 12 nM die Zelllinie PC-52. Geringgradig höhere IC₂₀-Werte konnten für SCC-68 (15 nM) und PC-1 (17 nM) ermittelt werden. Insgesamt sind hierbei also nur marginale Effektunterschiede zu erkennen.

Kombinationstherapie

Der am stärksten ausgeprägte maximale zytoreduktive Effekt dieser Intervention kann mit Zellzahlen von bis zu $10,09 \pm 12,64$ % für die Zelllinie SCC-9 nachgewiesen werden. Eine ähnlich geringe Zellzahl von $11,38 \pm 4,84$ % des Ausgangswertes ergibt sich für PC-1 unter Verwendung der höchsten Wirkstoffkonzentration. Der maximale zytoreduktive Effekte für die Zelllinien

SCC-68 ($16,21 \pm 2,16$ %) und PC-52 ($17,63 \pm 8,39$ %) liegt im Vergleich aller Zelllinien im mittleren Bereich. Mit $20,2 \pm 3,52$ % der Ausgangszellzahl, lässt sich der am schwächsten ausgeprägte maximale zytoreduktive Effekt der Zelllinie PC-13 zuschreiben. Mit $0,07 \mu\text{M}$ ist der IC_{20} -Wert der Zelllinie PC-1 unter allen Zelllinien am niedrigsten. Auf Rang 2 und 3 befinden sich die Zellreihen SCC-68 ($0,09 \mu\text{M}$) und PC-13 ($0,11 \mu\text{M}$). Für SCC-9 wird mit $2,8 \mu\text{M}$ der nächsthöhere IC_{20} -Wert ermittelt. Der höchste IC_{20} -Wert resultiert mit $3,3 \mu\text{M}$ für die Anwendung von Volasertib auf PC-52-Zellen. Es bestehen somit nur marginale Effektunterschiede zwischen den Zelllinien PC-1, SCC-68 und PC-13. Das Ansprechverhalten gegenüber Zellen der Linie SCC-9 und PC-52 ist dagegen für die Kombinationsanwendung etwas schwächer ausgeprägt.

Vergleich der Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin

Bei der statistischen Analyse der Unterschiede zwischen einer Volasertib-Anwendung mit und ohne Cisplatin sind partiell Signifikanzen feststellbar. Bei Betrachtung der Grafik für PC-52 (5a) fällt eine durch die kombinierte Anwendung deutlich verringerte Zytoreduktion auf. Diese tritt beinahe über dem gesamten Verdünnungsbereich auf und ist im Dosisbereich zwischen $0,37$ und $1,1 \mu\text{M}$ als signifikant anzusehen ($p_t < 0,05$). Daraus resultiert ebenfalls ein für die Monotherapie deutlich verringerter IC_{20} -Wert von $0,012 \mu\text{M}$ gegenüber $3,3 \mu\text{M}$ für die Kombinationstherapie. Auch für die Zelllinie SCC-68 findet sich ein erniedrigter zellreduzierender Effekt durch die Kombinationsanwendung wieder. Hauptsächlich im höheren Dosisbereich ($0,037$ bis $1 \mu\text{M}$) ist dieser signifikant zugunsten der Monotherapie erhöht ($p_t < 0,05$). In diesem Fall kommt es durch die Monotherapie zu einer Erniedrigung des IC_{20} -Wertes von $0,09 \mu\text{M}$ auf $0,015 \mu\text{M}$. In Abbildung 5c (SCC-9) erkennt man den obengenannten Effektunterschied in stärkster Ausprägung. Über einen Dosisbereich von $0,2 \text{ nM}$ bis $1,1 \mu\text{M}$ ist die Monotherapie hierbei der Kombinationstherapie signifikant überlegen ($p_t < 0,05$). Angesichts der Grafiken für PC-1 (5d) und PC-13 (5e) fällt ein Unterschied der Dosiswirkungskurven im höheren Verdünnungsbereich auf. Im Einzelnen zeigt die Monotherapie im Konzentrationsbereich von $0,037 \mu\text{M}$ bis $0,33 \mu\text{M}$ für PC-1-Zellen eine signifikant höhere Zellreduktion als die

Kombinationsanwendung ($p_t < 0,05$). Dieser Unterschied geht einher mit einem durch die Monotherapie von 0,07 auf 0,017 verringerten IC_{20} -Wert. Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich zuletzt auch für die Zellen der Linie PC-13. Unter Monotherapie wird eine deutlich verstärkte Zytoreduktion im höheren Verdünnungsbereich erfasst, die zwischen 0,012 μM und 1 μM als signifikant angesehen werden kann ($p_u < 0,05$). Der korrespondierende IC_{20} -Wert der Monotherapie unterliegt dabei dem der Kombinationstherapie (0,007 μM zu 0,11 μM).

Tabelle 8 – IC_{20} Volasertib in Mono- und Kombinationstherapie

Wirkstoff	IC_{20} (μM)				
	PC-52	SCC-68	SCC-9	PC-1	PC-13
Volasertib	0,012	0,015	**	0,017	0,007
Volasertib + Cisplatin	3,3	0,09	2,8	0,07	0,11

** IC -Wert nicht bestimmbar

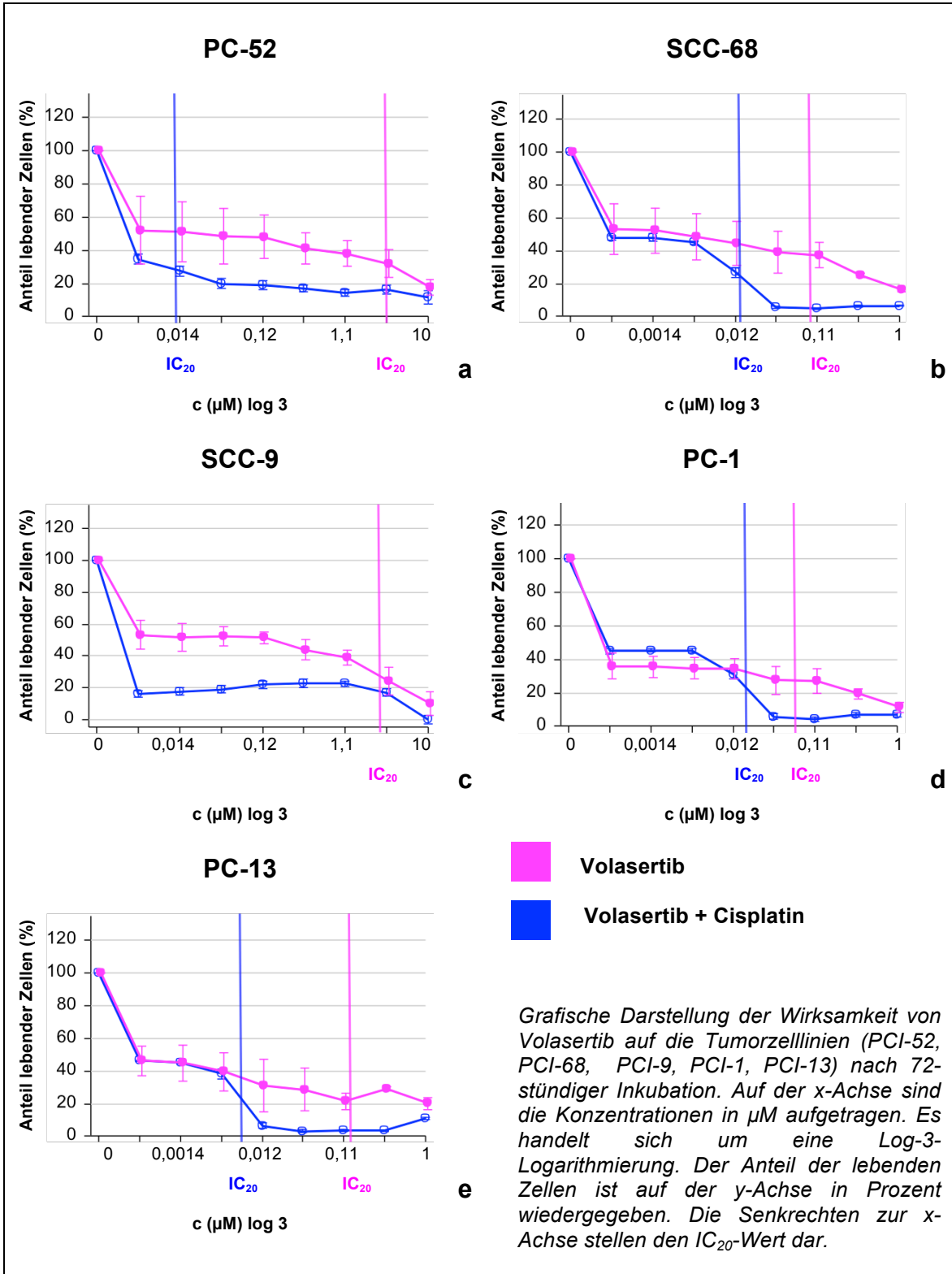


Abbildung 5 – Volasertib in Mono- und Kombinationstherapie

3.3 TKI-Monotherapie und Kombinationstherapie mit LCL-161

Bei dieser Anwendung wurden die fünf Zelllinien mit dem SMAC-Analogon LCL-161 und den jeweiligen TKI in Monotherapie versetzt. Auch die Kombinationsanwendung beider Wirkstoffe in jeweiliger halbmaximaler inhibitorischer Konzentration kam zum Einsatz. Eine Analyse der Effektunterschiede zwischen alleiniger Anwendung der TKI und einer Kombinationstherapie mit dem SMAC-Analogon wurde dabei vorgenommen. Für die statistische Analyse kam der T-Test zum Einsatz. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen *in vitro*. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind in Tabelle 9 dargestellt.

3.3.1 Afatinib

Bei Betrachtung der Abbildung 6a lässt sich ein deutlicher Rückgang der Zellzahl durch die Kombinationsanwendung aus TKI und LCL-161 lediglich für die Zelllinie PC-52 erkennen. Hier konnte die mittlere Zellzahl von $71,96 \pm 10,41$ % auf $59,30 \pm 8,26$ % des Anfangswertes signifikant reduziert werden ($p_t < 0,05$). Die Zelllinien SCC-68, SCC-9, PC-1 sowie PC-13 zeigen hingegen nur unwesentliche Veränderungen der mittleren Zellzahl unter kombinierter Anwendung von Afatinib und dem SMAC-Analogon.

3.3.2 Nintedanib

Bei dieser Anwendung kann eine signifikante Verstärkung der mittleren Zellreduktion durch die Kombination des Wirkstoffs mit dem SMAC-Analogon in alle Zelllinien festgestellt werden (Abbildung 6b). Für PC-52 kann dabei durch die Zugabe von LCL-161 die größte Effektsteigerung ermittelt werden ($63,15 \pm 9,95$ % zu $44,6 \pm 7,64$ %; $p_t < 0,01$). Dieselbe Kombinationstherapie kann für die Zelllinie PC-13 eine vergleichbare Verstärkung der mittleren Zellreduktion von $29,83 \pm 2,91$ % bis auf $12,07 \pm 0,75$ % der Anfangszellzahl hervorrufen ($p_t < 0,001$). Für die Tumorzelllinie SCC-68 kann eine Verringerung der mittleren Zytoreduktion um nahezu 10 % nachgewiesen werden ($23,817 \pm 3,06$ % zu $13,84 \pm 1,99$ %; $p_t < 0,01$). Ähnlich ausgeprägt zeigen sich die

Effektsteigerungen für die Zelllinien SCC-9 ($35,86 \pm 7,71$ % zu $22,37 \pm 3,86$ %; $p_t < 0,05$) und PC-1 ($20,81 \pm 1,73$ % zu $13,21 \pm 2,08$ %; $p_t < 0,05$).

3.3.3 Volasertib

Die Ergebnisse dieser Anwendung sind in Abbildung 6c dargestellt und zeigen für die Zelllinien PC-52 und PC-13 eine signifikante Effektverstärkung durch die Kombinationsanwendung. Für PC-52 lässt sich gegenüber der alleinigen Stimulation mit Volasertib eine durch die Kombination mit dem SMAC-Analogen um ca. 10 % verringerte mittlere Zellzahl ($32,49 \pm 5,83$ % zu $22,56 \pm 5,24$ %; $p_t < 0,05$) wiederfinden. Auch Zellen der Linie PC-13 zeigen einen solchen Effekt. Hierbei kommt es unter Kombinationstherapie zu einer Verringerung der mittleren Zellzahl von $26,42 \pm 1,79$ % auf $18,19 \pm 3,16$ % ($p_t < 0,05$). Für alle anderen Zelllinien sind keine wesentlichen Effektveränderungen durch eine Kombinationsanwendung mit LCL-161 zu beobachten.

Tabelle 9 – Vergleich der Anwendungen TKI und TKI + LCL-161

Wirkstoff	P _t -Wert				
	PC-52	SCC-68	SCC-9	PC-13	PC-1
Afatinib	0,033*	0,24	0,36	0,36	0,16
Nintedanib	0,0075**	0,0041**	0,026*	0,037*	0,0072**
Volasertib	0,017*	0,44	0,26	0,69	0,045*

T-test mit * $p_t < 0,05$; ** $p_t < 0,01$; *** $p_t < 0,0001$

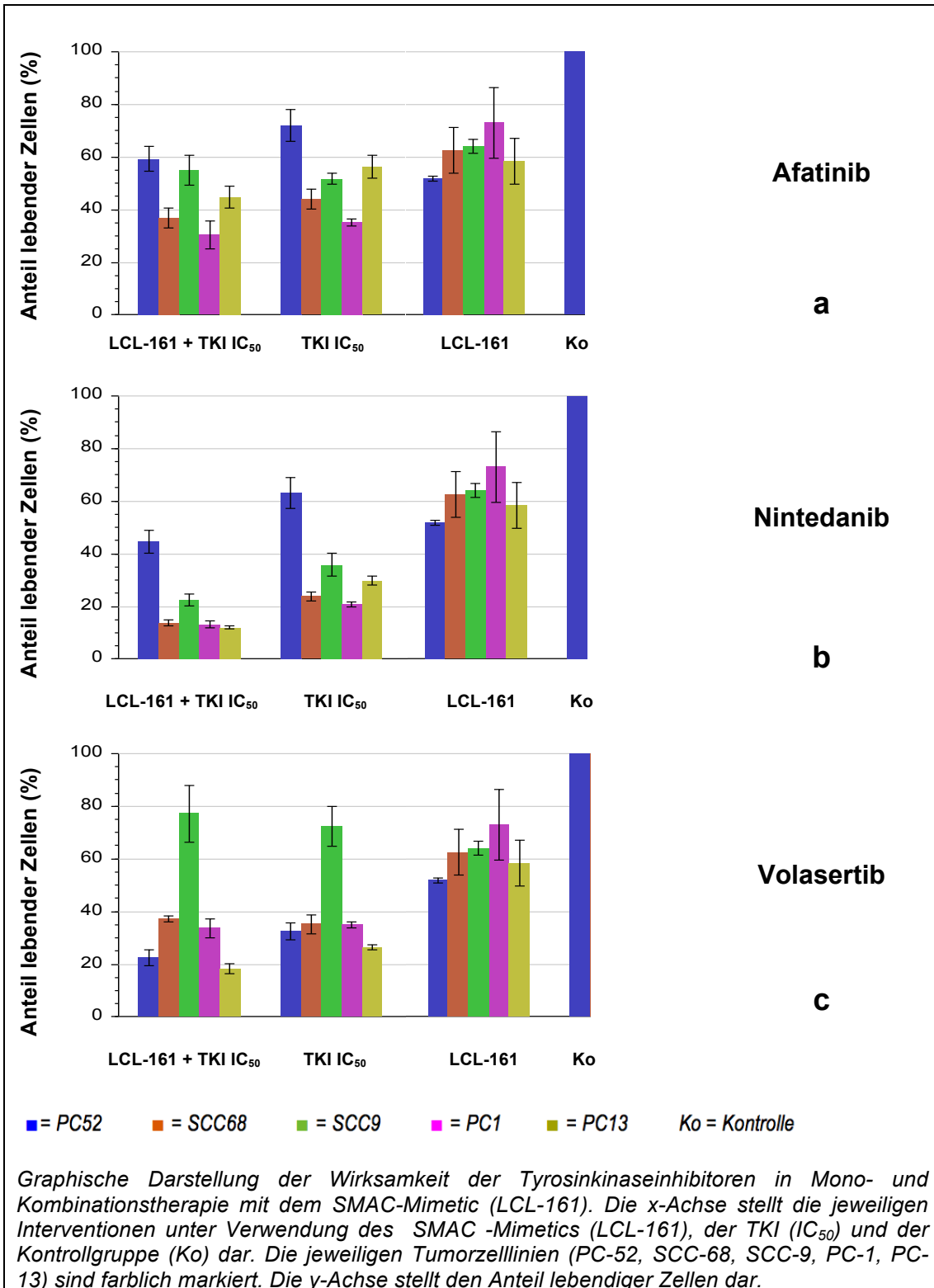


Abbildung 6 - Anwendungen TKI und Smac-Analogon LCL-161

4. Diskussion

Neben einer weltweiten Inzidenz von 600.000 Fällen pro Jahr macht ein kontinuierlicher Anstieg der Erkrankungshäufigkeit das HNSCC zur sechsthäufigsten malignen Tumorerkrankung weltweit [1]. Während frühe Tumorstadien I und II mit einer günstigen Prognose einhergehen, ist die Prognose der fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV mit einer 5-JÜR von 43,9 % deutlich reduziert. Neben der Frühdiagnostik ist besonders für fortgeschrittene Tumorstadien eine interdisziplinär und multimodal durchgeführte Therapie das Prozedere der Wahl. Neben der operativen Resektion im Gesunden und einer Bestrahlung ist hierbei die Chemotherapie essenziell. Jedoch sorgen ein hohes Maß an Toxizität, eine hohe Diversität der Tumoren sowie enge Indikationsbereiche herkömmlicher Zytostatika für die dringende Notwendigkeit neuer rationaler Ansätze in der medikamentösen Therapie des HNSCC [85]. In der letzten Dekade haben sich zielgerichtete medikamentöse Therapieansätze unter Verwendung sogenannter „targeted agents“ entwickelt.

Der monoklonale Antikörper und EGF-Rezeptorblocker Cetuximab konnte im April 2006 in Europa für die Therapie des rekurrenten oder rezidivierenden HNSCC zugelassen werden. Für die klinische Anwendung kann der Wirkstoff laut aktuellem Leitlinienprogramm zur adjuvanten Radiochemotherapie Cisplatin-refraktärer Tumore verwendet werden. Im Jahr 2017 kam es zudem zur Zulassung der monoklonalen Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab für die Zweitlinientherapie des HNSCC. In vorausgehenden klinischen Studien seit dem Jahr 2014 konnte unter diesen Wirkstoffen für das rezidivierende bzw. metastasierte, platinrefraktäre HNSCC ein verlängertes Gesamtüberleben verglichen mit Cetuximab, Docetaxel und MTX nachgewiesen werden [86-89]. Während sich monoklonale Antikörper somit bereits etablieren konnten, fehlen bislang Zulassungen von TKI in der Antitumorthherapie des HNSCC.

Afatinib

Der Signalweg des EGFR mündet in einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit der folgenden Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose sowie weiterer zellulärer Prozesse wie Angiogenese, Migration und Zelladhäsion. Fehlfunktionen oder gestörte Aktivitäten dieses Signalwegs begünstigen eine maligne Entartung gesunder Zellen. Für das HNSCC können eine starke Entdifferenzierung, eine Korrelation mit einer erhöhten Bestrahlungsresistenz, ein erhöhtes Metastasierungsrisiko und eine schlechtere lokale Tumorkontrolle mit einem erhöhten ErbB1-Expressionslevel assoziiert sein [34, 35]. Besonders der Nachweis einer Überexpression dieses Rezeptors in mehr als 90 % der HNSCC und eine damit einhergehende Verringerung der 5-JÜR charakterisiert den EGFR-Pathway als einen zentralen Angriffspunkt der medikamentösen Antitumorthherapie des HNSCC [33]. Selektiv-reversible ErbB-Inhibitoren wie Gefitinib und Erlotinib konnten in experimenteller und klinischer Anwendung zwar bislang eindeutige therapeutische Effekte erzielen, jedoch stellen Resistenzmechanismen, die Aktivierung alternativer Signalwege (sogenannter "Signalswitches") oder eine Heterodimerisierung innerhalb des EGFR-Signalwegs weiterhin eine erhebliche Therapieeinschränkung dar [36]. Bereits Young et al. konnten in einer experimentellen Studie an Tumorzelllinien des HNSCC die Hypothese, dass Afatinib als unselektiver, sogenannter EGFR-Pan-Inhibitor selektiven EGFR-Inhibitoren überlegen sei, untermauern [90].

In der vorliegenden Studie durchgeführte Expressionsanalysen konnten für alle Zelllinien eine starke Expression des EGFR nachweisen, wobei sich der Expressionsgrad für SCC-68 am größten darstellte. Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass sich alle Zelllinien für die Anwendung von Afatinib in Mono- und Kombinationstherapie mit Cisplatin als sensibel erwiesen. Auch könnten diese Ergebnisse begründen, weshalb für SCC-68 in Monotherapie die höchste und in Kombinationstherapie die zweitgrößte maximale Zytoreduktion nachzuweisen war.

Unter den Zelllinien mit bestimmbarer mittlerer inhibitorischer Konzentration ergibt sich kein wesentlicher Unterschied im Ansprechverhalten auf die Monotherapie. Es zeigen sich für SCC-9 mit einer IC_{50} von 1,2 μ M und für SCC-

68 mit einer korrespondierende IC_{50} von 1,7 μM ähnliche Effekte. Gegenüber der Zelllinie PC-52 ergibt sich für Afatinib in Monotherapie mit einer IC_{50} von 3,3 μM zwar ein etwas geringerer zytoreduktiver Wirkungseffekt, jedoch ist auch dieser Wert mit den übrigen Ergebnissen vergleichbar. Weiterhin wird dieses Ergebnis bei Betrachtung der IC_{20} -Werte, welche in einem Bereich von 2,0 bis 5,47 μM nur wenig differieren, verdeutlicht.

Vorausgehende Untersuchungen der Studiengruppe an denselben Zelllinien konnten für Erlotinib in Monotherapie vergleichsweise nur eine geringere Ansprechrate erfassen. Lediglich IC_{50} -Werte von 76,1 μM für SCC-9 respektive 30,13 μM für SCC-68 und 36,54 μM für PC-52 konnten hierbei nachgewiesen werden. Speziell für diese Zelllinien konnte auch bei der Anwendung Gefitinib in vorausgehenden Untersuchungen der Studiengruppe nur ein vergleichsweise niedriges Ansprechverhalten identifiziert werden [84, 91]. Hiermit scheint Afatinib als unselektiver EGFR-Inhibitor den übrigen selektiven Vertretern seiner Wirkstoffgruppe in der zytoreduktiven Wirkung überlegen zu sein.

Diese Beobachtung decken sich mit den Ergebnissen einer Untersuchung von Young, Soneru [90], welche ein verstärktes Ansprechen von Afatinib an EGFR-überexprimierenden, gegen Gefitinib resistenten Zellen des HNSCC nachwies.

Trotz vieler in der Vergangenheit publizierter Studien zur antitumoralen Wirksamkeit von Cetuximab, welche zur Zulassung des Wirkstoffs für das HNSCC führten, bleibt der genaue Mechanismus zur Entstehung etwaiger Resistenzentwicklungen unklar. Nach Wheeler et al. [36] spielt hierbei die Überexpression des ErbB2 und ErbB3 eine zentrale Rolle. Untersuchungen von Hartmann, Seher [91] zeigten unter Anwendung von Cetuximab an den vorliegenden Zelllinien lediglich einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt für PC-1, während es unter den restlichen Zelllinien entweder nur zu einer sehr schwachen Inhibition oder gar zu einem Anstieg in der Zellviabilität kam. Im Vergleich der IC_{50} - / IC_{20} -Werte miteinander scheint bei allen anderen Zelllinien für Afatinib ein stärkerer Wirkungseffekt vorzuliegen als für die Anwendung von Cetuximab. Dies steht den Ergebnissen einer RMC-Studie der Phase III von Seiwert et al. [38] zur Second-line-Therapie des HNSCC gegenüber, bei der

kein höherer Wirkeffekt für Afatinib gegenüber Cetuximab festgestellt werden konnte. Allerdings ergab sich ein konstanter Benefit, gemessen an der klinisch-radiologischen Tumorprogression, für eine Therapieumstellung von Afatinib auf Cetuximab und umgekehrt. Dieser Effekt wird als "Lack-of-cross-resistance" beschrieben und ist durch entsprechende sekundäre Resistenzbildung der Zellen gegen die angewendeten Wirkstoffe, beispielsweise durch Aktivierung alternativer Signalwege, zu erklären. Dieser Zusammenhang eröffnet ein großes Potenzial zur individualisierten adjuvanten Therapie des HNSCC, welche jedoch durch bislang fehlende valide Methoden zur prädiktiven Bestimmung von Tumormarkern begrenzt ist.

Ähnlich wie das Studienmodell "LUX-Lung", welches maßgeblich zur Zulassung von Afatinib für das EGFR-mutierte NSCLC führte, wurde mit der weltweiten randomisierten Multicenter-Studie "Lux-Head-and-Neck" vor einigen Jahren ein Studienprogramm zur Anwendung von Afatinib in der Second-line-Therapie des platinrefraktären und metastasierten HNSCC publiziert. In der ersten Veröffentlichung "Lux-Head-and-Neck 1" wurde hierbei ein nur geringfügiger Benefit von Afatinib in Bezug auf die lokale Tumorkontrolle und das PFÜ gegenüber der Anwendung von MTX beschrieben. Weiterführende Untersuchungen dieses Studienprogramms ("Lux-Head-and-Neck 2-4") befanden sich zu dieser Zeit in der Phase der Patientenrekrutierung, wurden jedoch im Jahr 2016 aufgrund wenig erfolgversprechender Präanalysen vorzeitig beendet.

Gegenüber der Monotherapie mit Cisplatin zeigte sich für die alleinige Anwendung von Afatinib an den Zelllinien SCC-68 und SCC-9 eine deutliche Erhöhung der Ansprechrate gemessen an der IC_{50} . Während die mittlere inhibitorische Konzentration für Cisplatin hier jeweils 14 μ M beträgt, findet sich unter Verwendung von Afatinib eine etwa um das zehnfach verstärkte Wirkung (IC_{50} von 1,7 μ M respektive 1,2 μ M) wieder. Dies scheint für Afatinib einen stärkeren zytoreduktiven Effekt gegenüber Cisplatin zu verdeutlichen. Bei Betrachtung der Zelllinie PC-52 tritt ebenfalls eine Erniedrigung der IC_{50} zugunsten der Monotherapie mit Afatinib auf (5 μ M gegenüber 3,3 μ M), welche jedoch vergleichsweise geringer ausfällt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Cisplatin-Monotherapie mit denen einer Kombinationstherapie aus Cisplatin und Afatinib, ist ein erwarteter synergistischer Effekt für zwei von fünf Zelllinien zu betrachten. Für PC-52 und SCC-9 sorgte der Zusatz des Tyrosinkinaseinhibitors für eine deutliche Erniedrigung der IC_{50} . Dieser Effekt zeigt sich zwar nicht für die Mehrzahl der Zelllinien und ist für PC-52 eher gering ausgeprägt, könnte jedoch für die Hypothesen von Wang et al. [92] sprechen. Diese untersuchten die Wirkung von Afatinib an extrahierten Zellen des nasopharyngealen Karzinoms, welche eine Überexpression des „ATP-binding-cassette-transporters G2“ (ABC-G2) aufwiesen. Dieser Transporter stellt eine Effluxpumpe für Chemotherapeutika dar und kann somit für Multidrugresistenzen verantwortlich sein [93]. Wang et al. postulierten, dass Afatinib zusätzlich zu seiner ErbB-Inhibition eine Methyltransferaseaktivität aufweise, welche zu einer Erniedrigung der ABCG2-Expression führe und die Zellen gegen herkömmliche Chemotherapeutika sensibilisiere. In der Tat zeigen die Untersuchungen von Wang et al. einen Benefit durch eine Kombinationstherapie herkömmlicher Chemotherapeutika mit Afatinib. Dieser Mechanismus könnte für den oben genannten Effekt verantwortlich sein. Hier könnten ergänzende Analysen des ABCG2-Expressionslevels der verwendeten Zelllinien zu weiteren Klärung von Nutzen sein.

Der Vergleich einer alleinigen Anwendung von Afatinib gegenüber der Kombinationstherapie aus Afatinib und Cisplatin lässt in der Zusammenschau der Ergebnisse für alle Zelllinien keine signifikanten synergistischen Effekte bei Cisplatin-Zusatz erkennen. Neben nur vereinzelt Erniedrigungen der relativen Zellzahl in gewissen Dosisbereichen, sorgte eine Kombinationstherapie hier zu Teilen sogar für einen antagonistischen Effekt.

Nintedanib

Eine zentrale Voraussetzung für die Karzinogenese, Progression und Metastasierung von Tumoren stellt ihre Wechselwirkung mit dem umliegenden Gewebe dar. Das als "Tumormicroenvironment" (TME) bezeichnete Mikromilieu ist dabei durch eine stetige Interaktion zwischen Tumorzellen und ihrer Umgebung gekennzeichnet. Hierbei sorgt die fortschreitende, unkontrollierte Proliferation des Primärtumors für eine gestörte Mikrozirkulation mit der Folge von Diffusionsstörungen und einer Gewebshypoxie, was zur Ausschüttung proangiogener Faktoren wie FGF, PDGF oder VEGF führen kann [52]. Im Falle einer Alteration dieser Wachstumsfaktoren oder ihrer entsprechenden Rezeptoren, können vermehrte Proliferation, Invasion, Neoangiogenese, Metastasierung sowie Apoptosehemmung die Folge sein und somit die Karzinogenese vorantreiben.

Ergebnisse von Schultze, Hector et al. im experimentellen Setting konnten bereits eine Korrelation zwischen der FGF-Ausprägung und der Proliferationsrate von oralen Plattenepithelkarzinomen in Menschen und Mäusen nachweisen [55]. Weiterhin konnte in Untersuchungen von Hase, Tanaka et al. eine Korrelation zwischen einer FGF-Überexpression und einer Lymphknotenmetastasierung aufgezeigt werden [94]. Für den entsprechenden FGF-Rezeptor wurde zudem bereits in verschiedenen Studien eine Überexpression in Zellen des HNSCC beschrieben [54, 95]. Diese wird in der Literatur, bei einer Range von 12 - 100 % der physiologischen Ausprägung, als heterogen charakterisiert [94-97]. Die vorliegende Expressionsanalyse des FGFR spiegelt dies wieder, da in allen Zelllinien eine mittlere bis sehr starke Expression aller Subtypen des FGFR nachzuweisen war.

In der Literatur werden jedoch die Subtypen FGFR-2 und FGFR-3 hervorgehoben. So kam es zum Beispiel in einer Studie von Henson et al. durch selektive Hemmung des FGFR-3 für das HNSCC zu einer Senkung der Zellzahl um 35 %. [53]. Darüber hinaus konnten Untersuchungen am Tiermodell von Vairaktaris, Ragos [95] einen maßgeblichen Einfluss des Rezeptorsubtyps FGFR-2 in der Entstehung maligner oraler Plattenepithelkarzinomen aufzeigen. Interessanterweise deckt sich diese Aussage mit den vorliegenden Ergebnissen

der Zytoreduktion und mittleren inhibitorischen Konzentration der Monotherapie. So weisen die Zelllinien PC-1 und SCC-9 mit 2,5 μM respektive 14,4 μM die niedrigsten IC_{50} im Vergleich der Zelllinien untereinander auf. Auffällig ist hier, dass PC-1 und PC-9 die einzigen Zelllinien sind, welche FGFR-2 sehr stark exprimierten. Dies lässt den Schluss zu, dass das Ansprechverhalten von Nintedanib in hohem Maße von diesem Rezeptorsubtyp abhängt. Obwohl für die Zelllinie PC-52 eine vergleichbar starke Expression des FGFR-1 nachgewiesen werden konnte, ergibt sich hier die höchste mittlere inhibitorische Konzentration (35,1 μM) und damit die geringste Wirkstärke von Nintedanib. Entgegen der Ergebnisse zum FGFR-2 könnte der FGFR-1 daher eine untergeordnete Rolle im Ansprechverhalten der Zellen auf den Wirkstoff spielen.

Auch für den VEGFR konnten Margarietescu et al. in Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms eine Überexpression von 89 % nachweisen [56]. In einer weiteren Studie von Neuchrist et al. wurde darüber hinaus der Subtyp VEGFR-2 in Zellen des HNSCC zu 90 % überexprimiert und als vorherrschender Rezeptortyp in Bezug auf die Tumorangio-genese und Zellproliferation beschrieben [98].

Der vorliegende Expressionsnachweis des VEGFR zeigt eine hohe Diversität unter allen untersuchten Zelllinien auf. Mit Ausnahme der Zelllinie SCC68, welche eine schwache Expression aufweist, lag der Subtyp VEGFR-2 für alle weiteren Zelllinien unter der Nachweisgrenze. Die Subtypen VEGFR-1 und VEGFR-3 hingegen waren in allen Zelllinien stark bis mittelstark nachweisbar. Diese Ergebnisse können den VEGFR-2 somit nicht als vorherrschenden Rezeptorsubtyp charakterisieren.

Für alle untersuchten Zelllinien ergibt sich, im Gegensatz zum FGFR und VEGFR, lediglich eine als mittelstark bis schwach zu charakterisierende Expression beider Subtypen des PDGFR.

Untersuchungen von Bran et al. hingegen wiesen in Zelllinien des HNSCC eine signifikant erhöhte Expression des PDGFR nach und beschrieben eine aus selektiver PDGFR-Inhibition resultierende Erniedrigung der VEGF-

Expressionslevel [58]. Hieraus resultierte die Annahme eines möglichen Synergismus beider Rezeptortypen.

Untersuchungen der Studiengruppe zur Wirksamkeit von Dovitinib, einem Tyrosinkinaseinhibitor gegen den VEGFR und FGFR, lieferten für vier von fünf Zelllinien (SCC-9, PC-13, PC-68 und PC-52) geringere IC_{50} -Werte, was eine Überlegenheit des Wirkstoffs gegenüber Nintedanib vermuten lässt. Im Hinblick darauf, dass Dovitinib den PDGFR nicht vorrangig zu inhibieren vermag, scheint es jedoch keine Verstärkung des antitumoralen Effekts durch zusätzliche PDGFR-Inhibition zu geben. Lediglich in PC-1-Zellen konnte Nintedanib im Vergleich zu Dovitinib eine niedrigere IC_{50} (2,5 μ M respektive 14,77 μ M) erzielen. In Bezug auf die Selektivität der Rezeptorinhibition resultiert aus diesen Daten jedoch kein klarer Vorteil für eine Therapie mit Nintedanib. Ebenso lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht direkt auf einen Synergismus zwischen dem VEGFR und dem PDGFR schließen.

Vergleicht man die Ergebnisse aus alleiniger Anwendung von Nintedanib mit denen der Cisplatin-Monotherapie, erscheint letztere, gemessen an der IC_{50} , für drei von fünf Zelllinien (PC-52, SCC-68 und PC-13) deutlich überlegen zu sein. Dies könnte auf eine sekundäre Resistenzbildung oder eine Aktivierung alternativer Signalwege (z. B. EGFR) besagter Zelllinien hindeuten. Lediglich für die Zellen der Linie PC-1 lässt sich ein deutlicher Vorteil der Zytoreduktion unter Anwendung von Nintedanib (2,5 μ M respektive 14 μ M) erkennen. Für die Zelllinie SCC-9 zeigen sich vergleichbare IC_{50} -Werte zwischen Nintedanib und Cisplatin in Monotherapie, sodass hier von einer ähnlichen zytoreduktiven Wirkstärke ausgegangen werden kann.

Die aktuelle Studienlage liefert für das HNSCC bislang nur wenige Ergebnisse zur Wirksamkeit von Nintedanib in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika im experimentellen oder klinischen Setting. Während es keine Daten zur Kombinationstherapie mit platinbasierten Zytostatika gibt, untersuchte die sog. LUME-Studie (RMC) die Wirksamkeit von Nintedanib in Kombination mit Docetaxel gegenüber einer alleinigen Therapie mit Docetaxel [59]. Hierbei zeigte die Kombinationstherapie ein erhöhtes PFÜ und GÜ.

Vorliegende Untersuchungen zeigen, gegenüber der alleinigen Anwendung von Cisplatin, bei der Kombinationstherapie aus Nintedanib und Cisplatin für die Zelllinien PC-1 und SCC-9 eine beträchtlich erniedrigte IC_{50} (jeweils 14 μ M gegenüber 5,8 μ M respektive 8,7 μ M). Hier kann von einem additiven Wirkungseffekt durch den Zusatz von Nintedanib ausgegangen werden. Besonders fällt dabei auf, dass diese Zellen eine sehr starke FGFR-2-Expression aufweisen. In den restlichen Zelllinien (PC-52 und PC-13) sorgte ein Zusatz von Nintedanib hingegen sogar für eine Erhöhung der mittleren inhibitorischen Konzentration, womit für diese Zellen von einem antagonistischen Effekt ausgegangen werden kann. Eine inhibierende Interaktion ist hierbei jedoch unwahrscheinlich, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu einem synergistischen Effekt für die Zelllinien PC-1 und SCC-9 führen würde.

Bei Betrachtung aller Zelllinien ergeben sich diverse relevante Unterschiede zwischen einer Nintedanib-Monotherapie und der Kombinationstherapie aus Nintedanib und Cisplatin. Eine signifikante Erhöhung des zytoreduktiven Effektes ergibt sich zugunsten einer Kombinationstherapie für die Zelllinien PC-52 ($p_t < 0,01$) und SCC-68 ($p_t < 0,05$) im gesamten Dosiswirkungsbereich. Hier scheint Cisplatin einen gewünschten additiven Effekt zur alleinigen Anwendung von Nintedanib zu haben, obwohl sich für die Monotherapie interessanterweise in den niedrigen Dosisstufen (bis ca. 5 μ M) erst eine leichte Zunahme der Zellzahl darstellt, an welche sich dann ein starker Abfall der relativen Zellzahl unter 20 % anschließt. Auch zeigt die Anwendung der Kombinationstherapie auf Zellen der Linie PC-13 einen signifikant erhöhten zytoreduktiven Effekt in einem Dosisbereich zwischen 3,2 und 50 μ M ($p_t < 0,05$), wohingegen ein Unterschied in niedrigen Dosisstufen (0,4 - 3,2 μ M) nicht nachzuweisen war.

Volasertib

Zahlreiche Studien der letzten zwei Dekaden konnten der PLK1 eine zentrale Rolle in der Regulation verschiedener Kontrollpunkte (checkpoints) im Zellzyklus zuschreiben. Hierzu zählen die Zentrosomenreifung, die Ausbildung der Mitosespindel, die Initiation des APC sowie die Zytokinese während der

Telophase [99-101]. In physiologisch proliferierenden Zellen laufen diese Prozesse mit jedem neuen Zellzyklus ab. Eine Überexpression der PLK1 kann dabei, insbesondere bei sich schnell teilenden Zellen, zur malignen Entartung führen. Erhöhte Expressionslevel dieser Kinase können zum Beispiel in Zellen der AML, des CRC, des NSCLC oder in Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion nachgewiesen werden [27, 64]. Für Patienten mit HNSCC konnten Untersuchungen von Knecht, Elez [65] sowohl eine mehrheitliche PLK1-Überexpression in m-RNA-Analysen als auch eine schlechtere Prognose gemessen an der 5-JÜR feststellen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird die PLK-1 in der Literatur als möglicher Tumormarker diskutiert, ohne sich bislang im klinischen Setting etabliert zu haben.

Als selektiver Inhibitor der Serin- / Threoninkinase PLK-1 reiht sich Volasertib in die Gruppe der sogenannten "Checkpoint-Inhibitoren" ein. Der Wirkungseffekt in maligne entarteten Zellen basiert dabei vorwiegend auf der Blockade des G2/M-Übergangs des Zellzyklus mit der Einleitung nachfolgender Apoptose [27, 68]. Im Gegensatz zu den PD-1-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab, welche sich in Phase-III-Studien für das HNSCC bewährten und daher zu einer Zulassung fanden, fehlen bislang valide Ergebnisse zur klinischen Anwendung von Volasertib an Patienten mit HNSCC.

Die Expressionsanalyse der vorliegenden Studie konnte für alle verwendeten Zelllinien eine PLK1-Expression nachweisen. Insgesamt zeigen alle fünf Zelllinien hierbei ein starkes bis sehr starkes Expressionslevel der entsprechenden Kinase. Dies spiegelt sich in einem sehr deutlichen Ansprechen aller Zelllinien auf den angewendeten Serin- / Threoninkinase-Inhibitor Volasertib wieder. Entsprechend finden sich sowohl für die Monotherapie als auch für die Kombinationstherapie mit Volasertib bereits in niedrigen Dosisstufen starke zytoreduktive Effekte mit Erniedrigungen der Zellzahl um mehr als 50 % wieder. Bei einer Dosisrange von 10 μ M bis 0,5 nM und somit bereits starker Verdünnung des Wirkstoffs, erschwerte dies die Bestimmung einer IC_{50} erheblich, sodass die Berechnung der IC_{20} zur Anwendung kam.

Betrachtet man die IC₂₀-Werte der Monotherapie mit Volasertib, fällt für vier von fünf untersuchten Zelllinien eine deutliche Erniedrigung im Vergleich zur Cisplatin-Monotherapie auf. Die IC₂₀ der Zelllinie SCC-9 war dabei nicht bestimmbar. Für alle anderen Zelllinien scheint die gezielte Therapie mit Volasertib in-vitro jedoch einen deutlich stärkeren Effekt zu haben als die Cisplatin-Monotherapie.

Vergleicht man nun diese Ergebnisse aus der alleinigen Anwendung von Volasertib mit denen der Kombinationstherapie mit Cisplatin, so zeigt sich erstaunlicherweise ein ebenso deutlicher Unterschied der IC₂₀-Werte. Während sich auch hier für SCC-9 keine eindeutige Aussage treffen lässt, weisen die anderen vier Zelllinien (PC-52, SCC-68, PC-1 und PC-13) deutlich niedrigere IC₂₀-Werte für Monotherapie auf. Obwohl nur partielle signifikante Unterschiede in den Dosis-Wirkungs-Beziehungen der einzelnen Zelllinien zu finden waren, scheint ein Zusatz von Cisplatin, entgegen der Hypothese eines möglichen Synergismus, offenbar einen antagonistischen Effekt zu haben. Hier könnte eine inhibierende Interaktion der Wirkstoffe als mögliche Ursache angesehen werden.

Betrachtet man die Ergebnisse der Monotherapie mit Cisplatin im Vergleich zur Anwendung von Volasertib mit Cisplatin-Zusatz, so ergeben sich, bei nur unwesentlichen Veränderungen der IC₂₀-Werte, keine wesentlichen additiven oder inhibierenden Effekte bei den untersuchten Zelllinien.

LCL-161

Die Proteine der IAP-Familie (Inhibition-of-apoptosis-proteins) stellen endogene Inhibitoren der Apoptose dar. Zu den bestuntersuchten Vertretern gehören dabei cIAP-1, cIAP-2 und XIAP. Während cIAP-1 und cIAP-2 ihre zentrale Wirkung durch die indirekte Blockade des sogenannten Komplex-2 (DICS) entfalten, sorgt XIAP durch eine direkte Inhibition der Exekutionscaspasen 3, 7 und 9 für eine Apoptosehemmung. Zu den natürlichen Antagonisten dieser Moleküle gehört SMAC (Second mitochondrial activator of caspases), welches in Mitochondrien exprimiert wird und über die Hemmung der cIAP/XIAP-Proteine für eine indirekte Aktivierung der Caspasen mit nachfolgender

Apoptose sorgt. Bei Prozessen der Gewebsregeneration oder der Entwicklung und Morphogenese verschiedenster Gewebe während der Embryonalentwicklung sorgen diese Stoffe für ein geregeltes Gleichgewicht zwischen Zelluntergang und Zellaufbau. Wie auch für andere Signalkaskaden beschrieben, kann die Regulation der Apoptose fehlerhaft ablaufen und somit zu einer malignen Entartung von Zellen beitragen.

In zahlreichen Studien der letzten Jahre konnten Proteine der IAP-Familie mit der malignen Entartung verschiedenster Gewebe assoziiert werden. Darunter sind Tumore der Harnblase, des kolorektalen Karzinoms oder der Prostata zu nennen [102-104]. Für das HNSCC konnte in immunhistochemischen Analysen durch Tanimoto et al. eine Korrelation zwischen nukleärer cIAP-1-Expression und einer lymphogenen Metastasierung beziehungsweise schlechten Prognose von Patienten nachgewiesen werden [74]. Zudem konnten für Patienten mit HNSCC in PCR-Analysen von Mansour, Ali [105] deutlich erhöhte Expressionslevel des cIAP-1, speziell in Fällen mit positivem p16-Status, aufgezeigt werden. In einer Studie von Yang, Feng [106] konnte darüber hinaus eine Inhibition des IAP-Vertreters XIAP für Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC zu einer signifikanten Erhöhung der Cisplatin-Sensibilität führen. All diese Daten charakterisieren die IAP-Proteine XIAP und cIAP-1/-2 als vielversprechende Target-Moleküle auf dem Gebiet der Apoptosesensibilisierung entarteter Zellen. Dies stellt somit die Rationale für die Entwicklung und Anwendung zahlreicher SMAC-Analoga für die gezielte Antitumorthherapie dar.

Das in der vorliegenden Studie untersuchte SMAC-Analogon LCL-161 fand bereits in vorausgehenden Untersuchungen der Studiengruppe seine Anwendung in Zelllinien des HNSCC. Brands, Herbst [80] demonstrierten hierbei sowohl durch Monotherapie mit FAS-L als auch in Kombinationstherapie mit LCL-161 ein signifikant reduziertes Zellüberleben in drei von fünf untersuchten Zelllinien. Darüber hinaus gelang in zuvor als FAS-L-resistent charakterisierten Zelllinien die Apoptosesensibilisierung mit Erniedrigung der Zellzahl durch Kombinationsanwendung mit dem SMAC-Analogon in einer Konzentration von 50 μM (IC_{50}).

Für den TKI Afatinib zeigt ein Zusatz von LCL-161 in mittlerer inhibitorischer Konzentration für vier von fünf Zelllinien keinen synergistischen Effekt. Lediglich für die Zelllinie PC-52 konnte eine signifikante ($p_t < 0,05$) Reduktion der relativen Zellzahl erreicht werden.

Erstaunlicherweise zeigte eine gegen den EGFR gerichtete Therapie für diese Zelllinie in den vorliegenden Untersuchungen sowie in vorausgehenden Ergebnissen der Studiengruppe den geringsten Effekt [84, 91]. Hierbei könnte die Induktion von Antiapoptose, im Sinne einer Aktivierung eines alternativen Signalweges, für eine reduzierte Wirkung einer EGFR-Inhibition verantwortlich sein. Um diese These jedoch weiterführend bewerten zu können, sind weitere experimentelle Studien notwendig. Dabei könnten die Expressionslevel der Targetproteine χ IAP und χ IAP-1/-2 für die vorliegenden Zelllinien quantifiziert werden, wobei eine vergleichsweise hohe Expression für PC-52 zu erwarten wäre.

Eindeutige Ergebnisse zeigt die Anwendung von Nintedanib in Kombination mit LCL-161. Hier zeigte der Zusatz von LCL-161 für alle Zelllinien eine signifikante Erhöhung des zellreduktiven Effektes. Wie bereits in der Anwendung des TKI Afatinib beschrieben, war dieser Effekt für die Zelllinie PC-52 am deutlichsten vertreten. Somit weisen auch diese Ergebnisse auf ein hohes Expressionslevel von χ IAP bzw. χ IAP-1/-2 in PC-52-Zellen hin. Insgesamt sprechen die Ergebnisse der Intervention für einen deutlichen additiven oder synergistischen Effekt des SMAC-Analogons LCL-161 zur TKI-Therapie. Hinzu kommt dabei die Eigenschaft des Wirkstoffs Nintedanib, neben der Blockade der Rezeptoren VEGFR, FGFR und PDGFR auch direkt apoptoseinduzierend zu wirken. Dieser zusätzliche Wirkungseffekt könnte in Kombination mit der Apoptosesensibilisierung durch das SMAC-Analogon zu dem beobachteten Effekt führen. Dies macht die vorliegende Anwendung aus Nintedanib mit LCL-161 zu einer vielversprechenden Wirkstoffkombination für weiterführende Studien im präklinischen Setting.

Betrachtet man die Effekte der Mono- und Kombinationsanwendung von Volasertib, so zeigen sich durch den Zusatz von LCL-161 lediglich für zwei von fünf Zelllinien signifikante Effektverstärkungen. Wie auch bei der Anwendung

der TKI Afatinib und Nintedanib zeigte sich dieses Mal für PC-52 eine signifikant erhöhte Sensibilität der Tumorzellen, was die oben genannte Hypothese erneut bestätigt. Zusätzlich konnte ein Zusatz von LCL-161 zur Monotherapie mit Volasertib für eine signifikante Erniedrigung der Zellviabilität in PC-13-Zellen führen.

5. Zusammenfassung

Mit einer weltweiten Inzidenz von etwa 600.000 Neuerkrankten pro Jahr gehört das orale Plattenepithelkarzinom zu den sechs häufigsten malignen Tumorerkrankungen des Menschen. Auf Basis der aktuellen Leitlinien können Karzinome der Stadien I und II mit Raten von 65-90 % erfolgreich durch ein primär operatives Vorgehen behandelt werden. Zur Behandlung operabler Tumoren der Stadien III-IVb hat sich hingegen die multimodale Therapie mit primär operativem Vorgehen, gegebenenfalls mit nachfolgender adjuvanter Radiatio beziehungsweise Radiochemotherapie, etabliert. Beim Vorhandensein von Fernmetastasen hingegen ist das Therapiekonzept als palliativ einzustufen. Während sich für die adjuvante, kurativ intendierte Radiochemotherapie die Verwendung von Cisplatin oder cisplatinhaltiger Wirkstoffe etabliert hat, stellen seit einigen Jahren selektive Wirkstoffe wie Nivolumab und Cetuximab eine Alternative zur Cisplatin-Anwendung im palliativen Setting dar. Mit einer für die Stadien III und IV zu verzeichnenden relativen 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 43,9 %, scheinen aktuelle Behandlungskonzepte jedoch nur mäßig erfolgsversprechend zu sein. Vor allem für die medikamentöse Therapie des fortgeschrittenen oralen Plattenepithelkarzinoms scheinen daher neue rationale Therapieansätze notwendig zu sein. Besonders ein hohes Maß an Toxizität sowie die individuelle Resistenzbildung vermögen den Therapieerfolg der herkömmlichen Chemotherapie zu kompromittieren. Spezifisch wirksame sogenannte "targeted agents" binden RTK irreversibel oder reversibel und blockieren somit die nachgeschaltete Signalkaskade. Sie konnten bereits für andere Tumorentitäten erfolgsversprechende Ergebnisse mit daraus resultierender klinischer Zulassung erzielen. Sie versprechen darüber hinaus ein günstigeres Nebenwirkungs- und Toxizitätsprofil als herkömmliche Zytostatika. Auf der Basis dieses pharmakologischen Konzeptes entstanden in den letzten Dekaden zahlreiche unterschiedliche Wirkstoffe. In der vorliegenden Studie kam es zur Anwendung der TKI Afatinib, Volasertib und Nintedanib in alleiniger Anwendung sowie Kombinationstherapie mit Cisplatin und dem Smac-mimetic LCL-161. Die Analyse der Wirksamkeit oben genannter Stoffe

erfolgte durch eine In-vitro-Evaluation an fünf Zelllinien des humanen Plattenepithelkarzinoms der Kopf- und Halsregion. Nach semiquantitativem Expressionsnachweis der Zielstrukturen erfolgte die Stimulation der Zellen mittels spezifischer Verdünnungsreihen in Mono- und Kombinationstherapie. Folgend wurden auf der Basis von Zellzahlanalysen, Kristallviolettassays und der Erstellung von Dosis-Wirkungskurven zelllinienspezifische IC_{50} - beziehungsweise IC_{20} -Werte ermittelt, statistisch ausgewertet und miteinander verglichen.

Die Anwendung von Afatinib in Monotherapie zeigte in der vorliegenden Studie keine signifikant erhöhte Zytoreduktion im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Cisplatin. Lediglich konnten für zwei von fünf Zelllinien nicht signifikante Vorteile für Afatinib aufgezeigt werden. Auch ein Zusatz von Cisplatin zur Anwendung ergab keinen erwarteten synergistischen Effekt. Interessanterweise zeigen die mittleren inhibitorischen Konzentrationen für die Monotherapie mit Afatinib partiell bessere Ansprechraten im Vergleich zu den selektiven EGFR-Inhibitoren Gefitinib, Erlotinib und Cetuximab. Diese Ergebnisse sprechen für einen Vorteil sogenannter Paninhibitoren gegenüber selektiven Vertretern. Zudem verdeutlichen sie die Diversität oraler Plattenepithelkarzinome und die Notwendigkeit einer Weiterentwicklung individualisierter Therapieansätze zur Erkennung und Differenzierung möglicher Markersubstanzen.

Die Anwendung von Nintedanib in Monotherapie zeigte in der Analyse keine signifikanten Vorteile gegenüber einer alleinigen Cisplatinanwendung. Auf der Basis der Ergebnisse der vorausgegangenen Expressionsanalysen scheint der FGFR-2 eine übergeordnete Rolle zu spielen, da hier partiell von einer verstärkten Wirksamkeit auszugehen ist. Weiterhin scheint gegenüber selektiven Angiogeneseinhibitoren kein Vorteil für Nintedanib zu bestehen. Betrachtet man die Kombinationsanwendung von Nintedanib mit Cisplatin so fallen interessanterweise sowohl synergistische wie auch partiell antagonistische Effekte im Vergleich zur Cisplatin-Monotherapie auf. Diese können durch die heterogene Expression der Zielstrukturen allein nicht erklärt werden, sodass hier weiterführende Untersuchungen sinnvoll wären.

Bei der Anwendung von Volasertib konnte für alle Zelllinien eine sehr deutliche Zytoreduktion erzielt werden, was durch generell erhöhte Expressionsraten erklärbar scheint. Sie manifestierte sich zudem in deutlich erniedrigten mittleren inhibitorischen Konzentrationen der Monotherapie gegenüber einer alleinigen Cisplatin-Anwendung. Betrachtet man die Kombinationsanwendung von Volasertib mit Cisplatin imponierten für alle Zelllinien erstaunlicherweise sogar schlechtere Ansprechraten verglichen mit der Volasertib-Monotherapie. Hier könnte man von einer inhibierenden Wechselwirkung der Wirkstoffe ausgehen. Diese Tatsache macht weiterführende Untersuchung zur Anwendung von Volasertib in Monotherapie attraktiver als die jeweilige Kombinationsanwendung. Weiterhin stellt sich die Frage, inwiefern die Anwendung in das klinische Setting übertragbar ist. RMC-Studien mit Aussagen zum Toxizitätsprofil fehlen bislang. Die vermeidlich hohe Potenz des Wirkstoffs in bereits stark verdünnten Dosisbereichen erschwerte die experimentellen Analysen und könnte sich auch bei klinischer Erprobung in hohen Toxizitätsraten widerspiegeln.

Die Kombinationsanwendungen von LCL-161 mit Afatinib beziehungsweise Volasertib wiesen keine signifikant erhöhten zytoreduktiven Effekte auf. Hingegen waren die Untersuchungsergebnisse der Kombinationsanwendung des verwendeten Smac-Analogons und Nintedanib bemerkenswert. In vier von fünf Zelllinien sorgte ein LCL-161-Zusatz für eine signifikant erhöhte Zytoreduktion. Eine zusätzlich zur Angiogeneseinhibition durch Nintedanib induzierte Apoptoseinduktion in Kombination mit der Apoptosesensibilisierung durch LCL-161 könnte eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung darstellen. Aufgrund der sehr heterogenen Ergebnisse dieser Studie mit partiell synergistischen aber auch antagonistischen Effekten lässt sich schlussfolgern, dass alle drei verwendeten TKI aktuell keine vielversprechende Alternative zu der herkömmlichen Chemotherapie darstellen. Diese Heterogenität verdeutlicht auch, dass die Suche nach individuellen, zielgerichteten medikamentösen Therapieansätzen essenziell bleibt. Hierbei könnten Smac-Analoga ein vielversprechendes Feld weiterführender experimenteller und klinischer Studien eröffnen.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Dosiswirkungskurve und graphische Darstellung der IC_{50}	26
Abbildung 2 – Relative Expression der Zielstrukturen	33
Abbildung 3 – Afatinib in Mono- und Kombinationstherapie	37
Abbildung 4 – Nintedanib in Mono- und Kombinationstherapie	41
Abbildung 5 – Volasertib in Mono- und Kombinationstherapie	45
Abbildung 6 – Anwendungen TKI und Smac-Analogon LCL-161	48

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Tumorstadien von Kopf- und Halstumoren	3
Tabelle 2 – Ursprung und TNM-Status der verwendeten Zelllinien	23
Tabelle 3 – Übersicht der Interventionen	27
Tabelle 4 – Mittlere Inhibitorische Konzentration von Cisplatin	27
Tabelle 5 – Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software	29
Tabelle 6 – IC_{50} (μM) Afatinib in Mono- und Kombinationstherapie	36
Tabelle 7 – IC_{50} (μM) Nintedanib in Mono- und Kombinationstherapie	40
Tabelle 8 – IC_{20} Volasertib in Mono- und Kombinationstherapie	44
Tabelle 9 – Vergleich der Anwendungen TKI und TKI + LCL-161	47

6.3 Literaturverzeichnis

1. Institut, R.K., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016. **10 Ausgabe**.
2. Poschl, G. and H.K. Seitz, *Alcohol and cancer*. Alcohol Alcohol, 2004. **39**(3): p. 155-65.
3. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
4. Badulescu, F., et al., *Recent data about the role of human papillomavirus (HPV) in oncogenesis of head and neck cancer*. Rom J Morphol Embryol, 2010. **51**(3): p. 437-40.
5. Brotherston, D.C., et al., *Patient preferences for oropharyngeal cancer treatment de-escalation*. Head Neck, 2013. **35**(2): p. 151-9.
6. Wolff, K., M. Follmann, and A. Nast *Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*. Deutsches Ärzteblatt, 2012.
7. UICC, C. Wittekind, and H.-J. Meyer, *Klassifikation maligner Tumoren*. 2012. **7. Auflage**.
8. Krebsgesellschaft, D., *Leitlinien- Diagnose und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*. Deutsches Ärzteblatt, 2012.
9. Kreppel, M., et al., *Diagnostik und Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms*. Oralchirurgie Journal, 2012. **3/2012**.
10. Listl, S., et al., *Survival of patients with oral cavity cancer in Germany*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53415.
11. D'Cruz, A.K., et al., *Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial*. Head Neck, 2009. **31**(5): p. 618-24.
12. Byers, R.M., et al., *Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue?* Head Neck, 1998. **20**(2): p. 138-44.
13. De Zinis, L.O., et al., *Prevalence and localization of nodal metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity: role and extension of neck dissection*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2006. **263**(12): p. 1131-5.
14. Schwenzer-Zimmerer, K., et al., *Adjuvant therapy in head and neck cancer. State of the art*. MKG-Chirurg, 2010.

15. Vermorcken, J.B. and P. Specenier, *Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 7**: p. vii252-61.
16. Mendenhall, W.M., et al., *Is radiation therapy a preferred alternative to surgery for squamous cell carcinoma of the base of tongue?* J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 35-42.
17. Schultze, J., et al., *[Preoperative radiochemotherapy for advanced oral cavity tumours : the Kiel DOSAK experience regarding curability and quality of life]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2006. **10**(4): p. 249-57.
18. Pigorsch, S., et al., *Allgemeine Grundsätze der Strahlentherapie*. In: *Mast G (Hrsg)Kopf-Hals-Malignome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 2009.
19. 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.
20. Ott, I. and R. Gust, *Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika*. Pharmazie in unserer Zeit, 2006. **35**(2): p. 124-133.
21. Siddik, Z.H., *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7265-7279.
22. Voigt, W., A. Dietrich, and H.-J. Schmoll, *Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz*. Pharmazie in unserer Zeit, 2006. **35**(2): p. 134-143.
23. Bernier, J., et al., *Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(19): p. 1945-52.
24. Wannemacher, M., J. Debus, and F. Wenz, *Strahlentherapie*. 2006: Springer Berlin Heidelberg.
25. Ärzteblatt, D., *Tyrosinkinase als Ziele neuer Therapie*. Deutsches Ärzteblatt, 2007.
26. Burtneß, B., et al., *Afatinib versus placebo as adjuvant therapy after chemoradiation in a double-blind, phase III study (LUX-Head & Neck 2) in patients with primary unresected, clinically intermediate-to-high-risk head and neck cancer: study protocol for a randomized controlled trial*. Trials, 2014. **15**: p. 469.

27. Hao, Z.L. and V. Kota, *Volasertib for AML: clinical use and patient consideration*. *Oncotargets and Therapy*, 2015. **8**: p. 1761-1771.
28. Modjtahedi, H., et al., *A comprehensive review of the preclinical efficacy profile of the ErbB family blocker afatinib in cancer*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2014. **387**: p. 505-21.
29. Khelwatty, S.A., et al., *Prognostic significance and targeting of HER family in colorectal cancer*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013. **18**: p. 394-421.
30. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(11): p. 1160-74.
31. Ioannou, N., et al., *Expression pattern and targeting of HER family members and IGF-IR in pancreatic cancer*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012. **17**: p. 2698-724.
32. Ärzteblatt, D., *Afatinib-Reduziert Symptome von Plattenepithelkarzinomen deutlich*. *Deutsches Ärzteblatt*, 2015.
33. 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*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(25): p. 4170-4176.
34. Maurizi, M., et al., *EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: correlation with clinico-pathological features and prognostic significance*. *Int J Cancer*, 1992. **52**(6): p. 862-6.
35. Agulnik, M., *New approaches to EGFR inhibition for locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN)*. *Med Oncol*, 2012. **29**(4): p. 2481-91.
36. Wheeler, D.L., et al., *Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members*. *Oncogene*, 2008. **27**(28): p. 3944-56.
37. Dungo, R.T. and G.M. Keating, *Afatinib: first global approval*. *Drugs*, 2013. **73**: p. 1503-15.
38. Seiwert, T.Y., et al., *A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Ann Oncol*, 2014. **25**: p. 1813-20.
39. Radtke, I., *VEGF - Rezeptor - spezifische Signaltransduktion über Ras und Stickstoffmonoxid in Endothelzellen: Einfluß auf Tumorwachstum*. 2004.

40. Stutfeld, E. and K. Ballmer-Hofer, *Structure and function of VEGF receptors*. IUBMB Life, 2009. **61**(9): p. 915-22.
41. Yla-Herttuala, S., et al., *Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(10): p. 1015-26.
42. Matsumoto, T. and L. Claesson-Welsh, *VEGF receptor signal transduction*. Sci STKE, 2001. **2001**(112): p. re21.
43. Heldin, C.H., *Structural and functional studies on platelet-derived growth factor*. EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4251-9.
44. Holland-Frei, *Cancer Medicine*. 2010. **8**.
45. Matsui, T., et al., *Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes*. Science, 1989. **243**(4892): p. 800-4.
46. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *Fibroblast growth factors*. Genome Biol, 2001. **2**(3): p. REVIEWS3005.
47. Stegmann, T.J., *FGF-1: a human growth factor in the induction of neoangiogenesis*. Expert Opin Investig Drugs, 1998. **7**(12): p. 2011-5.
48. Ornitz, D.M., et al., *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 15292-7.
49. Hilberg, F., et al., *BIBF 1120: Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy*. Cancer Research, 2008. **68**: p. 4774-4782.
50. Hsu, H.W., et al., *Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers*. Oral Oncol, 2014. **50**(1): p. 19-26.
51. Bernier, J., *Head and Neck Cancer: Multimodality Management*. Springer Science & Business Media, 2011.
52. Hunt, J. and L. Poston, *An Introduction to Vascular Biology: From Basic Science to Clinical Practice*. Cambridge University Press, 2002.
53. Henson, B.J. and S.M. Gollin, *Overexpression of KLF13 and FGFR3 in oral cancer cells*. Cytogenet Genome Res, 2010. **128**(4): p. 192-8.
54. 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.

55. Schultz-Hector, S., *Beta-fibroblast growth factor expression in human and murine squamous cell carcinomas and its relationship to regional endothelial cell proliferation*. *Cancer Res*, 1993. **53**(6): p. 1444-9.
56. Margaritescu, C., et al., *VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric study*. *Clin Exp Med*, 2010. **10**(4): p. 209-14.
57. Tong, M., et al., *Human head and neck squamous cell carcinoma cells are both targets and effectors for the angiogenic cytokine, VEGF*. *J Cell Biochem*, 2008. **105**(5): p. 1202-10.
58. Bran, B., et al., *The platelet-derived growth factor receptor as a target for vascular endothelial growth factor-mediated anti-angiogenetic therapy in head and neck cancer*. *Int J Oncol*, 2009. **34**(1): p. 255-61.
59. Reck, M., et al., *Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(2): p. 143-55.
60. 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.
61. Karatzanis, A.D., et al., *Molecular pathways of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012. **269**(3): p. 731-7.
62. 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.
63. Lowery, D.M., D. Lim, and M.B. Yaffe, *Structure and function of Polo-like kinases*. *Oncogene*, 2005. **24**(2): p. 248-59.
64. Takai, N., et al., *Polo-like kinases (Plks) and cancer*. *Oncogene*, 2005. **24**(2): p. 287-91.
65. Knecht, R., et al., *Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Cancer Res*, 1999. **59**(12): p. 2794-7.
66. Rudolph, D., et al., *BI 6727, a Polo-like kinase inhibitor with improved pharmacokinetic profile and broad antitumor activity*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(9): p. 3094-102.
67. Krause, M., et al., *Simultaneous PLK1 inhibition improves local tumour control after fractionated irradiation*. *Radiother Oncol*, 2013. **108**(3): p. 422-8.

68. Wagener, C. and O. Müller, *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression*. 2010.
69. Brunner, T. and C. Mueller, *Apoptosis in disease: about shortage and excess*. *Essays Biochem*, 2003. **39**: p. 119-30.
70. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 487-501.
71. Tsao, D.H., et al., *The NMR structure of the TRADD death domain, a key protein in the TNF signaling pathway*. *J Biomol NMR*, 2007. **39**(4): p. 337-42.
72. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
73. Yang, C., et al., *LCL161 increases paclitaxel-induced apoptosis by degrading cIAP1 and cIAP2 in NSCLC*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016. **35**(1): p. 158.
74. Tanimoto, T., et al., *Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas*. *Cancer Lett*, 2005. **224**(1): p. 141-51.
75. Qi, S., et al., *Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2008. **37**(11): p. 1047-53.
76. Yang, J., et al., *Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases*. *Mol Cancer Ther*, 2011. **10**(4): p. 658-69.
77. Matzinger, O., et al., *The radiosensitizing activity of the SMAC-mimetic, Debio 1143, is TNFalpha-mediated in head and neck squamous cell carcinoma*. *Radiother Oncol*, 2015. **116**(3): p. 495-503.
78. Sun, Q., et al., *Smac modulates chemosensitivity in head and neck cancer cells through the mitochondrial apoptotic pathway*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(8): p. 2361-72.
79. West, A.C., et al., *The SMAC mimetic, LCL-161, reduces survival in aggressive MYC-driven lymphoma while promoting susceptibility to endotoxic shock*. *Oncogenesis*, 2016. **5**: p. e216.
80. Brands, R.C., et al., *Cytotoxic effects of SMAC-mimetic compound LCL161 in head and neck cancer cell lines*. *Clin Oral Investig*, 2016.

81. Heo, D.S., et al., *Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines*. *Cancer Res*, 1989. **49**(18): p. 5167-75.
82. Brands, R.C., et al., *Co-treatment of wild-type EGFR head and neck cancer cell lines with afatinib and cisplatin*. *Mol Med Rep*, 2016. **13**(3): p. 2338-44.
83. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
84. Hartmann, S., et al., *Erlotinib and gefitinib responsiveness in head and neck cancer cell lines--a comparing analysis with cetuximab*. *Clin Oral Investig*, 2016. **20**(4): p. 759-69.
85. Vanneman, M. and G. Dranoff, *Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 237-51.
86. Harrington, K.J., et al., *Nivolumab versus standard, single-agent therapy of investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CheckMate 141): health-related quality-of-life results from a randomised, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(8): p. 1104-1115.
87. Karabajakian, A., et al., *Nivolumab in recurrent/metastatic head and neck cancers*. *Future Oncol*, 2018. **14**(7): p. 603-609.
88. Kiyota, N., et al., *A randomized, open-label, Phase III clinical trial of nivolumab vs. therapy of investigator's choice in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck: A subanalysis of Asian patients versus the global population in checkmate 141*. *Oral Oncol*, 2017. **73**: p. 138-146.
89. Specenier, P., *Nivolumab in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018. **18**(5): p. 409-420.
90. Young, N.R., et al., *Afatinib efficacy against squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines in vitro and in vivo*. *Target Oncol*, 2015.
91. Hartmann, S., et al., *Influence of epidermal growth factor receptor expression on the cetuximab and panitumumab response rates of head and neck carcinoma cells*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2014. **42**(7): p. 1322-8.
92. Wang, X.K., et al., *Afatinib enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic agents by eradicating cancer stem-like cells*. *Cancer Res*, 2014. **74**: p. 4431-45.

93. Wang, X.K., et al., *Afatinib circumvents multidrug resistance via dually inhibiting ATP binding cassette subfamily G member 2 in vitro and in vivo*. *Oncotarget*, 2014. **5**: p. 11971-85.
94. 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.
95. Vairaktaris, E., et al., *FGFR-2 and -3 play an important role in initial stages of oral oncogenesis*. *Anticancer Res*, 2006. **26**(6B): p. 4217-21.
96. Marshall, M.E., et al., *Fibroblast growth factor receptors are components of autocrine signaling networks in head and neck squamous cell carcinoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(15): p. 5016-25.
97. Wakulich, C., et al., *Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2002. **93**(5): p. 573-9.
98. 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.
99. Barr, F.A., H.H. Sillje, and E.A. Nigg, *Polo-like kinases and the orchestration of cell division*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(6): p. 429-40.
100. Nigg, E.A., *Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(6): p. 776-83.
101. Xie, S., et al., *Regulation of cell cycle checkpoints by polo-like kinases*. *Oncogene*, 2005. **24**(2): p. 277-86.
102. Jonsson, G., S. Paulie, and A. Grandien, *clAP-2 block apoptotic events in bladder cancer cells*. *Anticancer Res*, 2003. **23**(4): p. 3311-6.
103. Gill, C., et al., *Effects of clAP-1, clAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation*. *Mol Cancer*, 2009. **8**: p. 39.
104. Wang, Q., X. Wang, and B.M. Evers, *Induction of clAP-2 in human colon cancer cells through PKC delta/NF-kappa B*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(51): p. 51091-9.
105. Mansour, A., et al., *Human papillomavirus-16 (HPV-16) infection association with CIAP-2 expression in head and neck cancer*. *Med Oncol*, 2012. **29**(4): p. 2459-65.

106. Yang, X.H., et al., *XIAP is a predictor of cisplatin-based chemotherapy response and prognosis for patients with advanced head and neck cancer*. PLoS One, 2012. 7(3): p. e31601.

Danksagung

Mein Dank gilt folgenden Personen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation maßgeblich unterstützt haben.

Bei meiner Familie und meiner Freundin möchte ich mich ganz besonders herzlich für die stetige, liebevolle und bedingungslose Unterstützung bedanken, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zudem Prof. Dr. Dr. Urs Müller Richter für die Themenvergabe und Ermöglichung dieser Dissertationsarbeit.

Besonderer Dank gilt meinem Freund und Kollegen Herrn Dr. Dr. Roman C. Brands für die hervorragende Betreuung und das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei Frau Katharina Teschner möchte ich mich für die Erstkorrektur dieser Dissertationsschrift bedanken.

Ich danke Frau Dr. Imme Haubitz für die besondere Hilfestellung und Beratung bei der statistischen Auswertung der Studienergebnisse.

Ebenso Danke ich der Studiengruppe für die hervorragende Zusammenarbeit. Insbesondere Herrn Dr. Axel Seher und Frau Margit Schleyer für die kompetente Hilfestellung bei der Datenerhebung.

Lebenslauf

Personalien

Name	De Donno, Francesco
Adresse	Königswinterstraße 14, 50939 Köln
Geburtsdatum	09.08.1988 in Köln
Staatsangehörigkeit	Italienisch
Familienstand	Ledig

Beruflicher Werdegang

Seit Januar 2019	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung für Mund, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Evangelisches Krankenhaus Bethesda in Mönchengladbach
Seit Februar 2014	Tätigkeit als angestellter Zahnarzt in der Praxis Fröhlich und Raschke, Köln

Universitärer Werdegang

Dezember 2018	Drittes Staatsexamen der Humanmedizin
Oktober 2017	Zweites Staatsexamen der Humanmedizin, Düsseldorf
August 2014	Erstes Staatsexamen der Humanmedizin
Oktober 2013	Studienbeginn der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
Juli 2013	Zahnärztliche Prüfung
Oktober 2010	Zahnärztliche Vorprüfung
April 2008	Studienbeginn der Zahnheilkunde an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Publikationen

2015 Oral investigations – Effectiveness evaluation of nintedanib, dovitinib and pazopanib in the treatment of squamous cell carcinoma cells of the head and neck - Roman C. Brands, Francesco DeDonno, Axel Seher, Alexander C. Kübler, Urs D. A. Müller-Richter

Vorträge

Mai 2015 Jahrestagung der „AgKi“
Stellenwert der Apoptoseinduktion durch SMAC mimetics; Brands R. C., De Donno F., Seher A., Kübler A., Müller-Richter

Juni 2015 Kongress der „DGMKG“
SMAC mimetic compounds in der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms; Brands R. C., Herbst F., De Donno F., Hartmann S., Seher A., Böhm H., Kübler A., Müller-Richter

Schulischer Werdegang

1998 - 2007 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Erich-Kästner-Gymnasium, Köln

1994 - 1998 Grundschule Halfengasse, Köln

Köln, den 28.08.2019

Dr. med. Francesco De Donno