

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

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

# Analyse von ABC-Transportern im Zusammenhang mit Multidrug-Resistance in Zelllinien des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**vorgelegt von**  
Valentin Carl Steinacker  
**aus Göppingen,**

**Würzburg, Dezember 2022**

**Referent:** apl. Prof. Dr. Dr. Urs Müller-Richter

**Korreferent/Korreferentin:** Univ. Prof. Dr. Thomas Meyer

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2023**

**Der Promovend ist Zahnarzt und Arzt.**

Meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie.....	1
1.2	Therapie .....	2
1.2.1	Radiatio.....	2
1.2.2	Medikamentöse Tumorthherapie .....	3
1.3	ABC-Transporter.....	5
1.3.1	Grundlagen der ABC-Transporter.....	5
1.3.2	Struktur und Mechanismus der ABC-Transporter.....	6
1.3.3	Funktion von ABC-Transportern in Tumoren .....	9
1.4	Ziele der Arbeit.....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1	Material .....	13
2.1.1	Zelllinien.....	13
2.1.2	Primer Assays.....	14
2.1.3	Medien, Chemikalien und Zusätze .....	15
2.1.4	Materialien und Instrumente .....	16
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Kultivierung der Zellen.....	18
2.2.2	Inkubation mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen .....	18
2.2.3	Zytotoxizitäts-Assay .....	19
2.2.4	RNA-Isolation .....	20
2.2.5	cDNA-Synthese .....	21
2.2.6	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	21
2.3	Statistische Methoden .....	22

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1	Expressionsanalyse der nicht selektierten Zellen .....	25
3.2	Analyse der Cisplatinsensitivität in Zelllinien des HNSCC .....	26
3.2.1	Bestimmung der IC5/IC20 Cisplatins in den HNSCC-Zelllinien .....	27
3.2.2	Bestimmung der IC50 von Cisplatin behandelten Zelllinien des HNSCC.....	28
3.2.3	Chemosensitivität cisplatininkubierter Zelllinien .....	30
3.3	PCR-Analyse der mit Cisplatin vorbehandelten Zelllinien des HNSCC .....	36
3.3.1	Abhängigkeit der ABC-Expression von der Inkubationszeit .....	36
3.3.2	ABC-Transporter Expression ausgewählter langzeit-inkubierter Zelllinien ...	41
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>43</b>
4.1	Resistenzentwicklung der inkubierten Zelllinien .....	43
4.2	ABC-Expression in HNSCC.....	45
4.2.1	Überexpression von Transporter-mRNA .....	46
4.2.2	Unterexpression von Transporter-mRNA.....	48
4.2.3	Alternative Resistenzmechanismen der ABC-Transporter .....	49
4.3	Limitationen des Studiendesigns .....	52
4.4	Schlussfolgerung .....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>

## **Appendix**

- I. Abkürzungsverzeichnis
- II. Abbildungsverzeichnis
- III. Tabellenverzeichnis
- IV. Danksagung
- V. Lebenslauf
- VI. Publikationen

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs bilden eine heterogene Gruppe der malignen Neubildungen. Neben Plattenepithelkarzinomen (*head and neck squamous cell carcinoma* - HNSCC), die mit etwa 90 % die häufigsten Vertreter dieser Gruppe sind, gehören zu ihnen auch Adenokarzinome und Sarkome. Mit deutlich über 850.000 jährlichen Neuerkrankungen von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs ist das HNSCC weltweit die sechsthäufigste maligne Neoplasie. Allerdings variiert die Inzidenz nach Geschlecht und Region sehr stark.<sup>[1]</sup> Im weltweiten Durchschnitt erkranken Männer etwa doppelt so häufig wie Frauen.<sup>[2, 3]</sup>

In Deutschland stellt das HNSCC die siebthäufigste Tumorentität bei Männern dar, wobei es im Vergleich bei Frauen an der 15. Stelle steht.<sup>[4]</sup> Während bei Männern in den letzten Jahren eine rückläufige Tendenz zu verzeichnen war, blieb die Rate der Neuerkrankungen bei Frauen konstant.<sup>[5]</sup> Männer erkrankten dabei nicht nur häufiger, sondern auch früher. So liegt das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei Männer bei 62 Jahre und bei Frauen bei 64 Jahre.<sup>[4]</sup> Dazu lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate des Mundhöhlenkarzinoms mit 61 % bei deutschen Frauen deutlich höher als bei deutschen Männern mit 48 %.<sup>[6]</sup> Weltweit war in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme der Fallzahlen zu verzeichnen.<sup>[7]</sup> Amerikanische Studien zeigten dabei, dass vor allem die Inzidenz unter jungen Patienten deutlich zunahm.<sup>[8, 9]</sup> Machten im Zeitraum 1982–1986 die Altersgruppe zwischen 45-54 Jahre nur 16 % dieser Tumoren aus, waren es zwischen 2002–2006 bereits 25 %.<sup>[10]</sup>

Plattenepithelkarzinome können im gesamten oberen Aerodigestivtrakt auftreten. Neben Lokalisationen wie Lippen, Nasopharynx bis Hypopharynx sowie Sinus paranasales sind vor allem Larynx und Mundhöhle von diesen Neoplasien betroffen.<sup>[3]</sup> Zudem konnte in den letzten Jahren eine signifikante Zunahme von Karzinomen im Oropharynx verzeichnet werden. Insbesondere war ein deutlicher Anstieg von Zungen- und Tonsillenkarzinomen bei jungen

Patienten zwischen 20 und 45 Jahren zu erkennen. In dieser Altersgruppe kamen die ansonsten selteneren Zungen- und Tonsillenkzinome auf ähnlich hohe Fallzahlen wie Tumoren in Larynx, Mundhöhle und Pharynx. Letztere hatten in den letzten Jahrzehnten deutlich abgenommen.<sup>[11]</sup>

## 1.2 Therapie

Die Therapieplanung erfolgt interdisziplinär im Rahmen eines Tumorboards. Wenn möglich, wird dabei der kurative Therapieansatz des oralen Plattenepithelkarzinoms verfolgt. Dieser kann aus einem alleinigen operativen Vorgehen oder einer Kombination mit adjuvanter oder neoadjuvanter Strahlentherapie oder Radiochemotherapie bestehen. Im palliativen Setting ist die Durchführung einer alleinigen Radio- oder Chemotherapie wie auch die Kombination der beiden Therapieformen möglich.<sup>[12]</sup> Im Weiteren wird auf die medikamentöse Tumortherapie und die Strahlentherapie genauer eingegangen.

### 1.2.1 Radiatio

Die alleinige Bestrahlung ist zur kurativen Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms ungeeignet. Während sie bei kleineren Tumoren (T1 und T2) zu einer höheren Komplikationsrate führt,<sup>[13]</sup> haben größeren Tumoren (T3 und T4) im Vergleich zur chirurgischen Exzision deutlich höhere Rezidivraten.<sup>[14]</sup> Allerdings zeigt eine kombinierte Therapie aus chirurgischem und strahlentherapeutischem Ansatz signifikante Vorteile in der Tumorkontrolle bei Karzinomen mit hohen Tumorstadien.<sup>[13]</sup> Die Strahlentherapie kann dabei adjuvant zur lokalen Dezimierung potenziell verbliebenen Tumorzellen eingesetzt werden oder neoadjuvant, um den Tumor im Vorfeld zu verkleinern.<sup>[12]</sup>

Die Gesamtdosis der Bestrahlung beträgt zwischen 60 und 70 Gy bei einer Bestrahlungsdauer von 6 Wochen.<sup>[15]</sup> Unterbrechungen der Bestrahlungszyklen beeinflussen das posttherapeutische Outcome negativ.<sup>[14, 16]</sup>

Durch die Kombination mit Chemotherapeutika können Patienten mit hohem Rezidivrisiko zusätzlich profitieren.<sup>[17, 18]</sup>

### 1.2.2 Medikamentöse Tumorthherapie

Die medikamentöse Tumorthherapie ist neben den operativen Eingriffen und der Bestrahlung der HNSCC eine weitere Möglichkeit zur Behandlung dieser Tumoren. Die medikamentöse Therapie hat dabei im Vergleich zu den anderen Therapieansätzen einen systemischen Behandlungsansatz. Ihr lassen sich die Therapie mit Zytostatika, die zielgerichteten Therapie und die Immuncheckpoint-Inhibitoren zuordnen.<sup>[19, 20]</sup>

Die adjuvante Erstlinientherapie stellt dabei eine Kombinationstherapie aus Zytostatika und Bestrahlung dar. Im Vergleich zur lokalen Therapie der HNSCC zeigt die zusätzliche Gabe von Chemotherapeutika eine signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate.<sup>[21, 22]</sup>

Das beste Outcome wird mit Cisplatin und anderen Platinverbindungen erreicht,<sup>[23, 24]</sup> wobei platinbasierte Polychemotherapien keinen prinzipiellen Vorteil gegenüber einer Monotherapie haben. Bei der Therapie zeigt Cisplatin dosisabhängig zytostatische bis zytotoxische Effekte auf die Tumorzellen.<sup>[25]</sup> Auch das Pyrimidinanalogon 5-Fluoruracil (5-FU) erbringt ähnliche Erfolge bei der Behandlung.<sup>[26, 27]</sup> Allerdings führt dabei die geringe Selektivität der Zytostatika zu Problemen. So ist der limitierende Faktor der Therapie die Sensitivität der sich physiologisch schnell teilenden Gewebe, wie der Zellen des Knochenmarks.<sup>[19, 20]</sup>

Indikatoren für die Anwendung einer adjuvanten Radiochemotherapie beim oralen Plattenepithelkarzinom sind neben fortgeschrittenen Tumorstadien (T3 – T4), positive oder unklare Schnittränder, Invasion der Perineuralscheide oder der Gefäße sowie Anzahl und Größe von Metastasen.<sup>[13, 28, 29]</sup> Durch die Entwicklung von Zytostatikaresistenzen trotz anfänglicher Sensitivität gegenüber einem Chemotherapeutikum, ist die Therapie mit diesen Medikamenten nur begrenzt möglich. Aus diesem Grund wird die alleinige Therapie der HNSCC mit Zytostatika nur zur palliativen Behandlung eingesetzt. Bei kurativem Ansatz kommt die kombinierte adjuvante oder neoadjuvante Radiochemotherapie zum Einsatz.<sup>[12]</sup>



Daneben wurden in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Immuntherapie mit *Programmed cell death protein 1* (PD-1)-Inhibitoren wie Nivolumab und Pembrolizumab sowie der zielgerichteten Therapie mit Cetuximab Erfolge erzielt. Diese Therapeutika finden Anwendung in der Zweitlinie.<sup>[30, 31]</sup> PD-1 ist ein Oberflächenprotein der T-Zellen und vermittelt durch den Kontakt mit *Programmed death ligand 1* (PD-L1) eine Immunsuppression. Diesen Mechanismus machen sich einige Tumore zunutze und exprimieren PD-L1 auf ihrer Oberfläche. Durch den Einsatz von PD-1-Inhibitoren wird eine Bindung von PD-L1 an PD-1 verhindert und damit die Immunsuppression blockiert. Die aktivierten T-Zellen ermöglichen eine erneute Erkennung sowie die Elimination der Tumorzellen.<sup>[32, 33]</sup> Zielgerichtete Therapeutika hingegen hemmen spezifische Zellproteine, die von Tumoren überexprimiert werden. Zu diesen Therapeutika gehört auch der monoklonale Antikörper Cetuximab. Cetuximab bindet an den *epidermal-growth-factor-receptor* (EGFR), der in Tumoren wie dem HNSCC überexprimiert vorkommt, und hat dadurch eine antiproliferative und zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen.<sup>[34]</sup>

Nivolumab und Pembrolizumab zeigten beim rekurrenten oder metastasierten HNSCC eine Verbesserung des Gesamtüberlebens verglichen mit Standardchemotherapeutika in den Studien *CheckMate 141*<sup>[35]</sup> (single-agent Therapie mit Methotrexat, Docetaxel oder Cetuximab) und *KEYNOTE-048*<sup>[36]</sup> (Cetuximab mit Cisplatin/Carboplatin und 5-FU). Das Ansprechen der beiden Immuncheckpoint-Inhibitoren war besonders effektiv bei Tumoren die PD-L1 exprimierten. Bei einer Monotherapie mit Nivolumab und Pembrolizumab traten dabei im Vergleich zur Standardtherapie weniger unerwünschte Ereignisse auf.<sup>[35, 36]</sup>

Insgesamt steht die Therapie von HNSCC auf den drei Säulen operative Resektion, Radiatio und medikamentöse Verfahren. Gerade der Einsatz der Chemotherapeutika ist stark von Charakteristika der Tumorzellen, wie dem Transportstatus, abhängig. Darauf soll im Folgenden eingegangen werden.

## 1.3 *ABC-Transporter*

### 1.3.1 Grundlagen der ABC-Transporter

Tumorzellen haben verschiedene Möglichkeiten, Resistenzen gegenüber Zytostatika zu entwickeln. Neben einer erhöhten Reparaturrate der DNA und der Bildung von Tumorstammzellen stellt das Ausschleusen der zelltoxischen Zytostatika durch *ABC-Transporter* (*ATP-binding cassette*) eine der am häufigsten diskutierten Wege der Tumorresistenzbildung dar.<sup>[37, 38]</sup>

Diese Resistenzen können bereits vor Kontakt mit einem Medikament, also intrinsisch, oder im Verlauf der Therapie auftreten.<sup>[39]</sup> Dabei richten sich die Resistenzmechanismen meist nicht nur gegen ein Therapeutikum, sondern gegen verschiedene Gruppen. Aus diesem Grund werden diese Resistenzen als *Multidrug-Resistance* (MDR) bezeichnet.<sup>[40]</sup>

ABC-Transporter sind Proteine, die unter Verbrauch von Energie in Form von ATP Substrate durch die Zellmembran transportieren können. ABC-Transporter gehören zu einer der größten Superfamilien der membranständigen Proteine. Sie spielen, neben der Entstehung von Resistenzen, im ganzen Körper eine wichtige Rolle, beispielsweise bei Stoffwechselprozessen durch die Aufrechterhaltung von chemischen und elektrischen Konzentrationsgradienten oder dem Export von lipophilen Substraten. Das Spektrum der Substrate umfasst dabei nahezu jede Substanzklasse.<sup>[41, 42]</sup> Derzeit sind 49 humane ABC-Transporter bekannt, deren individuelle Funktionen jedoch noch nicht vollständig erfasst sind.<sup>[43, 44]</sup> Während in Eukaryoten ABC-Transporter lediglich als Exporter dienen, ist die zusätzliche Funktion als Importer nach heutigem Kenntnisstand auf Prokaryoten beschränkt.<sup>[45]</sup>

Der Zusammenhang von *Multidrug-Resistance* und ABC-Transportern wurde erstmals 1976 von R. L. Juliano und V. Ling an mutierten Zellen der Ovarien chinesischer Goldhamster festgestellt.<sup>[46]</sup> Sie entdeckten ein membranständiges Protein, das sie als P-Glykoprotein (P-gp) bezeichneten. Dieses Protein entspricht dem Transporter ABCB1.<sup>[47]</sup> Inzwischen wurden weitere ABC-Transporter identifiziert, die zu *Multidrug-Resistance* führen können.<sup>[38, 48, 49]</sup>

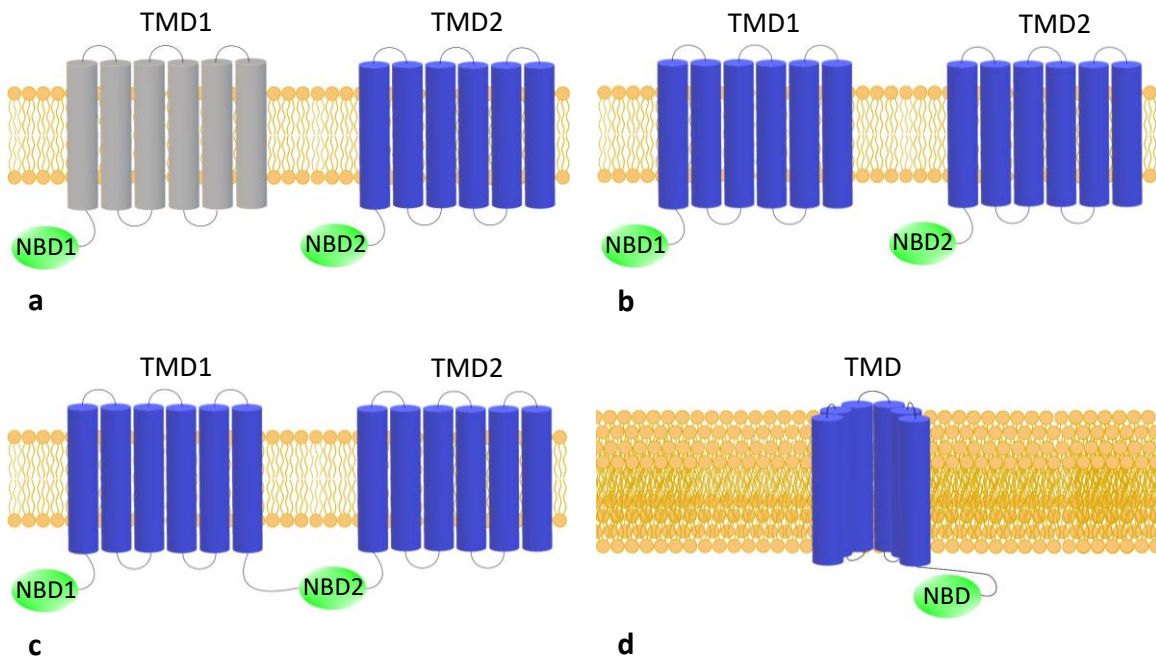
### 1.3.2 Struktur und Mechanismus der ABC-Transporter

Die ABC-Transporter werden entsprechend ihrer Übereinstimmungen in der Gensequenz und der Anordnung ihrer Domänen in sieben Subfamilien unterteilt.<sup>[43]</sup> Jeder der Transporter besteht aus mindestens zwei Transmembrandomänen (TMDs), die sich in der Lipidschicht der Zellmembran befinden, und zwei ins Zytoplasma ragenden Nukleotid-bindenden-Domänen, die auch ATP (nucleotide) binding cassettes genannt werden (NBD oder ABC).<sup>[50]</sup> Während die meisten dieser eukaryotischen Transporter aus nur einem Protein bestehen,<sup>[51]</sup> lagern sich einige aus zwei gleichen (Homodimer) oder verschiedenen (Heterodimer) Proteinen zusammen, die von je einem ABC-Gen codiert werden.<sup>[52]</sup> Abbildung 1 stellt den schematischen Aufbau dieser Transporter im Modell dar.

Die NBDs tragen fünf verschiedene Motive: Walker A (P-loop), Walker B, Q-Loop, H-Motiv und das ABC-signature-Motiv (LSGGQ). Durch Bindung und Hydrolyse von ATP erreichen sie über die Kopplung mit TMDs den Transport eines Substrats.<sup>[45, 53-55]</sup> Das Zentrum der TMDs bildet eine Kammer in der Membran, die als Transportkanal für das Substrat dient. Da die membranständigen Domänen im Vergleich zu den NBDs deutlich weniger konserviert sind, zeigen die TMDs eine größere Heterogenität, welche sich durch deren verschiedenen Längen und die Anzahl ihrer Segmente auszeichnet.<sup>[51, 56]</sup>

Jede TMD besitzt zwischen sechs und zehn  $\alpha$ -Helices. Durch das Aneinanderlagern der  $\alpha$ -Helices zweier TMDs bildet sich der Transportkanal eines ABC-Transporters. Dieser Kanal ist bei Eukaryoten nur von der Seite des Zytoplasmas her zugänglich.<sup>[56, 57]</sup> Zwischen den Loops der TMDs, die die  $\alpha$ -Helices miteinander verbinden, befinden sich kleinere Motive, die als regulatorische Untereinheiten der Transportfunktion fungieren.<sup>[45]</sup>

Bindet ein Substrat eines Transporters in die zentrale Bindungstasche der TMDs auf der inneren Membranseite, steigt dadurch, dank einer Konformationsänderung, die Affinität der NBDs für ATP an.<sup>[58]</sup> Schon geringfügige Mutationen der  $\alpha$  alpha-Helices können die Affinität der Substrate zur Bindungsstelle stark beeinflussen. Als Folge kann es zu Funktionsverlust, zu gesteigerter oder verringerter Affinität von Substraten kommen.<sup>[59]</sup>



**Abbildung 1: Modelle verschiedener ABC-Transporter Typen**

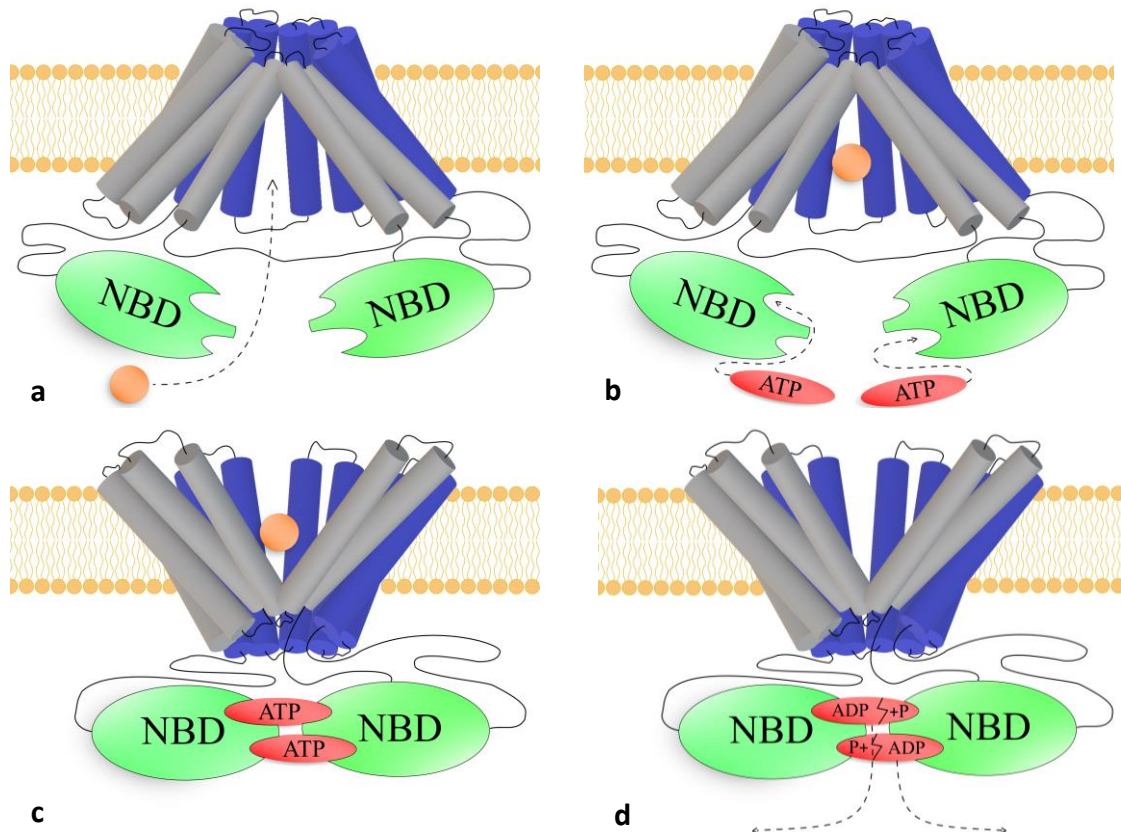
Die in diesem Schema aus sechs  $\alpha$ -Helices (grau und blau) aufgebauten TMDs durchspannen die Lipidmembran (orange). Auf der zytosolischen Seite der Membran befinden sich die NBDs, die die Walker A, Walker B, ABC-signature Motiv, H-Motiv sowie den Q-Loop tragen. (a) Heterodimerer Transporter, der sich aus zwei verschiedenen Membranproteinen zusammensetzt (bspw. TAP1 und TAP2). (b) Homodimerer Transporter, der aus zwei gleichen Membranproteinen besteht (bspw. ABCG2). (c) Transporter aus einem Protein, die TMDs sind über die NBDs miteinander verbunden (bspw. ABCB1). (d) Dreidimensionaler Schnitt durch einen ABC-Transporter. Die TMDs bilden einen Kanal für transporterspezifische Substrate. Die schematische Abbildung wurde neu konzipiert auf Grundlage von Jones *et al.*<sup>[50]</sup>

Das Walker A-Motiv der NBDs bindet den Adenosinanteil des ATPs. Dabei bilden Lysinreste des Motivs Wasserstoffbrückenbindungen mit dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des ATPs. Die Koordination der Phosphate in der Bindungstasche wird durch das LSGGQ-Motiv des zweiten NBDs über einen Serinrest am  $\gamma$ -Phosphat des ATPs sowie über  $Mg^{2+}$  verursacht. Da diese Motive in beiden NBDs vorhanden sind, kommt es durch die Bindung von zwei ATP-Molekülen zu einer Dimerisierung der NBDs.<sup>[45]</sup>

Das Walker B-Motiv ist zusammen mit dem Q-Loop und H-Motiv in der Lage, das  $\gamma$ -Phosphat des ATPs zu stabilisieren und so die Hydrolyse des ATPs durch ein  $H_2O$  Molekül zu katalysieren.<sup>[60]</sup> Q-Loop und Verbindungshelices der TMDs sorgen hierbei für die Übertragung der strukturellen Änderung von NBDs auf TMDs.<sup>[61]</sup> Die Dimerisierung der NBDs und die Hydrolyse des ATPs führt zur Konformationsänderung der TMDs und die Bindungsstelle mit dem

Substrat wird dem Extrazellulärraum exponiert.<sup>[62]</sup> Neben der Exposition wird durch das Umklappen der TMDs außerdem die Affinität des Substrats zur Bindungstasche verringert, wodurch das Diffundieren des Substrats erleichtert und der Efflux sichergestellt wird. Die Affinität ist also direkt abhängig von der Konformation des Transporters.<sup>[55]</sup> Die Abbildung 2 zeigt ein vereinfachtes Modell dieses Vorgangs.

Da die Motive der NBDs stark konserviert vorliegen, lassen sich die verschiedenen Transporter und deren Substrate durch ihre variablen Sequenzen der TMDs erklären. Abhängig von der Zusammensetzung der Membran-durchspannenden  $\alpha$ -Helices binden Substrate mit verschiedenen Eigenschaften in die Bindungstasche der Transporter.<sup>[63]</sup>



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des ABC-Transporter-Mechanismus**

Bindung des Substrats in die Bindungstasche der TMDs (a). Dadurch kommt es zur erhöhten Affinität der NBDs zu ATP (b). Die Bildung eines Dimers aus den NBDs verursacht eine Konformationsänderung der TMDs (c). Das Substrat diffundiert in den Extrazellulärraum. Durch die Hydrolyse des ATP kommt es zur Rückführung des Transporters in den Ausgangszustand (d). Die schematische Abbildung wurde neu konzipiert auf Grundlage von van Veen *et al.*<sup>[62]</sup>

### 1.3.3 Funktion von ABC-Transportern in Tumoren

Neben dem Transport vieler anderer Substanzen transportieren ABC-Transporter Zytostatika wie 5-FU und Cisplatin. So wurde eine hohe Korrelation zwischen der Chemoresistenz verschiedener Tumorgewebe und der Expression von ABC-Transportern festgestellt. Durch den erhöhten Efflux der Medikamente wird dabei die intrazelluläre Konzentration der Substrate gering gehalten. Dabei stehen die meisten Resistenzen im Zusammenhang mit ABCB1, der ABCC-Transporterfamilie und ABCG2.<sup>[64, 65]</sup>

Die meisten ABC-Transporter mit einer Transportfunktion für Zytostatika sind dazu in der Lage, mehrere chemisch nicht verwandte Medikamente aus der Zelle zu schleusen.<sup>[66]</sup> Durch eine erhöhte Expression von ABC-Transporter können viele Tumorgewebe, die zunächst sensitiv auf ein Chemotherapeutikum reagieren, Resistenzen gegen dieses und andere Therapeutika entwickeln. Aus diesem Grund werden sie auch als *Multidrug-Resistance* (MDR) Transporter bezeichnet.<sup>[67]</sup> Die Expression dieser Transporter in Tumorzellen hängt einerseits von dem ursprünglichen Gewebe ab, andererseits von den angewendeten Chemotherapeutika. Dabei exprimieren Tumorzellen deutlich mehr ABC-Transporter als das gesunde Gewebe, aus dem sie hervorgegangen sind.<sup>[68]</sup>

So zeigte sich in verschiedenen Studien, dass die ABC-Transporter ABCC2<sup>[66, 69, 70]</sup> und ABCC5<sup>[71]</sup> das oft verwendete Zytostatikum Cisplatin und seine Derivate aus der Zelle ausschleusen können. Weitere Vertreter dieser Transporterfamilie, ABCC1<sup>[72]</sup>, ABCC3<sup>[66, 70]</sup> und ABCC4<sup>[66, 70]</sup>, zeigten in platinresistenten Tumorzellen erhöhte Expressionswerte und werden kontrovers als Transporter für Platinverbindungen diskutiert. Für Metabolite von 5-FU werden Resistenzen durch die Transporter ABCC5 und ABCC11 vermittelt.<sup>[73-76]</sup> Im Gegensatz dazu ist ABCB4 in Cisplatin-<sup>[77]</sup> und 5-FU-resistenten Tumoren sehr schwach exprimiert<sup>[78]</sup>. Auch ist eine erhöhte Proliferation verschiedener Tumorgewebe mit Gen-silencing von ABCB4 verbunden.<sup>[79]</sup>

Weitere ABC-Transporter stehen im Verdacht Cisplatin oder 5-FU zu transportieren. Die Studienlage dazu ist jedoch sehr umstritten. Zu diesen Transportern gehören Transporter aus der ABCA- und ABCB-Familie.<sup>[80, 81]</sup>

Neben diesen Transportern werden von vielen resistenten Tumorzellen auch solche ABC-Transporter stark exprimiert, die weder eine Transportfunktion für das verwendete Zytostatikum noch eines seiner Metabolite besitzen. Obwohl diese Transporter das Medikament nicht aus der Zelle entfernen, zeigt sich eine Korrelation zwischen ihrer Expression und Chemoresistenz. Stornach *et al.*<sup>[82]</sup> zeigten bei Cisplatin-resistenten Ovarialzellkarzinomzellen einen deutlichen Anstieg der Expression von TAP1 (ABCB2), die durch TAP1 siRNA nicht resensitivierbar waren. Der TAP-Transporter (*transporter associated with antigen processing*) ist ein Heterodimer aus den Halbtransportern TAP1 und TAP2 (ABCB3), dessen eigentliche Funktion der Transport von Proteinen ins endoplasmatische Retikulum zur Antigenpräsentation ist.<sup>[83]</sup> Auch der Halbtransporter TAP2 wurde mit platinresistenten Tumoren in Verbindung gebracht.<sup>[84]</sup> So fanden Auner *et al.*<sup>[85]</sup> neben den Cisplatin-Transportern ABCC1, ABCC2 und ABCC3 eine erhöhte Expression von ABCB3 bei rekurrenten Ovarialkarzinomen. Auch in Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs wurden in Cisplatin-resistenten Zellen stark exprimierte ABC-Transporter gefunden, die das Medikament nicht als Substrat transportieren. Zungenkarzinome mit einer Überexpression von ABCG2 zeigten sowohl eine vermehrte Tendenz zur Migration und Invasivität als auch eine verringerte Sensitivität gegenüber Cisplatin.<sup>[86]</sup>

Zudem wurden die beiden Transporter ABCB1 und ABCG2 als Tumormarker für Tumorstammzellen in oralen Plattenepithelkarzinomen identifiziert. Tumorstammzellen besitzen unter anderem eine geringe Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika, ein hohes Proliferationspotential und die Fähigkeit zur Bildung von Metastasen.<sup>[87]</sup> Yanamoto *et al.* zeigten, dass Patienten mit rekurrenten Zungentumoren, die zuvor eine platinbasierte neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten, vermehrt Tumorstammzellmarker wie ABCG2 und CD44v6 exprimierten. Diese Patienten hatten zudem invasivere Karzinome und eine schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate, als Patienten deren Tumoren diese Proteine nicht exprimierten.<sup>[88]</sup>

In einer größeren Studie über Resistenzentwicklungen bei HNSCC-Zelllinien von Theile *et al.*<sup>[89]</sup> zeigten sich bei mit Cisplatin inkubierten Zellen starke Expressionen der

ABCC-Transporterfamilie und den Transportern TAP1 und TAP2. Während die Resistenz der etablierten Tumorzellen in dieser Studie konstant blieb, zeigte sich eine Abnahme der Expression von ABC-Transportern mit der Dauer der Inkubation. In Tabelle 1 sind die hier angeführten ABC-Transporter aufgelistet. Die Tabelle umfasst weitere Zytostatika und Tumorgewebe.

**Tabelle 1:** Auswahl von ABC-Transportern mit Bezug zu MDR in Tumoren

<b>ABC-Transporter</b>	<b>MDR</b>	<b>Tumorgewebe</b>	<b>Ref.</b>
<b>ABCB1</b>	Doxorubicin, Paclitaxel, Methotrexat, Vincaalkaloide	Colon, Niere, Leber, Mamma	[48, 66, 67, 70]
<b>ABCB2/TAP1</b>	Cisplatin, Doxorubicin	Ovar, HNSCC	[66, 89]
<b>ABCB3/TAP2</b>	Cisplatin, Doxorubicin	Ovar, HNSCC	[85, 89]
<b>ABCB4</b>	Paclitaxel, Vincaalkaloide; Cisplatin und 5-FU (schwach exprimiert)	Leber; Ovar und kolorektales CA (schwach exprimiert)	[48, 66, 77, 78]
<b>ABCB11</b>	Paclitaxel	Leber	[48, 67]
<b>ABCC1</b>	Paclitaxel, Vincaalkaloide, Cisplatin	Ovarialzellen, NSLC, Ösophagus	[67, 72, 85]
<b>ABCC2</b>	Cisplatin, Methotrexat, Vincaalkaloide	Ovar, Lunge, Pankreas, Leber	[66, 70, 85]
<b>ABCC3</b>	Cisplatin	Ovar, Lunge, Pankreas, GIT	[66, 67, 70, 85]
<b>ABCC4</b>	Cisplatin, Methotrexat, Vincaalkaloide	Ovar, Lunge, Prostata, Pankreas	[48, 66]
<b>ABCC5</b>	Cisplatin, Methotrexat, 5-FU, Doxorubicin	NSCLC, Mamma, GIT	[70, 71, 74-76]
<b>ABCG2</b>	Cisplatin, Doxorubicin, Topotecan	Mamma, Leber, GIT, HNSCC	[89]



## 1.4 Ziele der Arbeit

Trotz der verschiedenen Therapieansätze liegt die 5-Jahres-Überlebensrate des HNSCC bei nur knapp über 50 %. So zeigt auch die Therapie mit Chemotherapeutika durch Bildung von Resistenzen zeitlich begrenzte Effekte. Einer der Hauptfaktoren für die Entwicklung von Chemoresistenzen stellt dabei die Überexpression von ABC-Transportern dar, die als Angriffspunkt für eine effektivere Behandlung genutzt werden könnten. Für einen chemotherapeutischen Behandlungserfolg sind daher im Allgemeinen Kenntnisse über spezifische Mechanismen und Vorgänge der Resistenzbildung nötig.

Das Ziel dieser Arbeit war die *in vitro* Untersuchung der Resistenzbildung von Zellen des Mundhöhlenkarzinoms und der Rolle, die die ABC-Transporter dabei spielen. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit an den fünf Zelllinien des HNSCC folgende Fragen geklärt werden:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Resistenzentwicklung der Tumorzelllinien und der verwendeten Cisplatinosis oder der Länge der Inkubationszeit?

Die Studie soll die Veränderung der Viabilität durch eine Inkubation mit Cisplatin erfassen.

2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Resistenz der einzelnen Tumorzelllinien und der Expressionsstärke der 12 ausgewählten ABC-Transporter?<sup>[48]</sup>

Ebenfalls soll untersucht werden, ob ABC-Transporter mit bekannter MDR-Funktion zu der Resistenz gegenüber Cisplatin beitragen.

3. Wie verändert sich die Expressionsstärke der ABC-Transporter nach längerer Inkubation mit Cisplatin, wenn dem Medium kein Cisplatin mehr zugesetzt wird?

Dabei soll geprüft werden, ob die Veränderung der Expression nach Ende der Inkubation reversibel ist, oder ob diese Veränderung anhält.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 *Material*

#### 2.1.1 Zelllinien

In Tabelle 2 sind die adhärenente Zellkulturen der fünf verschiedenen Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich aufgeführt, die für die Experimente verwendet wurden.<sup>[90, 91]</sup>

**Tabelle 2:** Tabellarische Auflistung der verwendeten Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Entnahmestelle</b>	<b>Geschlecht des Patienten</b>	<b>TNM</b>	<b>Grading</b>
<b>PCI-1</b>	Rezidiv eines Larynxkarzinoms	männlich	pT2N0M0	G2
<b>PCI-9</b>	Primärkarzinom vom Zungenboden	männlich	pT4N3M0	G2
<b>PCI-13</b>	Primärkarzinom vom Trigonum retromolare	männlich	pT4pN1M0	G3
<b>PCI-52</b>	Primärkarzinom der Plica aryepiglottica	männlich	pT1N2M0	G2
<b>PCI-68</b>	Primärkarzinom der Zunge	männlich	pT4N0M0	G1

### 2.1.2 Primer Assays

Die in Tabelle 3 aufgelisteten Primer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) wurden für die Amplifikation im Rahmen der PCR verwendet.

**Tabelle 3:** Tabellarische Auflistung der verwendeten Primer

<b>Gen</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Assay Name</b>	<b>Kat. Nr.</b>
<b>ABCG2</b>	9429	Hs_ABCG2_1_SG	QT00073206
<b>ABCC5</b>	10057	Hs_ABCC5_1_SG	QT00049959
<b>ABCC4</b>	10257	Hs_ABCC4_1_SG	QT00077266
<b>ABCC3</b>	8714	Hs_ABCC3_1_SG	QT00070602
<b>ABCC2</b>	1244	Hs_ABCC2_1_SG	QT00056294
<b>ABCC1</b>	4363	Hs_ABCC1_1_SG	QT00061159
<b>ABCB11</b>	8647	Hs_ABCB11_1_SG	QT00035049
<b>ABCB4</b>	5244	Hs_ABCB4_1_SG	QT00043673
<b>TAP2/ABCB3</b>	6891	Hs_TAP2_1_SG	QT00199710
<b>TAP1/ABCB2</b>	6890	Hs_TAP1_1_SG	QT00057288
<b>ABCB1</b>	5243	Hs_ABCB1_1_SG	QT00081928
<b>ABCA2</b>	20	Hs_ABCA2_1_SG	QT00220206
<b>ACTB</b>	60	Hs_ACTB_2_SG	QT01680476

### 2.1.3 Medien, Chemikalien und Zusätze

In Tabelle 4 sind die weiteren Medien, Chemikalien und Zusätze aufgelistet, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 4:** Tabellarische Auflistung der verwendeten Medien, Chemikalien und Zusätze

<b>Medium/Zusatz</b>	<b>Kat.Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM LOW)	31885-023	Life technologies
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	14190-094	Life technologies
Fetal Bovine Serum (FBS)	10270-106	Life technologies
L-Glutamin (200 mM)	K0282	Biochrom AG
Pen Strep (10 Einheiten/ $\mu$ l Penicillin & 10 $\mu$ g/ $\mu$ l Streptomycin)	15140-122	Life technologies
Trypsin/EDTA (0,5 %/0,2 %)	L2153	Biochrom AG
Cisplatin (1 mg/ml)	PZN: 00370955	Accord
Ethanol (99,8 %)	16368	Sigma Aldrich
Kristallviolett	T123.1	Carl Roth GmbH
Methanol (99,8 %)	34860	Sigma Aldrich
QuantiTect Reverse Transcription Kit	205313	QIAGEN
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	204145	QIAGEN
RNAeasy Kit (250)	74106	QIAGEN

## 2.1.4 Materialien und Instrumente

Die Tabelle 5 listet die Materialien und Instrumente dieser Arbeit auf.

**Tabelle 5:** Tabellarische Auflistung der verwendeten Materialien und Instrumente

<b>Instrument</b>	<b>Kat.Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
6-Well-Platte Cell Culture Treated Multidishes	140675	Thermo Scientific Nunc™
96-Well-Platte MicroWell™ Plates	167008	Thermo Scientific Nunc™
Absaugsystem - AA 04	981323001	DITABIS
Einkanalpipette Eppendorf Research® plus 0.5 - 10 µL	3120000020	Eppendorf AG
Einkanalpipette Eppendorf Research® plus 10 - 100 µL	3120000046	Eppendorf AG
Einkanalpipette Eppendorf Research® plus 20 - 200 µL	3120000054	Eppendorf AG
Einkanalpipette Eppendorf Research® plus 100 - 1000 µL	3120000062	Eppendorf AG
Einwegspritzen (2 ml)	PZN: 3626800	BD DISCARDIT II
Elektrische Pipette accu-jet® pro Pipettierhelfer	26300	BRAND
Inkubator - Heracell™	51021200	Thermo Scientific
Kanülen (25 G 0,5x25 mm)	PZN: 3086982	BD MICROLANCE
Mehrkanalpipette, 8-Kanal Eppendorf Research® plus 10 - 100 µl	3122000035	Eppendorf AG
Mehrkanalpipette, 8-Kanal Eppendorf Research® plus 30 - 300 µl	3122000051	Eppendorf AG
PCR-Cycler	1855196	BIO RAD

CFX96™ optical reaction module		
PCR-Platten Multiplate™ 96-Well Unskirted PCR Plates, Low-Profile	MLL9601	BIO RAD
Pipettenspitzen Eppendorf Quality™, 0,1 – 10 µL	0030000811	Eppendorf AG
Pipettenspitzen Eppendorf Quality™, 20 – 300 µL	0030000897	Eppendorf AG
Pipettenspitzen Eppendorf Quality™, 50 – 1,000 µL	0030000919	Eppendorf AG
Plate Reader - Infinite® F50		Tecan
Reaktionsgefäße (Eppis) Safe-Lock Tubes, 1,5 mL	0030120086	Eppendorf
Schutzfolie für PCR-Platten	MSB1001	BIO RAD
Sicherheitswerkbank Klasse II	51026640	Thermo Scientific
Spectrophotometer - NanoDrop 2000c	ND-2000C	Thermo Scientific
Thermo Shaker - TS-100	BS-010120-AAI	BIOSAN
Wasserbad GFL1083	1083	GFL GmbH
Zellkulturflaschen Nunc EasyFlask 75cm <sup>2</sup>	156499	Thermo Scientific Nunc™
Zellschaber	90020	SPL life science
Zellzähler - Casy TT	2501126A	OMNI Life Science
Zentrifuge Typ 320R		Eppendorf AG
Zentrifuge Typ 5415R		Eppendorf AG

## 2.2 Methoden

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen, für die sterile Bedingungen herrschen mussten (wie das Aussäen, Splitten oder Inkubieren), wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Firma Thermo Scientific durchgeführt.

### 2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden alle mit dem Medium DMEM LOW, dem 10 % FBS, 1 % Pen/Strep sowie 2 mmol/l Glutamin zugefügt wurde, kultiviert (das Medium wird im Folgenden als DMEM LOW bezeichnet).

Das Splitten erfolgte bei den unbehandelten Zellen je nach Zelldichte der Suspension im Verhältnis zwischen 1:2 und 1:10. Dabei wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS LOW gespült und anschließend nach dem Absaugen des PBS mit 3 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Die Inkubation erfolgte bis zur vollständigen Ablösung im Brutschrank bei 37 °C und 5 Vol.-% CO<sub>2</sub>. Nach dem Ablösen der Zellen wurde zu dem Trypsin 7 ml DMEM LOW gegeben und der Inhalt der Zellkulturflasche mit einer Pipette zu einer homogenen Suspension vermischt. Zu dem Zellkulturgemisch in der Zellkulturflasche wurden je 25 ml DMEM LOW gegeben. Mit dem Überschuss wurden 10 µl Zellsuspension auf 10 ml Isoton pipettiert und mit dem Zellzähler CASEY die Zellzahl bestimmt.

### 2.2.2 Inkubation mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen

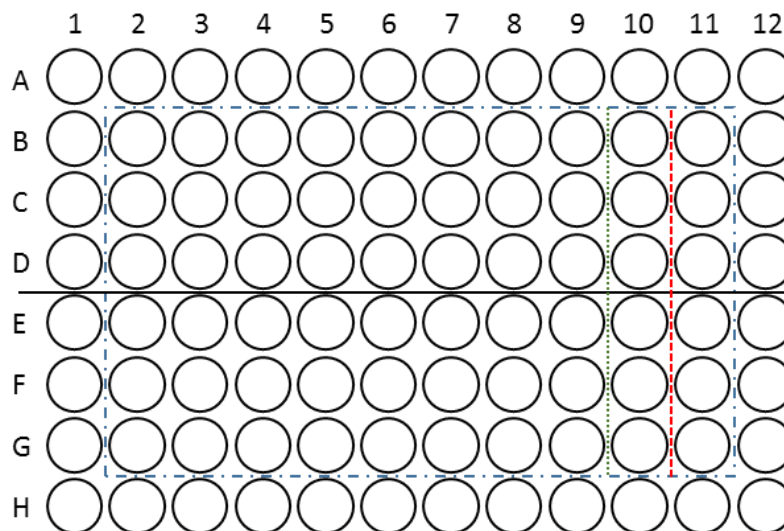
Aus Vorexperimenten hatte die Arbeitsgruppe durch Interpolation die inhibitorischen Konzentrationen (inhibitory concentration – IC) Cisplatins bestimmt, für die bei der jeweiligen Zelllinie 5 % (IC<sub>5</sub>) beziehungsweise 20 % (IC<sub>20</sub>) der adhären Ten Tumorzellen durch Zelltod untergehen.

Dem DMEM LOW der fünf verwendeten HNSCC-Zelllinien wurde in verschiedenen Ansätzen die IC5 beziehungsweise die IC20 von Cisplatin zugegeben und über 24 Stunden, 48 Stunden oder vier Wochen inkubiert.

### 2.2.3 Zytotoxizitäts-Assay

Pro Well der für die Zytotoxizitäts-Assay verwendeten 96-Well-Platten wurden 100  $\mu$ l einer Zellsuspension mit je 10.000 Zellen pipettiert (Pipettierschema in Abbildung 3).

Die Platten wurden 24 h im Brutschrank inkubiert und das Medium anschließend abgesaugt um eine log 2-Verdünnungsreihe ausgehend von 200  $\mu$ M Cisplatin anzulegen.



**Abbildung 3: Schema der Zytotoxizitäts-Assays auf einer 96-Well-Platte**

Die äußeren Wells blieben frei. In Zeile B bis D wurden die vorher präinkubierten Zellen (IC5 oder IC20) pipettiert, in Zeile E bis G die nicht präinkubierte Zellen derselben Zelllinie. Beginnend bei Spalte 2 mit 200  $\mu$ M bis Spalte 9 mit 1,5625  $\mu$ M ( $\approx$ 1,6  $\mu$ M) ist hier die verwendete log 2-Verdünnungsreihe mit blauer Umrandung bis zur grünen gepunkteten Linie dargestellt. Spalte 10 enthielt kein Zytostatikum. Spalte 11 repräsentierte die Totkontrolle mit 1 M Salzsäurelösung.

Die Inkubation der Platten erfolgte über 72 h im Brutschrank. Nach Verwerfen der Flüssigkeit wurde je Well 50  $\mu$ l Kristallviolett-Lösung zugegeben und die Zellen nach 12 min anschließend mit vollentsalztem Wasser mehrmals gewaschen, bis das Waschwasser keine Färbung mehr zeigte. Die Platten wurden über Nacht getrocknet und zur Auswertung 50  $\mu$ l Methanol in jedes Well pipettiert um die optische Dichte mit einem ELISA Plate Reader der



Firma Tecan bei 595 nm bestimmt. Der Farbstoff färbte nur intakte und vitale Zellen wasserunlöslich an, weshalb die optische Dichte der Lösung nach dem Waschen der Assays mit der relativen Anzahl der verbliebenen Tumorzellen korrelierte.

Das Experiment wurde dreimal wiederholt (ausgenommen der 24 h und 48 h Versuche mit IC5). In dieser Arbeit war Cisplatin das einzige verwendete Zytostatikum, weshalb die verschiedenen Cisplatinkonzentrationen im Weiteren nur als IC5 und IC20 bezeichnet werden.

#### 2.2.4 RNA-Isolation

Die RNA Isolation der selektionierten und nicht selektionierten Zellen erfolgte mit dem RNAeasy Kit der Firma QIAGEN, um die isolierte RNA wie in den folgenden Schritten beschrieben auf Veränderungen der Expression der ABC-Transporter zu untersuchen.

Die Zellsuspension wurde bei 14000 rpm (*rounds per minute*) für 7 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 350 µl RLT Puffer zu jedem Zellpellet gegeben und anschließend suspendiert. Hierzu kamen 350 µl 70 % Ethanol. Die Suspension wurde auf die Silikatsäule gegeben und 30 s zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.

Dem Pipettieren von 700 µl RW1 Puffer auf die Säule folgte eine Zentrifugation von 30 s. Der Inhalt der Reaktionsgefäße wurde erneut verworfen und anschließend 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 30 s und ein Verwerfen des Durchlaufs.

Erneut wurden 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und 2 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.

Nach dem Transfer in ein neues Reaktionsgefäß wurden 25 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und anschließend 1 min zentrifugiert.

Die Messung der RNA Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop Gerät. Die Lagertemperatur für die RNA-Lösung betrug -20 °C.

### 2.2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). 1 µg Gesamt-RNA wurde in 12 µl RNase freiem Wasser gelöst. Anschließend wurden 2 µl Wipe out zu dem Ansatz pipettiert und dieser für 2 min mit dem Thermo Shaker der Firma BIOSAN bei 42 °C inkubiert. In das Reaktionsgefäß wurden 1 µl Reverse Transkriptase, 1 µl RT PrimerMix und 4 µl RT Buffer 5x pipettiert. Es folgte eine Inkubation der Lösung für 15 min bei 42 °C. Das Erhitzen des Reaktionsgefäßes im Wasserbad für 3 min bei 96 °C stoppte anschließend die Reverse Transkription. Die cDNA-Lösung wurde für 15 s mit 5 000 rpm zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Für die semi-quantitative real-time PCR (qRT-PCR) wurden PCR-Platten (BioRad) und das SYBR Green PCR Kit der Firma QIAGEN verwendet.

Pro Well wurde ein PCR-Ansatz von 25 µl, bestehend aus 11,5 µL cDNA-Lösung, 12,5 µl SYBR Green Master Mix und 2 µl eines spezifischen ABC-Transporter-Primers (Tabelle 3) hergestellt. Um Fehler und Verfälschungen der Ct-Werte möglichst zu vermeiden, wurden alle Proben in Dubletts pipettiert und analysiert. Die qRT-PCR erfolgte mit dem PCR-Cycler der Firma BioRad unter folgenden Einstellungen:

Hitzeaktivierung: 95 °C (15 min)

**40 Zyklen** mit jeweils

Denaturierung: 94 °C (15 s)

Annealing: 54 °C (30 s)

Extension: 72 °C (30 s)

Die relative Expression der untersuchten Transporter wurde als Prozentwert des *housekeeping* Gens  $\beta$ -Aktin angegeben. Anschließend wurde die relative mRNA-Expression der mit Cisplatin selektionierten Zellen mit nicht selektionierten Zellen der gleichen Zelllinie verglichen und die Expressionsänderung mit der folgenden Formel berechnet:

Transporterexpression in Prozent: 
$$x = 2^{(Ct[Standard]-Ct[Probe])} \cdot 100$$

Transporterexpression der selektionierten im Verhältnis zu den nicht selektionierten Zellen (nach  $\Delta\Delta Ct$ ):

$$y = \frac{\bar{x}^{Präinkubiert}}{\bar{x}^{Kontrolle}}$$

Der Expressionsunterschied des Zielgens zwischen präinkubierten Zellen und Kontrollzellen wurde als Vielfaches (x-Fold) dargestellt. Als überexprimiert wurden solche Transporter angenommen, die dabei einen x-Fold  $\geq 2$  zeigten. Zur Darstellung der Expression erfolgte eine Transformation des Expressionsunterschieds mit der Kubikwurzel.

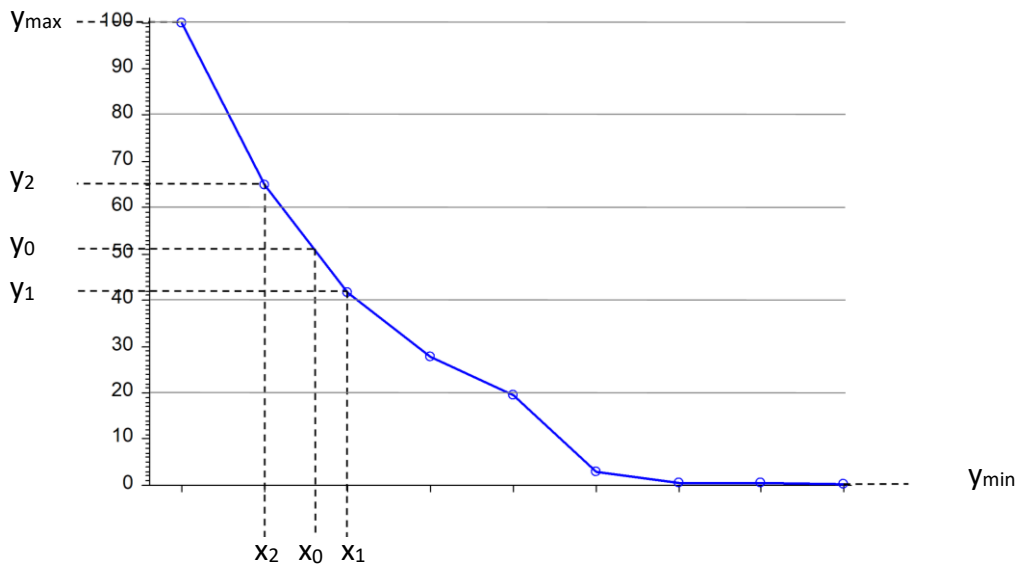
### 2.3 Statistische Methoden

Alle Experimente wurden mindestens mit zwei Wiederholungen durchgeführt. Bei den Kristallviolett-Assays gab es pro Experiment drei Wiederholungen, bis auf die mit IC5 24 Die Expressionsanalysen wurden ebenfalls mit Doppelwerten angegeben. Aus diesen wurden die Mittelwerte gebildet und der mittlere Fehler des Mittelwerts (SEM) über die Standardabweichung (SD) berechnet, siehe folgende Gleichungen:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \qquad SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Die Ermittlung der IC50-Werte wurde mit Hilfe der statistischen Analysesoftware R 3.4.2<sup>®</sup> sowie mathematisch mit MEDAS<sup>®</sup> berechnet. Die Chemosensitivität der HNSCC-Zelllinien gegenüber einer zytotoxischen Substanz wie Cisplatin kann durch die Bestimmung der IC50-Werte quantifiziert werden. Da der IC50-Wert der Wirkstoffkonzentration entspricht, der die Zellpopulation auf die Hälfte ihres Ausgangswertes reduziert, wird dieser oft verwendet, um zytotoxische Potentiale zu vergleichen. Die Veränderung der Chemosensitivität nach Cisplatininkubation lässt sich anhand der Differenz zwischen den IC50-Werten selektionierter und nicht selektionierter Tumorzellen untersuchen.

Dazu wurde der Mittelwert der Untergrenze (minimale relative Zellzahl) und der Obergrenze (maximale relative Zellzahl) als halbmaximale Zellreduktion festgelegt (hier  $y_0$ ). Die Koordinatenpaare des nächsthöheren Messpunkts wurden als  $y_2$  und  $x_2$ , die des nächstniedrigeren Messpunkts wurden als  $y_1$  und  $x_1$  definiert. Die Abbildung 4 stellt dies schematisch am Beispiel der PCI-13 dar.



**Abbildung 4: Graphische Darstellung zur Bestimmung der IC50 am Beispiel von PCI-13**  
 Dargestellt ist ein Zytotoxizitäts-Assay der Zelllinie PCI-13 mit einer Verdünnungsreihe beginnend mit 200  $\mu$ M.

Durch Logarithmieren der Dosen (x-Werte) und linearer Interpolation wurde die Dosis der IC50 ermittelt. Die Dosis  $x_0$ , die der IC50 entspricht, lässt sich durch folgende Gleichung berechnen:

$$x_0 = \log x_2 - (\log x_2 - \log x_1) \times \frac{(y_0 - y_2)}{(y_1 - y_2)}$$

Zur Bestimmung der Signifikanzniveaus der IC50 wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben mit SPSS-Statistics® 26.0 durchgeführt, mit Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

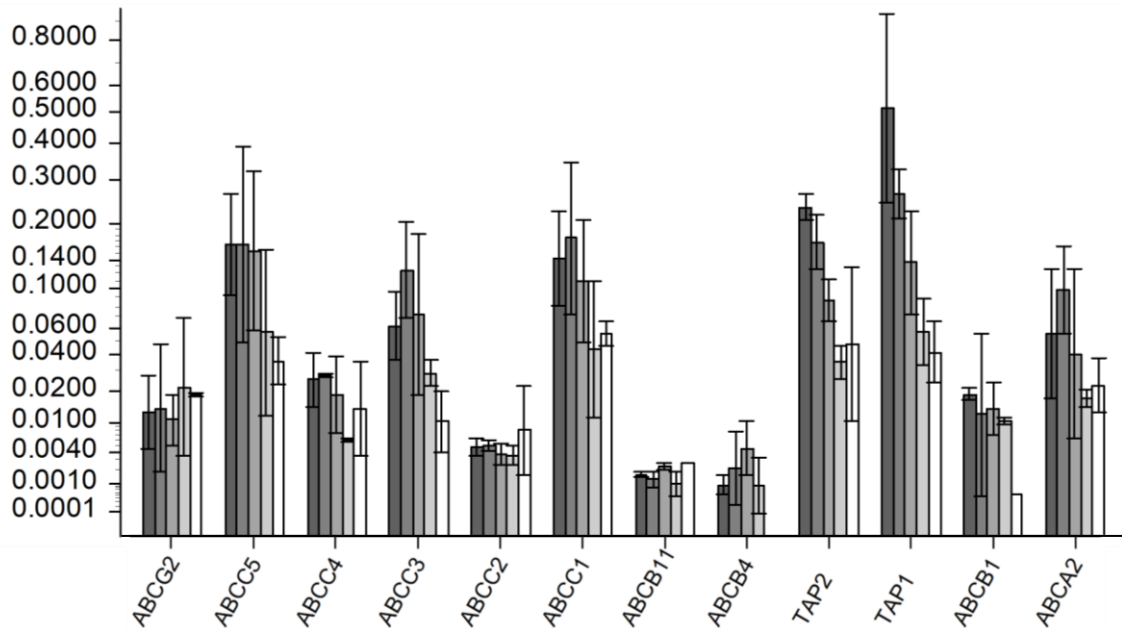
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expressionsanalyse der nicht selektierten Zellen

Um festzustellen, welchen Einfluss ABC-Transporter auf die Resistenzentwicklung der fünf verwendeten Zelllinien haben, musste zunächst in Vorversuchen ermittelt werden, ob ABC-Transporter von diesen Zellen exprimiert wurden. Dazu wurde die Expression von 12 ABC-Transportern (ABCA2, ABCB1, TAP1, TAP2, ABCB4, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCG2), die im Kontext Cisplatinresistenz eine Rolle spielen,<sup>[48]</sup> mit qRT-PCR bei Cisplatin naiven Zellen ermittelt. In Abbildung 5 ist die relative Expression der Transporter zu  $\beta$ -Aktin dargestellt.

Die Transporter ABCB11 und ABCB4 befanden sich in der Analyse an der Nachweisgrenze. In PCI-68 konnte ABCB4 nicht nachgewiesen werden. Die höchsten Expressionswerte ergaben sich für TAP1 ( $0,5912 \pm 0,3459$  für PCI-1,  $0,1490 \pm 0,00768$  für PCI-13,  $0,2688 \pm 0,0575$  für PCI-9,  $0,0613 \pm 0,0277$  für PCI-52 und  $0,0446 \pm 0,0203$  für PCI-68) und TAP2 ( $0,2357 \pm 0,0289$  für PCI-1,  $0,0885 \pm 0,0232$  für PCI-13,  $0,1715 \pm 0,0466$  für PCI-9,  $0,0358 \pm 0,0101$  für PCI-52 und  $0,0698 \pm 0,0594$  für PCI-68). Von der ABCC-Transporterfamilie waren ABCC5 (im Bereich zwischen  $0,2181 \pm 0,1699$  für PCI-9 und  $0,0375 \pm 0,0144$  für PCI-68) und ABCC1 (im Bereich zwischen  $0,2087 \pm 0,1360$  für PCI-9 und  $0,0558 \pm 0,0100$  für PCI-68) am stärksten in den Zelllinien exprimiert. Der MDR1-Transporter ABCB1 zeigte in allen Zelllinien eher mäßige Expressionswerte ( $0,0192 \pm 0,0026$  für PCI-1,  $0,0157 \pm 0,0087$  für PCI-13,  $0,0276 \pm 0,0271$  für PCI-9,  $0,0055 \pm 0,0055$  für PCI-52 und  $0,0005 \pm 0,0005$  für PCI-68).

**Abbildung 5: Expressionsanalyse der 12 ABC-Transporter mit qRT-PCR**



Die relative Expression der relativen Expression der Transporter zu  $\beta$ -Aktin für die Zelllinien ■ = PCI-1, ■ = PCI-9, ■ = PCI-13, ■ = PCI-52, □ = PCI-68 ist mit  $n = 2$  pro Säule auf der x-Achse aufgetragen. Die Mittelwerte sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben.

### 3.2 Analyse der Cisplatinsensitivität in Zelllinien des HNSCC

Die *in vitro* Behandlung mit Cisplatin zeigt eine Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit, wobei die zytotoxische Wirkung Cisplatins von wachstumshemmenden bis zu zytoziden Effekten reicht.<sup>[25]</sup> Auch zwischen verschiedenen Tumoren sind unterschiedlich starke Wirkungen gleicher Konzentrationen sowie deutliche Divergenzen bei der Entwicklung von Resistenzen bei Inkubation mit Chemotherapeutika zu beobachten.<sup>[89]</sup>

Im Folgenden wird das zytotoxische Potential von Cisplatin auf fünf Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms (PCI-1, PCI-9, PCI-13, PCI-52 und PCI-68) analysiert sowie die Veränderung der Chemosensitivität durch vorherige Inkubation der Zellen mit Cisplatin.

### 3.2.1 Bestimmung der IC5/IC20 Cisplatins in den HNSCC-Zelllinien

Um *in vitro* Resistenzen gegen Cisplatin bei den Tumorzellen zu induzieren, sollten diese mit gering zytotoxischen Konzentrationen Cisplatins inkubiert werden. Neben der Selektion von resistenten Zellen musste zusätzlich eine Kultivierbarkeit der Zellen über mehrere Wochen möglich sein, um eine Therapie mit Cisplatin zu simulieren.

Die Daten der Zytotoxizitäts-Assays zur Bestimmung der Konzentrationen wurden von Priv.-Doz. Dr. Dr. Roman C. Brands zur Verfügung gestellt. Durch grafische Interpolation der Zellviabilitätsmessungen der fünf Zelllinien wurden verschiedene inhibitorische Konzentrationen (IC) Cisplatins bestimmt.

Über den längsten festgesetzten Zeitraum von vier Wochen war eine Inkubation mit Cisplatin nur bis zu einer Konzentration von IC20 möglich, also die Konzentration von Cisplatin, bei der 20 % der Zellen der jeweiligen Zelllinie zugrunde gehen. Höhere Konzentrationen führten nach mehr als zwei Wochen zum kompletten Absterben der Zellkulturen. Als Abstufung zur IC20 wurde als geringere Konzentration die IC5 Cisplatins ausgewählt.

Tabelle 6 zeigt die interpolierten Konzentrationen IC5 und IC20 Cisplatins, die für die einzelnen HNSCC-Zelllinien bestimmt wurden. Die Zellen, die im Folgenden mit der IC5 oder der IC20 von Cisplatin präinkubiert wurden, werden als selektioniert, die unbehandelten Kontrollzellen der gleichen Zelllinie werden als nicht selektioniert bezeichnet.

**Tabelle 6:** IC5- und IC20-Werte von Cisplatin in den verwendeten humanen HNSCC-Tumorzelllinien. Analyse nach 72 h Inkubation mit Cisplatin mit n = 3 Wiederholungen

Tumorzelllinie	IC5 Cisplatin [ $\mu\text{M}$ ]	IC20 Cisplatin [ $\mu\text{M}$ ]
PCI-1	~ 0,04	~ 0,1
PCI-13	~ 0,21	~ 0,3
PCI-9	~ 5,5	~ 8
PCI-52	~ 1,61	~ 3
PCI-68	~ 1,65	~ 4,9



### 3.2.2 Bestimmung der IC50 von Cisplatin behandelten Zelllinien des HNSCC

Die selektionierten Zellen (Präinkubation mit IC5 und IC20 Cisplatins, jeweils über 24 h, 48 h und 4 Wochen) sowie die nicht selektionierten Kontrollzellen wurden in einer Verdünnungsreihe beginnend mit 200 µM Cisplatin über 72 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde im Anschluss durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert.

Die Differenz der IC50 Werte von Cisplatin wurden aus den Daten der Zytotoxizitäts-Assays der selektionierten und der nicht selektionierten Zellen einer Zelllinie errechnet. Die einzelnen Differenzen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Dabei wiesen die mit Cisplatin vorbehandelten Zelllinien PCI-1, PCI-13, PCI-52 und PCI-68 nur geringe, nicht signifikante Abweichungen der IC50-Werte zu den unbehandelten Tumorzellen auf. Eine Ausnahme bildeten die Zellen der Zelllinie PCI-9. Im Vergleich zu den nicht selektionierten Zellen der PCI-9, zeigten die über 4 Wochen mit der IC5 und IC20 von Cisplatin präinkubierten Zellen  $45,024 \pm 0,201 \mu\text{M}$  ( $p = 0,01$ ) und  $22,621 \pm 0,223 \mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) höhere IC50-Werte. Bei einer Inkubation der PCI-9 über 24 h und 48 h waren keine wesentlichen Veränderungen der IC50-Werte gegenüber den nicht selektionierten Zellen zu verzeichnen.

**Tabelle 7:** Effekt der *in vitro* Inkubation mit Cisplatin auf die Cisplatinsensitivität der untersuchten Zelllinien. Angegeben ist die Veränderung der IC50 relativ im Vergleich zu den unbehandelten Zellen mit zugehörigen SD (standard deviation).

Zelllinie	Konzentration	Inkubationszeit	Differenz der IC50 Cisplatin (Mean ± SD) [µM]	p-Wert
PCI-1	IC5	24 h	0,117 ± 0,136	-
		48 h	0,090 ± 0,107	-
		4 Wochen	0,791 ± 0,086	0,337
	IC20	24 h	-0,001 ± 0,122	0,994
		48 h	0,197 ± 0,167	0,429
		4 Wochen	0,455 ± 0,046	0,051
PCI-9	IC5	24 h	-2,184 ± 3,988	-
		48 h	2,304 ± 0,558	-
		4 Wochen	45,025 ± 0,201	0,010*
	IC20	24 h	2,905 ± 11,200	0,822
		48 h	1,908 ± 2,890	0,522
		4 Wochen	22,621 ± 0,223	< 0,001*
PCI-13	IC5	24 h	0,555 ± 0,210	-
		48 h	0,463 ± 0,189	-
		4 Wochen	0,112 ± 0,120	0,492
	IC20	24 h	0,900 ± 0,176	0,332
		48 h	0,423 ± 0,368	0,451
		4 Wochen	-0,066 ± 0,123	0,632
PCI-52	IC5	24 h	2,641 ± 1,107	-
		48 h	0,979 ± 1,465	-
		4 Wochen	2,349 ± 1,367	0,501
	IC20	24 h	-0,558 ± 2,543	0,877
		48 h	2,802 ± 7,182	0,783
		4 Wochen	4,495 ± 1,774	0,096
PCI-68	IC5	24 h	-2,595 ± 3,412	-
		48 h	6,659 ± 1,274	-
		4 Wochen	-7,556 ± 1,275	0,204
	IC20	24 h	0,063 ± 5,739	0,995
		48 h	5,841 ± 3,745	0,545
		4 Wochen	-4,975 ± 4,586	0,431

Anmerkung: Für t-Test mit \*  $p_t < 0,05$  signifikant. Für Proben mit - kein p-Wert bei geringer Wiederholungszahl.

### 3.2.3 Chemosensitivität cisplatininkubierter Zelllinien

Neben den IC<sub>50</sub>-Werten wurde die zytotoxische Wirkung von Cisplatin auf die verwendeten fünf HNSCC-Zelllinien über die grafische Darstellung der zytotoxischen Verdünnungsreihen analysiert. Dazu wurden die Daten der Zytotoxizitäts-Assays verwendet.

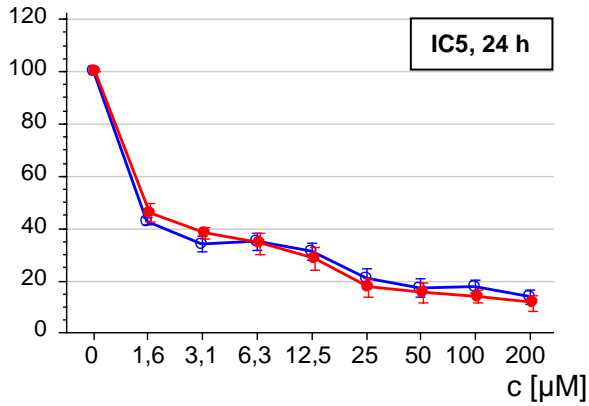
Bei den Messungen der relativen Zellzahl reagierten bereits die nicht selektionierten Zellen der fünf HNSCC-Zelllinien unterschiedlich auf die Inkubation mit Cisplatin. Dadurch konnten die fünf Zelllinien in die Gruppen sensitiv (PCI-1 und PCI-13) und gering sensitiv (PCI-9, PCI-52 und PCI-68) eingeteilt werden. Während die Zelllinien PCI-1 (Abbildung 6) und PCI-13 (Abbildung 7) bereits bei der geringsten Cisplatin-Konzentration der Verdünnungsreihe von 1,6 µM relative Zellzahlen unter 50 % zeigten, war ein zytotoxischer Effekt bei PCI-52 (Abbildung 9) erst ab 6,3 µM und bei den Zelllinien PCI-9 (Abbildung 8) und PCI-68 (Abbildung 10) erst ab 12,5 µM zu verzeichnen. Eine Ausnahme stellten dabei die nicht selektionierten Zellen der vier Wochen präinkubierten PCI-9 dar, die eine deutlich geringere Zellviabilität aufwiesen als die anderen nicht selektionierten PCI-9 Zellen.

Die Analyse der mit Cisplatin präinkubierten sensitiven Zelllinien PCI-1 und PCI-13 zeigte nur unerhebliche Unterschiede der Zellviabilität im Vergleich zu den nicht selektionierten Zellen der jeweiligen Zelllinie.

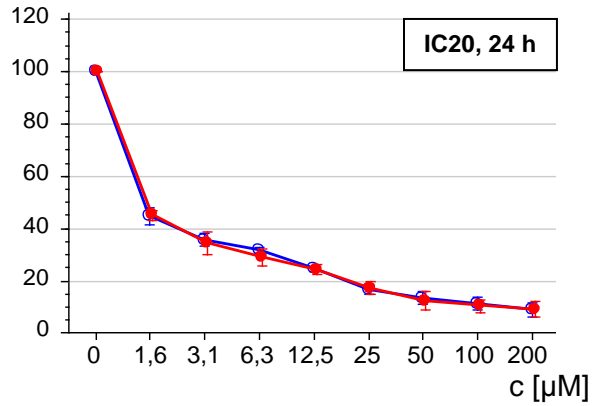
In gleichem Maß wie bei den sensitiven Zellen hatte die Präinkubation mit Cisplatin bei den weniger sensitiven Zelllinien PCI-52 und PCI-68 keine sensitivitätsverändernde Wirkung in den Zytotoxizitäts-Assays. So hatte weder die Dauer der Präinkubation noch deren Konzentration einen Einfluss auf die Zellviabilität bei der erneuten Inkubation mit Cisplatin. Allerdings konnte ein Anstieg der relativen Zellzahl der präinkubierten HNSCC-Zelllinie PCI-9 verglichen mit den unbehandelten Zellen der PCI-9 bis zu einer Konzentration von 12,5 µM nachgewiesen werden. Dieser Effekt war nach 48 h und 4 Wochen Präinkubation sowohl bei IC<sub>5</sub> als auch bei IC<sub>20</sub> von Cisplatin erkennbar. Zwar zeigten sich bei der Untersuchung der 4 Wochen vorbehandelten Zellen der PCI-9 deutlich höhere relative Zellzahlen als bei den nicht selektionierten Zellen, diese wies jedoch auch im Vergleich zu den anderen nicht selektionierten Zellkulturen der Zelllinie PCI-9 eine deutlich geringere Zellviabilität auf.

### PCI-1

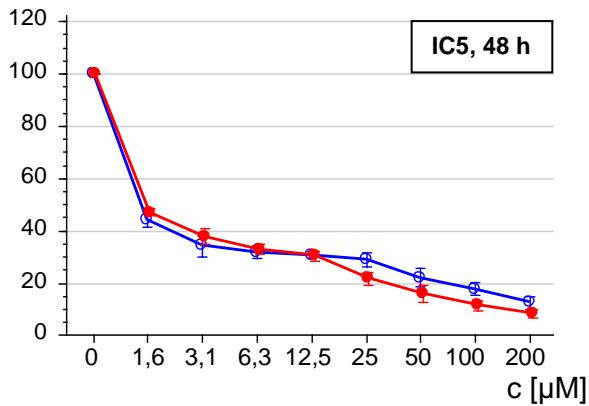
rel. Zellzahl [%]



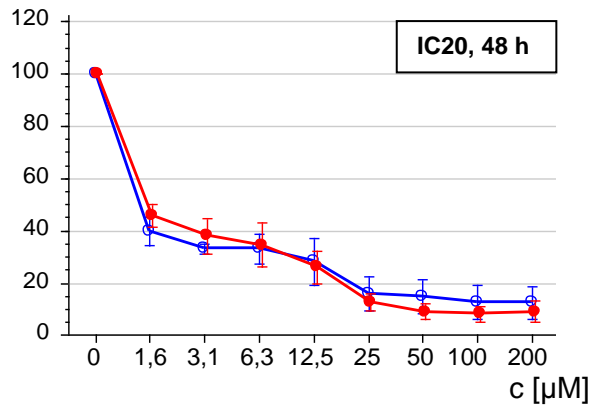
rel. Zellzahl [%]



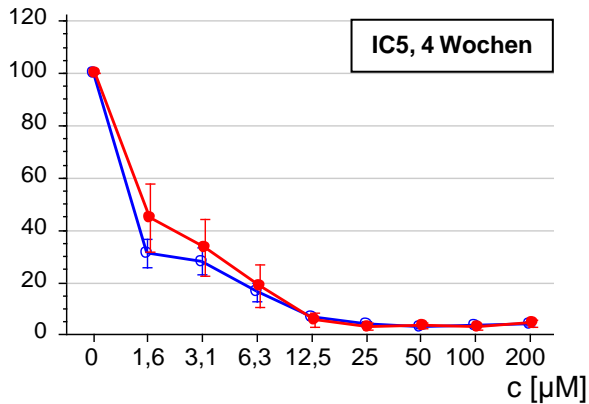
rel. Zellzahl [%]



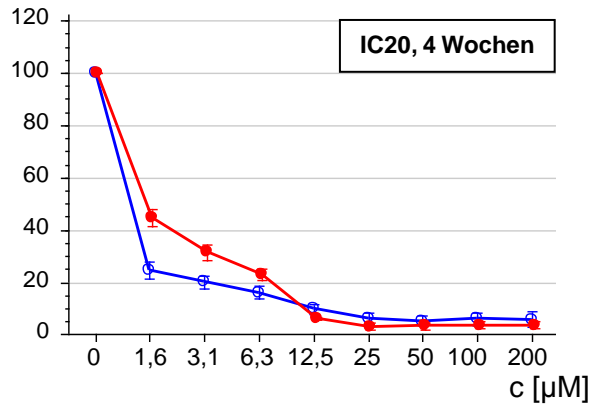
rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]

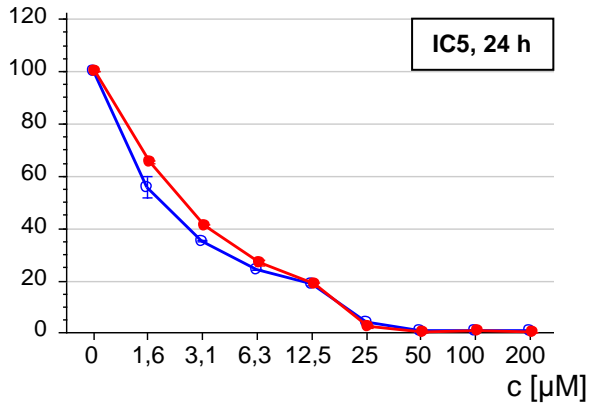


**Abbildung 6: Zytotoxizitätsanalyse der PCI-1**

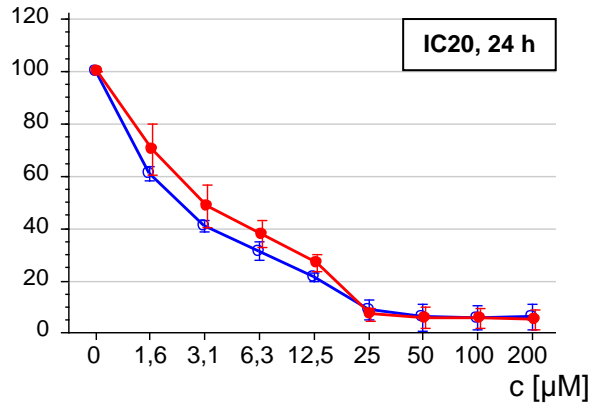
Kristallviolett-Assays mit Verdünnungsreihen ausgehend von 200 µM Cisplatin. Angegeben sind ● = mit IC5 bzw. IC20 Cisplatin selektionierte Zellen, ○ = nicht selektionierte Zellen sowie die drei Zeiträume mit n = 3 bei IC20 und bei IC5 – 4 Wochen, n = 2 bei IC5 und 24 h und 48 h. Die Mittelwerte der Daten sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>

### PCI-13

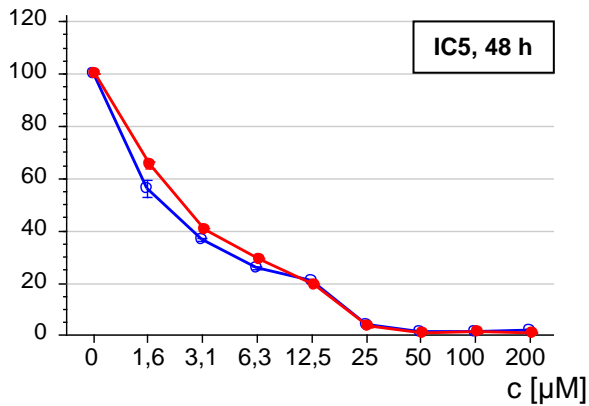
rel. Zellzahl [%]



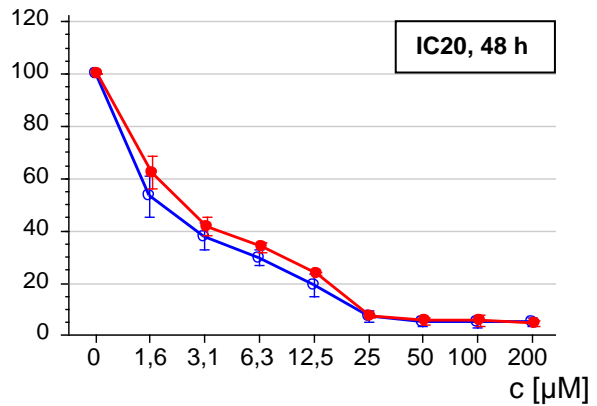
rel. Zellzahl [%]



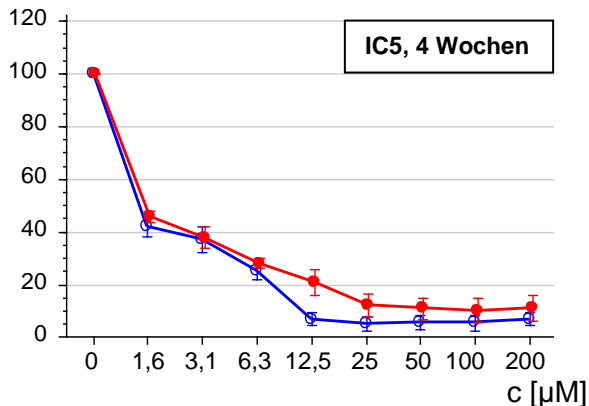
rel. Zellzahl [%]



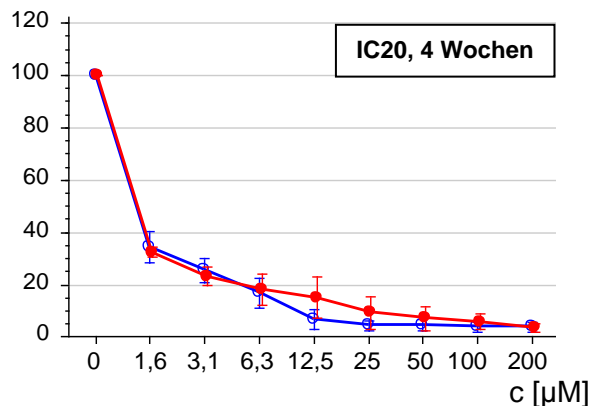
rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]

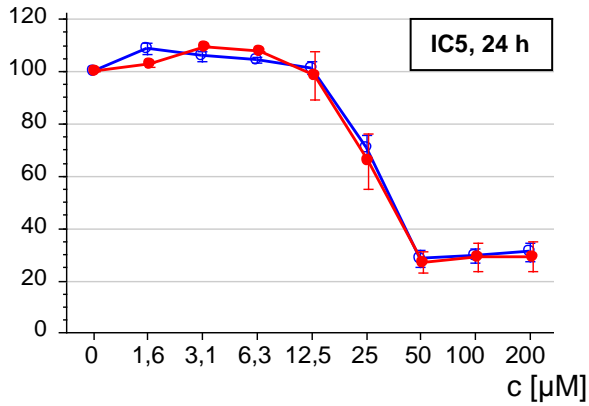


**Abbildung 7: Zytotoxizitätsanalyse der PCI-13**

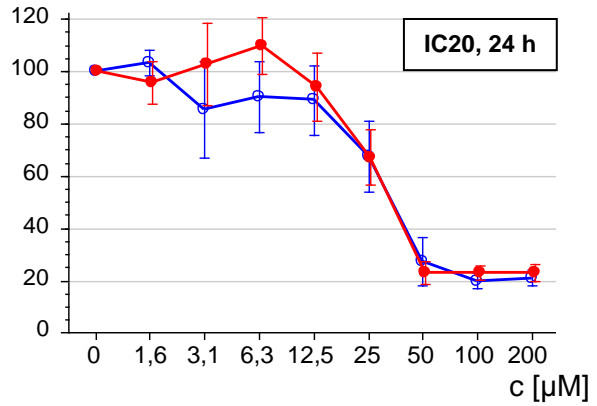
Kristallviolett-Assays mit Verdünnungsreihen ausgehend von 200 µM Cisplatin. Angegeben sind ● = mit IC5 bzw. IC20 Cisplatin selektionierte Zellen, ○ = nicht selektionierte Zellen sowie die drei Zeiträume mit n = 3 bei IC20 und bei IC5 – 4 Wochen, n = 2 bei IC5 und 24 h und 48 h. Die Mittelwerte der Daten sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. <sup>[92]</sup>

### PCI-9

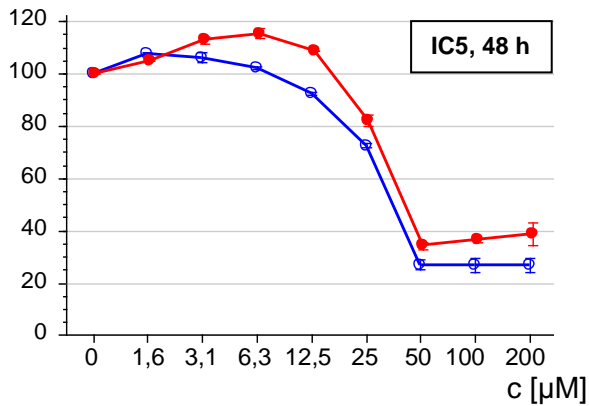
rel. Zellzahl [%]



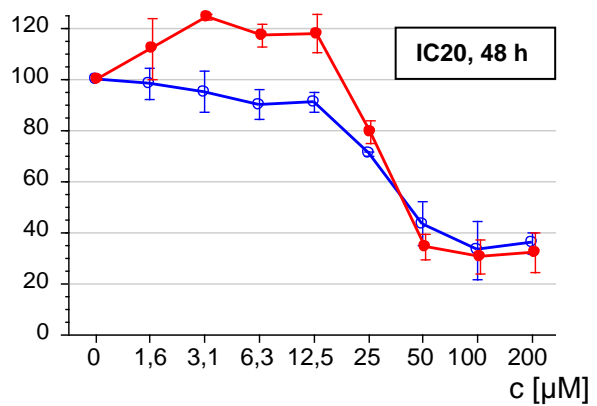
rel. Zellzahl [%]



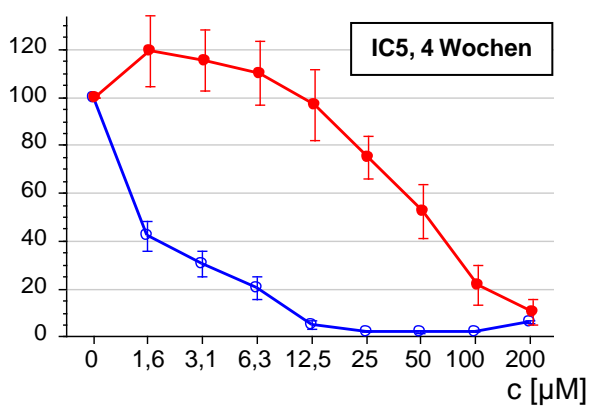
rel. Zellzahl [%]



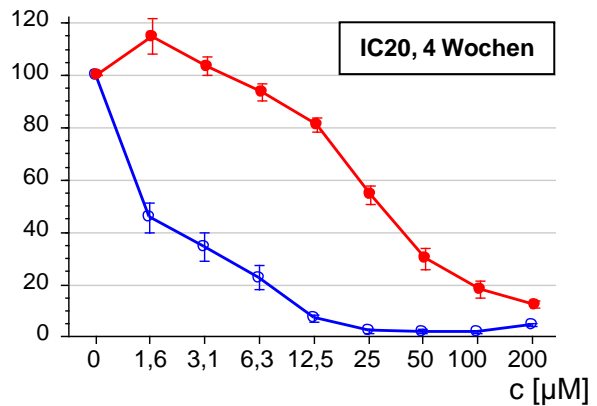
rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]

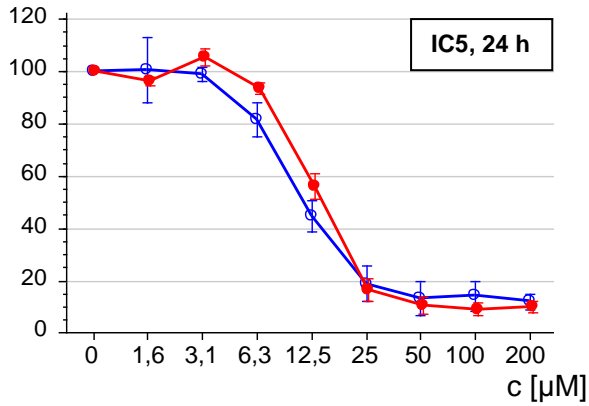


### Abbildung 8: Zytotoxizitätsanalyse der PCI-9

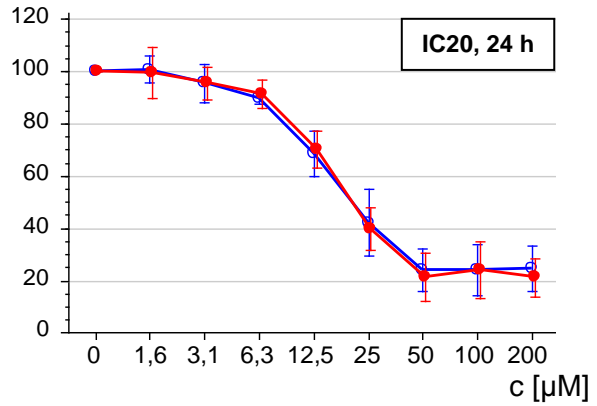
Kristallviolett-Assays mit Verdünnungsreihen ausgehend von 200 µM Cisplatin. Angegeben sind ● = mit IC5 bzw. IC20 Cisplatin selektionierte Zellen, ○ = nicht selektionierte Zellen sowie die drei Zeiträume mit n = 3 bei IC20 und bei IC5 – 4 Wochen, n = 2 bei IC5 und 24 h und 48 h. Die Mittelwerte der Daten sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>

### PCI-52

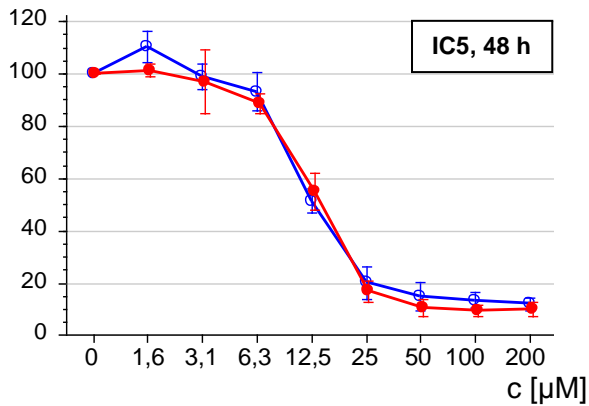
rel. Zellzahl [%]



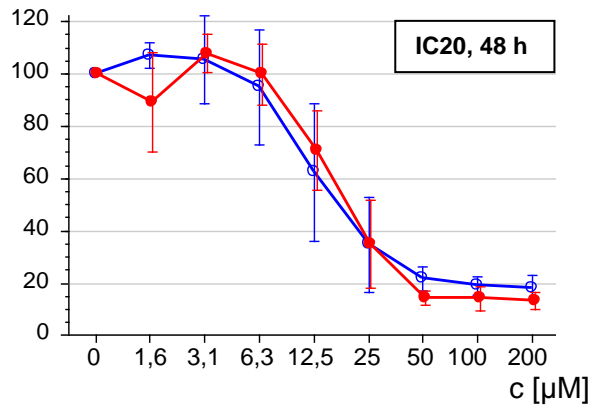
rel. Zellzahl [%]



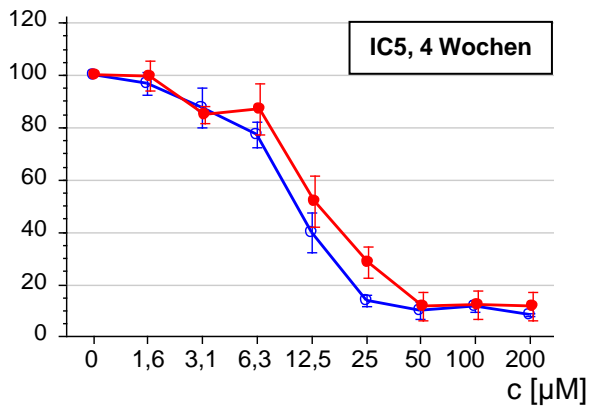
rel. Zellzahl [%]



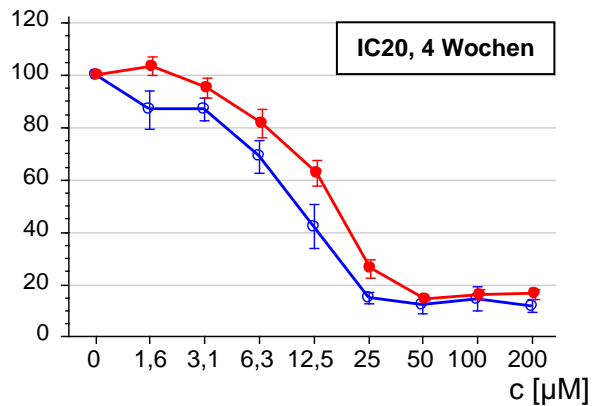
rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]

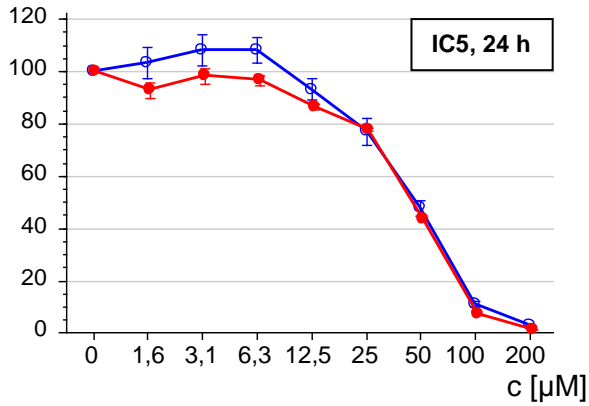


### Abbildung 9: Zytotoxizitätsanalyse der PCI-52

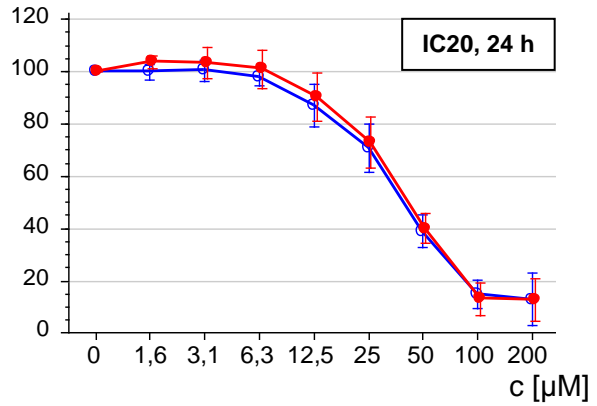
Kristallviolett-Assays mit Verdünnungsreihen ausgehend von 200 µM Cisplatin. Angegeben sind ● = mit IC5 bzw. IC20 Cisplatin selektionierte Zellen, ○ = nicht selektionierte Zellen sowie die drei Zeiträume mit n = 3 bei IC20 und bei IC5 – 4 Wochen, n = 2 bei IC5 und 24 h und 48 h. Die Mittelwerte der Daten sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>

### PCI-68

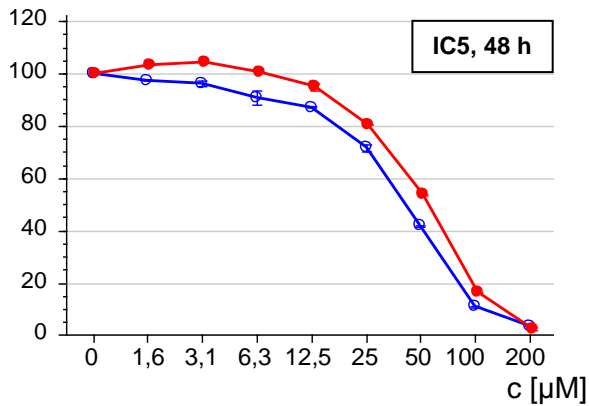
rel. Zellzahl [%]



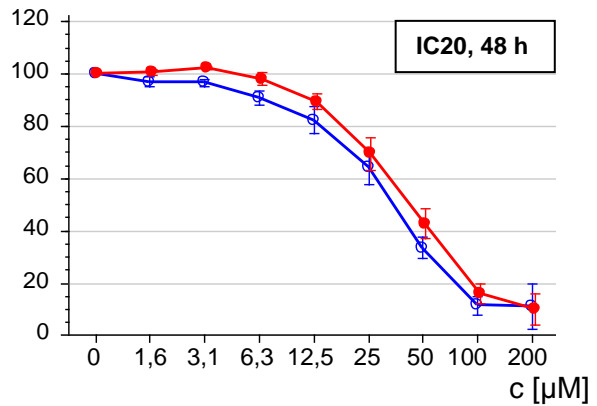
rel. Zellzahl [%]



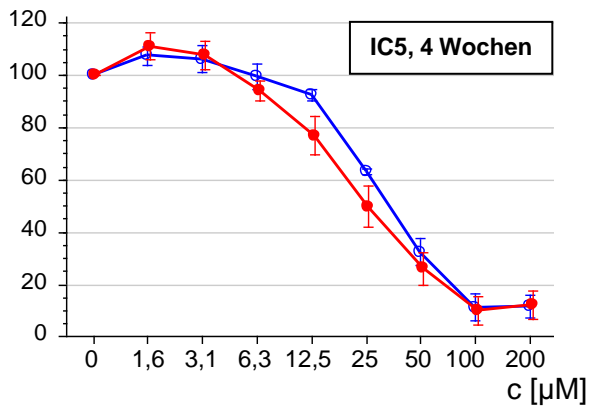
rel. Zellzahl [%]



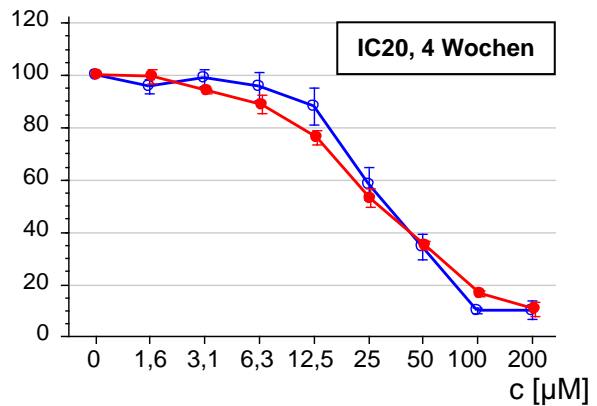
rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]



rel. Zellzahl [%]



**Abbildung 10: Zytotoxizitätsanalyse an PCI-68**

Kristallviolett-Assays mit Verdünnungsreihen ausgehend von 200 µM Cisplatin. Angegeben sind ● = mit IC5 bzw. IC20 Cisplatin selektionierte Zellen, ○ = nicht selektionierte Zellen sowie die drei Zeiträume mit n = 3 bei IC20 und bei IC5 – 4 Wochen, n = 2 bei IC5 und 24 h und 48 h. Die Mittelwerte der Daten sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>



### 3.3 PCR-Analyse der mit Cisplatin vorbehandelten Zelllinien des HNSCC

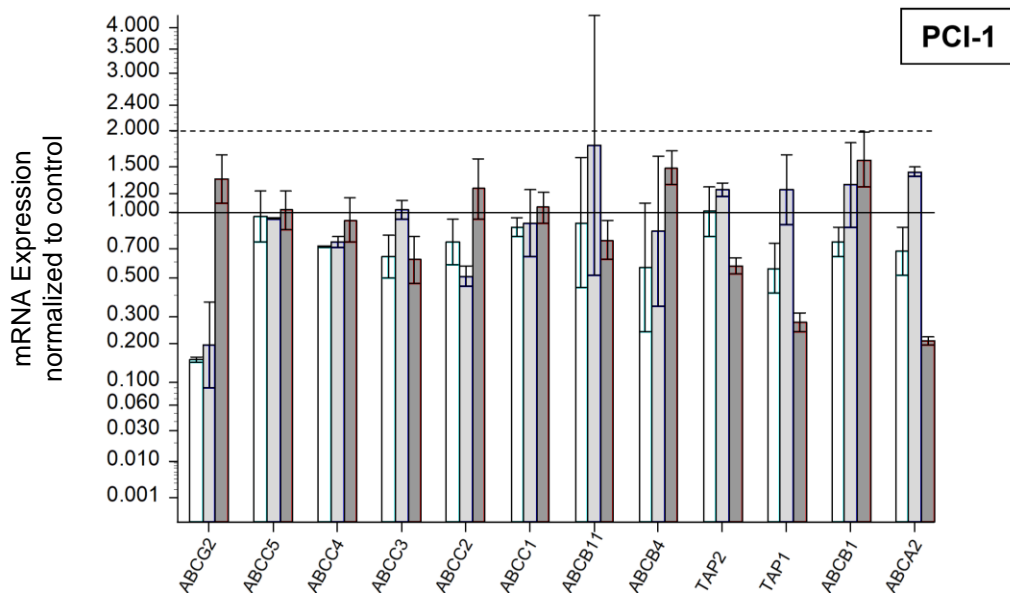
#### 3.3.1 Abhängigkeit der ABC-Expression von der Inkubationszeit

Da sich in den Zytotoxizitäts-Assays zwischen den Konzentrationen IC5 und IC20 bei den präinkubierten Zellen keine signifikanten Unterschiede ergaben, wurden für die Analyse der mRNA-Expression nur die mit der IC20 präinkubierten Zellen ausgewählt. Das Auftreten etwaiger Expressionsunterschiede war für die mit höherer Cisplatinkonzentration selektierten Zelllinien wahrscheinlicher. Die Daten der PCR-Analysen sind im Appendix 1 - 5 zu finden, im Folgenden soll auf die wesentlichen Expressionsveränderungen eingegangen werden.

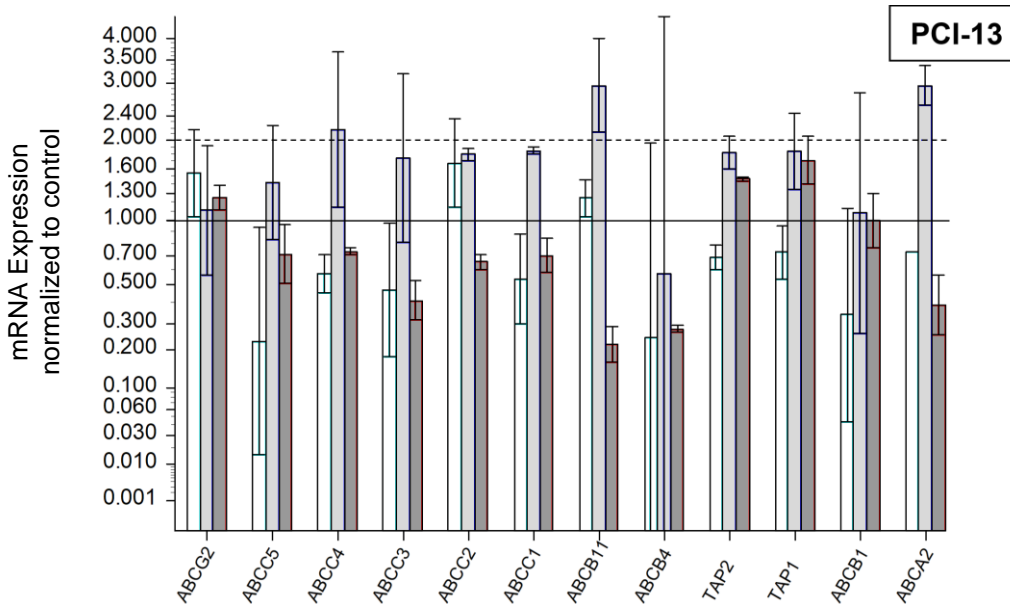
Unter den Transportern ließen sich alle mRNA-Transkripte mit Ausnahme von ABCB1, ABCB4 und ABCB11 in jeder Probe nachweisen. Dabei hatten die wenig sensitiven Zelllinien PCI-9 (Abbildung 13), PCI-52 (Abbildung 14) und PCI-68 (Abbildung 15) gemeinsam, dass sie sowohl TAP1 als auch TAP2 stärker exprimierten. PCI-9 präsentierte für TAP1 einen Anstieg des x-Fold von 3,391 (68 %-CI: 2,801 - 4,058) nach 24 h auf 4,255 (68 %-CI: 3,755 - 4,797) nach 4 Wochen, während der x-Fold von TAP2 von 2,665 (68 %-CI: 1,832 - 3,720) auf 2,191 (68 %-CI: 2,035 - 2,354) leicht abnahm. Im Vergleich zeigte PCI-68 bei der Expression von TAP1 bereits nach 48 h einen x-Fold von 8,816 (68 %-CI: 3,572 - 17,638), der nach vierwöchiger Inkubation jedoch wieder auf 3,475 (68 %-CI: 3,269 - 3,690) sank. Für PCI-52 lagen nach 48 h für TAP1 und TAP2 x-Folds von 3,205 (68 %-CI: 2,118 - 4,612) und 3,658 (68 %-CI: 1,948 - 6,157) vor, allerdings fiel deren Expression nach vierwöchiger Inkubation wieder auf die Ausgangsexpression ab. Zusätzlich zeigten PCI-9 und PCI-68 ebenfalls eine hohe Expression von ABCG2. So fand sich bei PCI-9 nach jeder Expressionszeit eine Überexpression mit Spitzenwerten nach 24 h mit einem x-Fold von 5,524 (68 %-CI: 4,661 - 6,489) und nach 4 Wochen mit 5,465 (68 %-CI: 4,845 - 6,137). Bei längerer Präinkubation von PCI-68 glich sich die Expression nach einem Anstieg des x-Fold auf 4,901 (68 %-CI: 3,442 - 6,724) allerdings wieder an die der nicht selektierten Zellen an.

Die Transporter der ABCC Familie, die erwiesenermaßen für den Efflux von Cisplatin und seiner Derivate verantwortlich sind, waren hauptsächlich in den über kurze Zeit präinkubierten Zellen induziert und zeigten bei längerer Inkubation wieder deutlich niedrigere Expressionswerte. Bei PCI-9 erreichte aus dieser Transporterfamilie nur ABCC2 eine Überexpression mit x-Fold 2,766 (68 %-CI: 2,589 - 2,951) nach 24 h, die nach 4 Wochen Inkubation mit 2,000 (68 %-CI: 1,651 - 2,394) nur eine geringfügig schwächere Expression aufwies. Nach 48 h zeigte PCI-68 für ABCC3 einen x-Fold von 6,485 (68 %-CI: 5,858 - 7,155) und für ABCC5 von 2,676 (68 %-CI: 1,184 - 5,078), wobei nach vierwöchiger Inkubation nur noch ABCC3 mit x-Fold von 2,597 (68 %-CI: 2,181 - 3,063) überexprimiert vorlag. Die Zelllinie PCI-52 präsentierte für alle untersuchten ABCC-Transporter eine Überexpression nach 48 h Inkubation mit Cisplatin. So ergaben sich x-Fold-Werte für ABCC1 von 2,321 (68 %-CI: 2,169 - 2,479), ABCC2 von 2,399 (68 %-CI: 1,578 - 3,466), ABCC3 von 2,527 (68 %-CI: 2,071 - 3,046), ABCC4 von 2,550 (68 %-CI: 1,697 - 3,648) und ABCC5 von 2,471 (68 %-CI: 0,757 - 5,760). Allerdings normalisierte sich die Expression jedes Transporters nach vierwöchiger Inkubation.

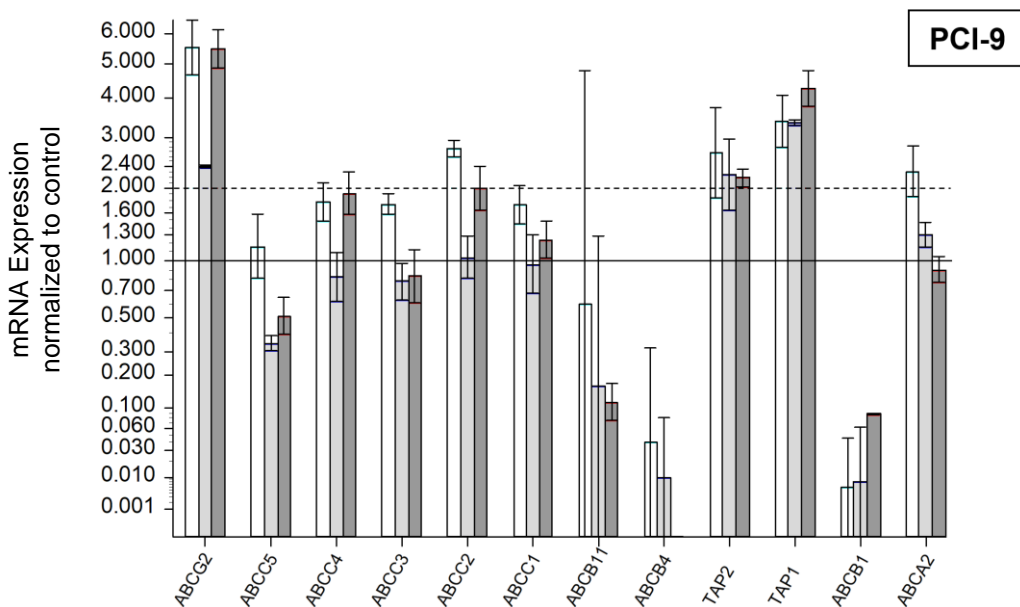
Im Vergleich dazu zeigten die sensitiven Zelllinien PCI-1 (Abbildung 11) und PCI-13 (Abbildung 12) deutlich geringere Expressionen dieser Transporter. So wies PCI-1 unabhängig von der Dauer der Inkubation keine Überexpression der ABC-Transporter auf. Nach kurzer Inkubationszeit zwischen 24 h und 48 h lag ABCG2 sogar deutlich unterexprimiert vor mit x-Fold-Werten von 0,154 (68 %-CI: 0,147 - 0,160) und 0,196 (68 %-CI: 0,089 - 0,367). Bei PCI-13 war nach 24 h Inkubation die ABCC-Transporterfamilie teilweise schwach exprimiert, sonst lagen die Expressionswerte größtenteils im Bereich der Kontrolle. Es zeigten sich nur vereinzelte nach 48 h Überexpressionen von ABCA2 2,967 (68 %-CI: 2,597 - 3,371) und ABCB11 2,964 (68 %-CI: 2,120 - 4,007), die allerdings bei keiner der resistenten Zelllinien konstant stark exprimiert waren und auch nicht konstant überexprimiert vorlagen.



**Abbildung 11: ABC-Transporterexpression der PCI-1 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatin**  
 Die relative Expression von selektionierten zu nicht selektionierten Zellen mittels qRT-PCR ist gegen die Präinkubationszeiträume □ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 4 Wochen, mit n = 2 pro Säule, aufgetragen. Die Mittelwerte sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>

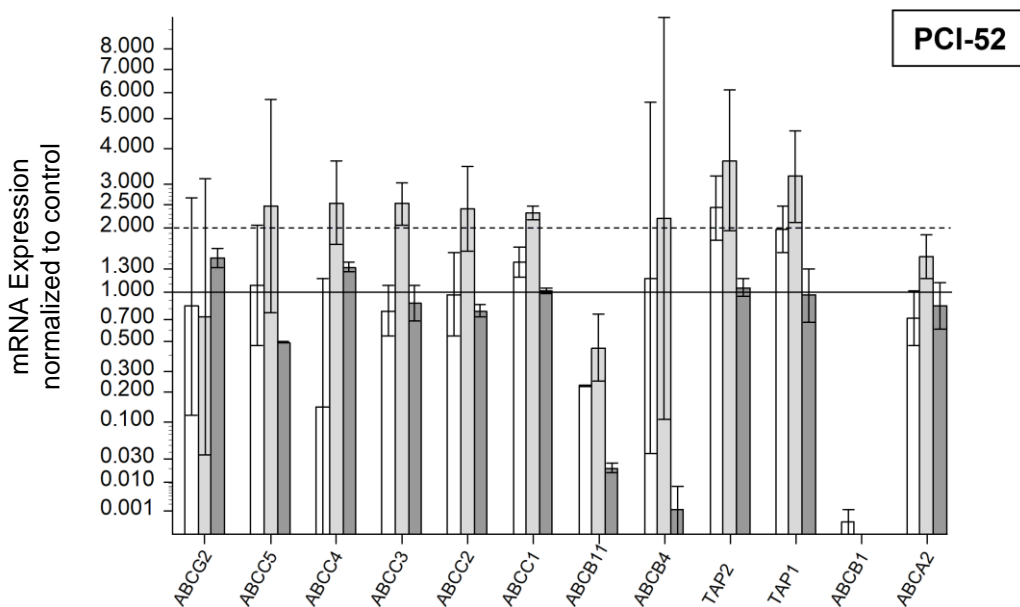


**Abbildung 12: ABC-Transporterexpression der PCI-13 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatin**  
 Die relative Expression von selektionierten zu nicht selektionierten Zellen mittels qRT-PCR ist gegen die Präinkubationszeiträume □ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 4 Wochen, mit n = 2 pro Säule, aufgetragen. Die Mittelwerte sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>



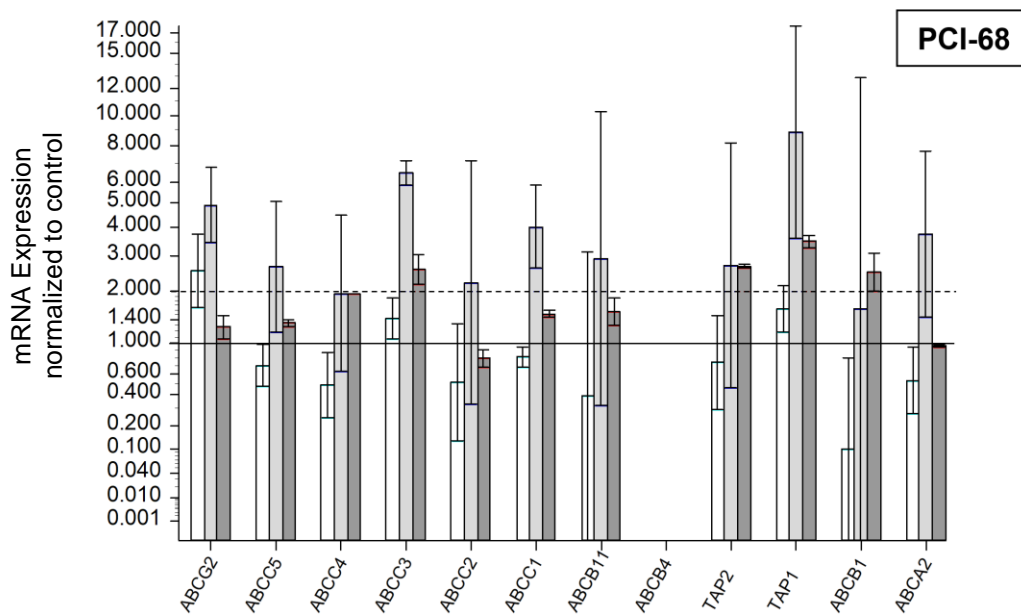
**Abbildung 13: ABC-Transporterexpression der PCI-9 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatin**

Die relative Expression von selektionierten zu nicht selektionierten Zellen mittels qRT-PCR ist gegen die Präinkubationszeiträume □ = 24 h, ▒ = 48 h, ■ = 4 Wochen, mit n = 2 pro Säule, aufgetragen. Die Mittelwerte sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>



**Abbildung 14: ABC-Transporterexpression der PCI-52 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatin**

Die relative Expression von selektionierten zu nicht selektionierten Zellen mittels qRT-PCR ist gegen die Präinkubationszeiträume □ = 24 h, ▒ = 48 h, ■ = 4 Wochen, mit n = 2 pro Säule, aufgetragen. Die Mittelwerte sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>



**Abbildung 15: ABC-Transporterexpression der PCI-62 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatin**

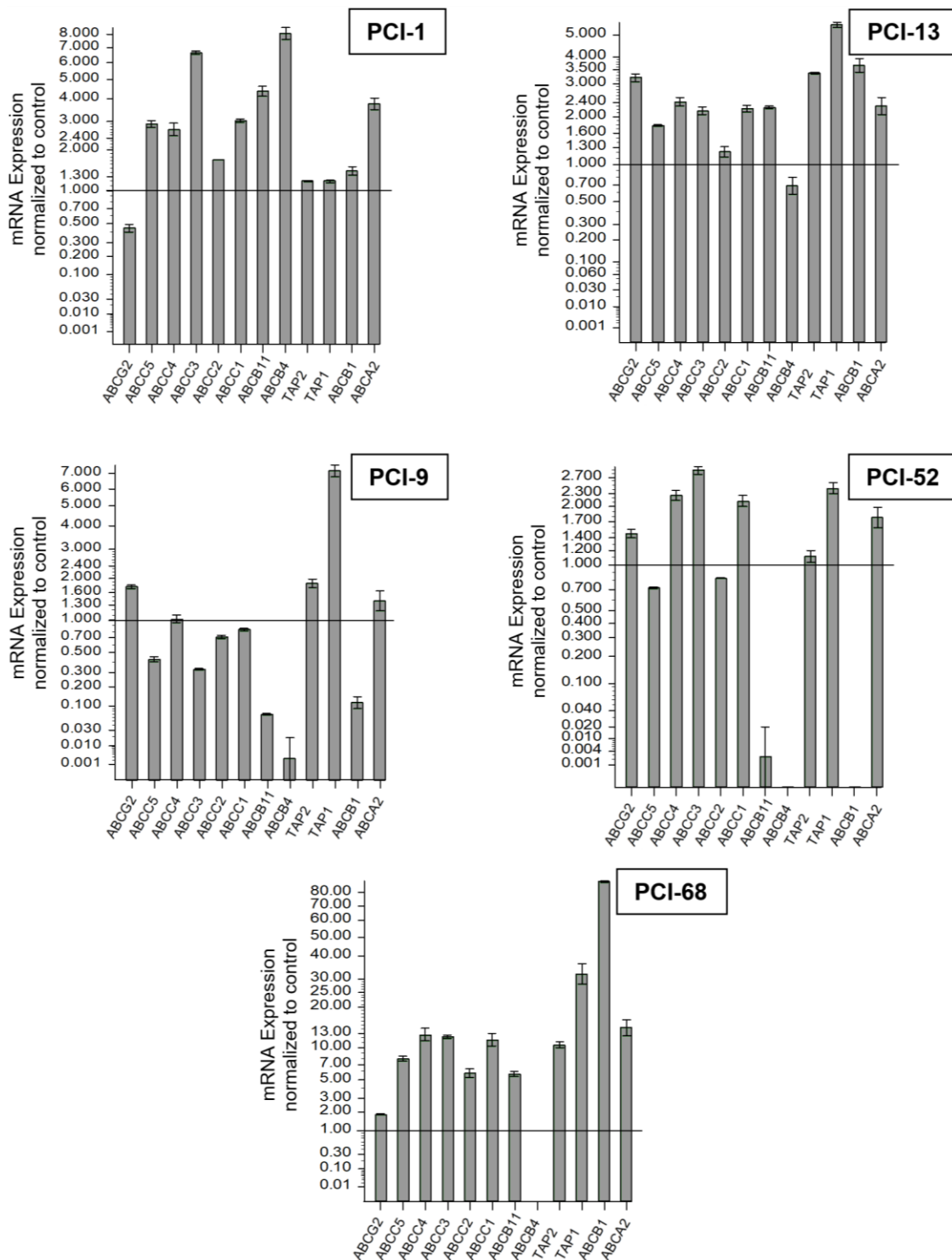
Die relative Expression von selektionierten zu nicht selektionierten Zellen mittels qRT-PCR ist gegen die Präinkubationszeiträume □ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 4 Wochen, mit n = 2 pro Säule, aufgetragen. Die Mittelwerte sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben. Eigene modifizierte Abbildung.<sup>[92]</sup>

### 3.3.2 ABC-Transporter Expression ausgewählter langzeit-inkubierter Zelllinien

Neben der Expressionsanalyse direkt nach Inkubation, sollte außerdem eine mögliche Expressionsveränderung nach Abschluss der Inkubation untersucht werden, wie sie bei einem rezidivierenden Tumor auftreten kann. Dazu wurden die Tumorzelllinien nach einer vierwöchigen Inkubation weitere vier Wochen ohne Cisplatin inkubiert und ihre Transporterexpression durch qRT-PCR quantifiziert (Abbildung 16).

Im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment zeigten die sensitiven Zellen PCI-1 und PCI-13 deutlich höhere Expressionswerte. Dabei waren die Transporter der ABCC-Familie – ausgenommen ABCC2 sowie einzelne Transporter der ABCB-Familie – stärker exprimiert. Für die Zelllinie PCI-13 galt dies auch für die Transporter ABCG2, TAP1 und TAP2.

Bei den weniger sensitiven Zelllinien PCI-9, PCI-52 und PCI-68 waren lediglich die Expressionswerte des TAP1 Transporters in allen drei Linien deutlich erhöht. Während PCI-52 bereits Transporter der ABCC-Familie doppelt so hoch exprimiert, zeigte PCI-68 mehr als fünfmal höhere Expressionswerte dieser Transporter als die nicht selektierten Zellen der jeweiligen Zelllinien. Weiterhin zeigten sich bei PCI-68 bemerkenswert hohe Expressionen bei Teilen der ABCB-Transporterfamilie, die bei TAP1 30-mal höher und ABCB1 sogar über 80-mal höher waren als die relative Expression dieser Transporter bei den nicht mit Cisplatin selektierten Zellen.



**Abbildung 16: Expressionsanalyse der Zellen, die nach vierwöchiger Präinkubation mit der IC20 Cisplatin weitere 4 Wochen mit Medium inkubiert wurden**

Die relative Expression der Transporter ist als Vielfaches der nicht selektierten Zellen auf der y-Achse aufgetragen mit n = 2. Die Mittelwerte sind mit SEM (mittlerer Fehler des Mittelwerts) angegeben.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Cisplatinsensitivität von fünf Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms untersucht und die Expressionsveränderung von zwölf tumorassoziierten ABC-Transportern in den untersuchten Zellen unter Cisplatinexposition analysiert werden. Ebenfalls sollte die Expression dieser ABC-Transporter untersucht werden, nachdem die Zellen weitere vier Wochen ohne Cisplatin inkubiert wurden.

Folgende Hauptaussagen konnten anhand der Untersuchungen getroffen werden:

1. Für drei der fünf untersuchten Zelllinien konnte eine intrinsische Cisplatinresistenz festgestellt werden, allerdings zeigte nur eine der fünf Zelllinien (PCI-9) eine signifikante Resistenzentwicklung im Sinne einer Erhöhung der IC50-Werte Cisplatin.
2. Bei den Zelllinien, die eine initiale Cisplatinresistenz aufwiesen, konnten Expressionsveränderungen der Transporter-mRNA im Vergleich zu den sensitiven Zelllinien nachgewiesen werden.
3. Nach weiterer Inkubation ohne Cisplatin exprimierten alle Zelllinien verstärkt ABC-Transporter.

Auf diese Punkte soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### 4.1 Resistenzentwicklung der inkubierten Zelllinien

Um die Chemosensitivität und die Eigenschaften der Tumorzellen zu untersuchen, wurden Cisplatin-präinkubierte Tumorzellen mit nicht inkubierten Kontrollzellen über Zytotoxizitäts-Assays miteinander verglichen und die Differenz der IC50 ermittelt.

Die Zelllinien PCI-1 und PCI-13 stellten sich dabei deutlich sensitiver gegenüber Cisplatin dar als die Zelllinien PCI-9, PCI-52 und PCI-68. Jede der fünf Zelllinien wurde aus Tumoren von Patienten isoliert, die vorher keine Chemotherapie erhalten hatten.<sup>[90, 91]</sup> Im Falle der Zelli-



nien PCI-9, PCI-52 und PCI-68 spricht man von einer intrinsischen Resistenz.<sup>[39, 93]</sup> Die Grundlage für diesen Resistenzmechanismus bilden verschiedene Zellpopulationen in den Tumoren, die aus heterogenen Klonen der Tumorzellen bestehen.<sup>[94, 95]</sup> Beispielsweise konnte aus Biopsien von cisplatinnaiven Patienten sowohl cisplatinresistente, als auch cisplatin-sensitive Subpopulationen isoliert werden.<sup>[96]</sup>

Eine Heterogenität der Zellzusammensetzung und der individuellen Mutation der Subpopulationen könnte auch die erhöhte Sensitivität der Kontrollzellen der PCI-9 nach vier Wochen gegenüber Cisplatin erklären<sup>[97]</sup>. Die in diesen Zellen aufgetretene Cisplatinresistenz lässt die Vermutung zu, dass durch fortwährendes Splitten ein Selektionsvorteil für diese Subpopulation von Zellen entstand. Mit einer IC50 Cisplatin von 14  $\mu\text{M}$ <sup>[98]</sup> und 42  $\mu\text{M}$ <sup>[99]</sup> für Chemotherapie-naive Zellen der PCI-9 ergaben sich auch bei *Brands et al.* und *Knierim* deutliche Unterschiede der Chemosensitivität. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Heterogenität dieser Zelllinie im Hinblick auf Chemosensitivität.

Die mit Cisplatin selektionierten Zellen der PCI-9 zeigten dagegen die gleiche Cisplatinresistenz unabhängig davon, wie lange sie inkubiert wurden. Dies ist dadurch zu erklären, dass durch die Inkubation mit Cisplatin die cisplatin-sensitiven Subpopulationen untergingen.

Durch die Präinkubation mit Cisplatin konnte weder durch eine höhere Cisplatinkonzentration noch durch eine längere Inkubationszeit eine Veränderung der Cisplatinresistenz im Sinne einer Erhöhung der IC50 erreicht werden. Allerdings zeigte die mit Cisplatin präinkubierten Zelllinie PCI-9 einen Anstieg der Zellviabilität im niedrigeren Konzentrationsbereich von 1,6  $\mu\text{M}$  bis 25  $\mu\text{M}$ . Als Erklärung für eine erhöhte Proliferation von Tumorzellen bei zytotoxischer Therapie werden die Selektion von resistenten Tumorstammzellen<sup>[100, 101]</sup> oder Apoptose-induzierte Proliferation (AiP)<sup>[102, 103]</sup> diskutiert.

Da auch die Zelllinien, die eine intrinsische Resistenz gegen Cisplatin aufwiesen, keine weitere Resistenzentwicklung zeigten, verglichen wir die verwendeten Inkubationsdosen der Zelllinien PCI-9, PCI-52 und PCI-68 mit klinischen Cisplatin Hochdosis-Therapien und anderen *in vitro* Studien. Himmelstein *et al.*<sup>[104]</sup> zeigten in einer Studie, dass nach einer Injektion

von 100 mg/m<sup>2</sup> Cisplatin sich ein Peak von ~20 µM Cisplatin im Plasma fand. Diese Konzentration war deutlich geringer als die IC50 Werte von PCI-9 (29,48 µM ± 6,48 µM) und PCI-68 (35,36 µM ± 8,96 µM) in der vorliegenden Studie. Zusätzlich sank *in vivo* die freie Cisplatinkonzentration dabei in ~ 20 min, die totale Platinkonzentration bereits in ~ 40 min auf die Hälfte der Ausgangskonzentration.<sup>[104-106]</sup> Andere Autoren, die Studien mit cisplatinresistenten HNSCC-Zelllinien durchführten, bezeichneten Zellen als resistent, die eine IC50 Cisplatin von 7 µM - 20 µM besaßen.<sup>[89, 107, 108]</sup> Aufgrund dieser Werte ist fraglich, ob Zellen mit so hoher intrinsischer Cisplatinresistenz wie PCI-9, PCI-52 und PCI-68 noch höhere Resistenzen gegenüber diesem Zytostatikum entwickeln können.

## 4.2 ABC-Expression in HNSCC

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie war es, die mRNA-Expression von ABC-Transportern bezogen auf deren Cisplatinempfindlichkeit zu untersuchen. Die Expression dieser Transporter stellt einen der wichtigsten Resistenzmechanismen von Tumorzellen dar. So ist deren Identifikation und Inhibition ein vielversprechender Ansatz der Targeted Therapy.<sup>[109, 110]</sup> Dazu wurden mittels qRT-PCR analysiert, ob es zu einer Induktion der mRNA-Expression von zwölf ausgewählten ABC-Transportern durch die Inkubation mit Cisplatin kam. Da sich in den Zytotoxizitäts-Assays keine Unterschiede der Zellviabilität zwischen den mit der IC5 und der IC20 selektierten Zellen ergab, wurde hier nur auf die Expression der IC20 selektierten Zellen Bezug genommen. Zum einen wurde eine Überexpression und zum anderen eine Unterexpression von Transporter-mRNA beobachtet, die im Folgenden diskutiert werden soll.

#### 4.2.1 Überexpression von Transporter-mRNA

In unseren Versuchen konnte bei den Zelllinien PCI-9, PCI-52 und PCI-68, die eine intrinsische Cisplatinresistenz gezeigt hatten, nach der Inkubation mit Cisplatin eine Überexpression bestimmter ABC-Transporter festgestellt werden. Bei diesen drei Zelllinien lag die größte Expressionsdifferenz – zwischen inkubierten und nicht inkubierten Zellen – bei der mRNA von ABCG2, TAP1, TAP2 sowie der ABCC-Transporterfamilie (ABCC1, ABCC2 und ABCC3) vor.

Die ABCC-Transporter sind bisher die einzigen ABC-Transporter, bei denen ein direkter Cisplatinflux nachgewiesen wurde. Dabei ist der Transport von Platinverbindungen durch ABCC2 und ABCC5 am besten untersucht.<sup>[49, 111]</sup> Eine Expressionserhöhung von ABCC1 und ABCC2 wurde bereits in verschiedenen anderen cisplatinresistenten HNSCC-Zelllinien gezeigt.<sup>[112-114]</sup> Beretta *et al.*<sup>[115]</sup> beschrieben, dass durch *knock-down* (Verringerung der Genexpression durch RNA-Interferenz) von ABCC1 und ABCC4, Resistenzen gegenüber Cisplatin reversibel waren. Darüber hinaus wurde ABCC3 als Marker für die Resistenz gegen Cisplatin und andere Chemotherapeutika sowie für eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit bei Bronchialzellkarzinomen diskutiert.<sup>[116, 117]</sup> In der vorliegenden Studie ergaben sich vor allem nach 24 h und 48 h Cisplatininkubation für die Transporter der ABCC-Familie hohe Expressionswerte. Allerdings war keiner der Transporter in einer der drei resistenten Zelllinien überexprimiert. Diese Inhomogenität deutet darauf hin, dass die Cisplatinresistenz nicht einem einzelnen dieser Transporter zugeschrieben werden kann, sondern dass die Resistenz individuell von diesen Transportern beeinflusst wird. In unseren Daten zeigte sich ebenfalls eine Abnahme des Expressionsniveaus nach einer Inkubationszeit von vier Wochen. Das legt nahe, dass die Bedeutung der ABCC-Transporter im Laufe der Inkubation abnimmt. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch die Studie von Theile *et al.* an Zelllinien des HNSCC.<sup>[89]</sup>

Die konsistenteste Überexpression bei der Analyse unserer Daten zeigte sich bei TAP1 und TAP2 in den Zelllinien PCI-9, PCI-52 und PCI-68. Lediglich die Zelllinie PCI-52 wies nach vier Wochen Inkubation mit Cisplatin wieder das Expressionslevel der nicht inkubierten Vergleichszellen auf. Bei diesen beiden Transportern handelt es sich um Halbtransporter, die

zusammen einen Heterodimer mit Transportfunktion bilden.<sup>[118]</sup> In der Literatur waren Platinverbindungen bislang nicht als Substrate dieses Transportkomplexes bekannt und werden erst seit Kurzem mit der Resistenzbildung von Cisplatin in Verbindung gebracht.<sup>[82, 119]</sup> Für das orale Plattenepithelkarzinom stellten Theile *et al.* ebenfalls eine Überexpression von TAP1 und TAP2 bei mit Cisplatin inkubierten Zellen fest. Dabei handelte es sich, wie bei den von uns verwendeten Zelllinien PCI-9 und PCI-68, um Plattenepithelkarzinome der Zunge.<sup>[89]</sup>

Auch ABCG2 war in unserer Studie nach der Inkubation mit Cisplatin in den Zelllinien PCI-9 und PCI-68 stark überexprimiert. In weiteren Untersuchungen zeigte sich eine ebensolche Überexpression in Zelllinien des Zungenkarzinoms<sup>[86, 120]</sup> sowie in Zelllinien anderer oraler Plattenepithelkarzinome.<sup>[89, 121, 122]</sup> Hierbei ist zu erwähnen, dass Cisplatin und andere Platinverbindungen, genau wie bei den TAP-Transportern, nicht zu den Substraten von ABCG2 gehören.<sup>[123, 124]</sup> Trotzdem zeigten diese Transporter eine Assoziation mit Cisplatinresistenzen, die durch den *knock-down* reversibel waren.<sup>[86]</sup> Erklärungsmodelle für die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

Die HNSCC-Zelllinien, die nach einem cisplatinfreien Intervall im Anschluss an die vierwöchige Inkubation untersucht wurden, zeigten deutlich erhöhte Transporter-Expressionsprofile. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchung gab es keine andere Studie, in der die Expression von ABC-Transportern in HNSCC-Zellen über einen so langen Zeitraum nach der Inkubation mit Cisplatin gemessen wurde.

Die von uns beobachtete Überexpression der ABCC-Transporterfamilie unterstützt unsere Annahme, dass der Cisplatinefflux vor allem initial an der Resistenzbildung dieser Zelllinien beteiligt war. Da auch die cisplatin sensitiven Zelllinien PCI-1 und PCI-13 diese Transporter stark exprimierten, müssen noch weitere Faktoren zur intrinsischen Resistenz der Zelllinien PCI-9, PCI-52 und PCI-68 beitragen. Hierbei ist festzustellen, dass der TAP1 auch vier Wochen nach der Inkubation mit Cisplatin weiterhin eine hohe Überexpressionen in den cisplatinresistenten HNSCC-Zelllinien zeigte. Interessant war auch die Überexpression von

ABCB1. Diese relative Überexpression war jedoch auf eine sehr niedrige Expression nahe der Nachweisgrenze von ABCB1 in den Kontrollzellen zurückzuführen.

#### 4.2.2 Unterexpression von Transporter-mRNA

Die drei Transporter der ABCB1, ABCB4 und ABCB11 zeigten in unseren Ergebnissen die geringsten Expressionswerte bis zu einer Inkubationsdauer von vier Wochen. Dabei hatten die drei Zelllinien PCI-9, PCI-52 und PCI-68 mit intrinsischer Resistenz gegen Cisplatin die niedrigsten Expressionswerte der Transportergene. Zusätzlich war bei PCI-9 ein signifikanter Anstieg der IC50 Cisplatin nach vierwöchiger Inkubation zu verzeichnen. Für resistenzvermittelnde Mechanismen wäre mit einer Steigerung der Expression zu rechnen.

Da für ABCB1 neben Cisplatin viele weitere Chemotherapeutika als Substrate bekannt sind, wird dieser Transporter auch als *Multidrug-Resistance-Protein 1* (MDR1) bezeichnet.<sup>[125, 126]</sup>

In unseren Untersuchungen zeigte ABCB1 bereits bei den nicht mit Cisplatin selektionierten Zellen sehr geringe Expressionswerte. Insbesondere PCI-9, PCI-52 und PCI-68 exprimierten nach der Inkubation mit Cisplatin noch geringere Mengen von ABCB1. Im Vergleich konnten Theile *et. al* in cisplatininkubierten Zelllinien ähnlich geringe Mengen an ABCB1 in ihren Ergebnissen nachweisen. Die Autoren folgerten daraus, dass die Bedeutung von MDR1 für die Resistenzbildung der von ihnen verwendeten Tumorzellen zu vernachlässigen sei.<sup>[89]</sup>

Die Rolle, die ABCB4 bei der Entstehung von Resistenzen gegen Cisplatin spielt, wird kontrovers diskutiert<sup>[127, 128]</sup>. Der Transporter ABCB4 (MDR3) besitzt zwar zu 80 % homologe TMDs zu ABCB1<sup>[129]</sup>, allerdings werden deutlich weniger Xenobiotika durch ABCB4 transportiert<sup>[127]</sup>. Bisher gab es keine Studie, die sich mit ABCB4 im Zusammenhang mit einer Resistenzbildung gegen Cisplatin in HNSCC-Zelllinien beschäftigte. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass ABCB4 keine Auswirkungen auf die Cisplatinresistenz der verwendeten Zelllinien hat. Während ABCB11 mit einer Resistenzbildung gegen Paclitaxel assoziiert ist<sup>[130]</sup>, konnte für Platinverbindungen in Kombinationstherapie (FOLFOX – Folinsäure, 5-FU und Oxalipla-

tin) beim Kolonkarzinom eine geringere Expression im Vergleich zum Kontrollgewebe nachgewiesen werden.<sup>[80]</sup> Da bei den Zelllinien PCI-9, PCI-52 und PCI-68 eine intrinsische Resistenz gegen Cisplatin vorlag und nach deren Inkubation mit Cisplatin die Expression der Transporter ABCB1, ABCB4 und ABCB11 deutlich abnahm, ist davon auszugehen, dass diese Transporter nicht zur Resistenzentwicklung dieser Zellen beitragen. Eine durch Unterexpression dieses Transporters verursachte Resistenz in Tumoren ist nicht bekannt.

#### 4.2.3 Alternative Resistenzmechanismen der ABC-Transporter

Der Efflux von Cisplatin durch die ABC-Transporter allein konnte die Resistenzen der von uns verwendeten Tumorzelllinien nicht vollständig erklären. Bei der Analyse der mRNA-Expression zeigte sich, dass nach der Inkubation mit Cisplatin in den resistenten Tumorzelllinien der größte Expressionsanstieg bei ABC-Transportern zu verzeichnen war, die keine bekannte Effluxfunktion für Cisplatin besaßen. Von Interesse waren bei unseren Untersuchungen besonders ABCG2, TAP1 und TAP2. Neben dem Transport von Chemotherapeutika scheinen diese ABC-Transporter noch weitere Funktionen zu besitzen.

##### **TAP-Transporter als Cisplatin-Efflux unabhängige Resistenzvermittler**

In der Literatur wurden widersprüchliche Zusammenhänge der TAP-Expression mit der Zellviabilität diskutiert. Einerseits wurde die niedrige Expression von TAP1 und TAP2 mit der Immunevasion von Tumoren in Zusammenhang gebracht, die sich dadurch der Präsentation des Immunsystems entzogen.<sup>[131]</sup> Auch die Induktion von TAP1 und TAP2 als *down-stream* Ziele von p53 und der damit gesteigerte Transport von MHC-Klasse-I Komplexen konnte gezeigt werden.<sup>[132]</sup> Eine gesteigerte Expression wie in unseren Experimenten könnte diesen Studien zufolge klinisch zu einer besseren Erkennung durch das Immunsystem sorgen. Andererseits wurde in Tumorgewebe wie dem Adenokarzinom des Pankreas<sup>[133]</sup>, dem kolorektalen Karzinom<sup>[134]</sup> und dem Plattenepithelkarzinom des Larynx<sup>[135]</sup> keine signifikante Asso-

ziation zwischen der Herabregulation der beiden TAP-Transporter und einer Prognoseverbesserung festgestellt. Bei Tumoren des Pankreas bestand sogar ein Zusammenhang zwischen hohen Expressionswerten und schlecht differenzierten sowie großen Tumoren.<sup>[133]</sup>

Bisher gibt es wenige Studien zur Expression von TAP-Transportern bei cisplatinresistenten HNSCC-Zellen, wie die von Theile *et al.*, bei der eine Überexpression von TAP1 in Zungenkarzinomzelllinien nachwiesen wurde.<sup>[89]</sup> Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen an unseren Zungenkarzinomzelllinien PCI-9 und PCI-68 überein.

Darüber hinaus stellten Metassa *et al.*<sup>[136]</sup> für TAP1 fest, dass der Transporter in proinflammatorische Signalwege eingeschaltet war. Bei ihren Ovarialkarzinomzelllinien lag TAP1 bei cisplatinresistenten Zelllinien im Vergleich zu den sensitiven Zelllinien stark exprimiert vor. Durch Zunahme der oxidativen Phosphorylierung der cisplatinresistenten Tumorzellen wurden vermehrt proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  ausgeschüttet. Scheurer *et al.*<sup>[137]</sup> konnten bereits bei den von uns verwendeten HNSCC-Zelllinien die Erhöhung dieser proinflammatorischen Zytokine durch den anti-apoptotischen klassischen NF- $\kappa$ B-*Pathway* zeigen. Zelllinien verschiedener Tumorentität zeigten eine Korrelation der NF $\kappa$ B-Aktivität mit Resistenzen gegen Chemotherapeutika wie Cisplatin.<sup>[138]</sup> In ihrer Studie wiesen Metassa *et al.*<sup>[136]</sup> zudem nach, dass der erhöhte Zytokinspiegel zur Überexpression von TAP1 und einer Resistenz gegen Cisplatin führte, die durch Silencing von TAP1 reversibel war.

Die zugrundeliegende Funktion von TAP1 ist noch nicht geklärt, scheint jedoch mit dem Metabolismus und der Entzündungsaktivität zusammenzuhängen.<sup>[136]</sup> Diese Mechanismen sollten weiter untersucht werden und stellen für die Überexpression von TAP1-Transporter in cisplatinresistenten Tumoren einen ersten Ansatz dar.

### **ABCG2-Transporter als Cisplatin-Efflux unabhängige Resistenzvermittler**

Der Transporter ABCG2 gehört neben einigen anderen Transportern wie ABCC1 und ABCB2 zu den Proteinen, die in bestimmten Tumor-Subpopulationen, sogenannten „*side populations*“ (SP), überexprimiert vorkommen. Bei diesen Populationen handelt es sich um Tumorzellen, die bereits für verschiedene Tumorentitäten, auch dem HNSCC, nachgewiesen wurden. Diese besonders resistenten, tumorigenen und invasiven Zellen werden auch als Tumorstammzellen bezeichnet.<sup>[139-141]</sup>

Die SP lassen sich durch eine verringerte Färbung durch den Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 klassifizieren, der hauptsächlich durch ABCG2 aus den Zellen ausgeschleust wird.<sup>[142]</sup>

Die Überexpression von ABCG2 in SP des oralen Plattenepithelkarzinoms zeigte eine deutliche Korrelation mit der Chemoresistenz gegenüber Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel<sup>[143]</sup>. Darüber hinaus wurde ABCG2 bereits für verschiedene Tumorentitäten als potenzielle Oberflächenmarker für SPs beschrieben<sup>[144-147]</sup>. Allerdings wird ABCG2 nicht exklusiv von SP-Zellen, sondern auch in anderen Tumorzellen und gesundem Gewebe exprimiert, weshalb einige Autoren zusätzliche Marker für eine Klassifikation als SP forderten.<sup>[148]</sup>

In ihrer Studie beschrieben Chen *et al.*<sup>[149]</sup> die gesteigerte Proliferation von ABCG2-positiven Zellen als einer der zugrunde liegenden Mechanismen für die Resistenzwirkung in SP-Zellen. Durch Silencing mit spezifischer ABCG2-siRNA konnte ein Zellarrest erreicht werden. Die Autoren vermuteten eine ABCG2 vermittelte Proliferation durch den Abtransport von endogenen Substraten, da eine der Zelllinien nicht mit Zytostatika behandelt wurde. In unseren Untersuchungen konnte ebenfalls ein Proliferationsanstieg in Zellen mit ABCG2-Überexpression nachgewiesen werden. Die Zelllinie PCI-9, die die höchsten ABCG2-Expressionswerte nach Präinkubation mit Cisplatin aufwies, zeigte nach dieser Induktion erhöhte relative Zellzahlen bei geringen Cisplatinkonzentrationen.

Genau wie TAP1 kann ABCG2 ebenfalls NF- $\kappa$ B-*Pathway* vermittelt überexprimiert werden. Die Aktivierung dieser Signalwege kann sowohl durch exogene zytotoxische als auch durch endogene Stimuli getriggert werden.<sup>[150-152]</sup> Dabei scheint die Wirkung auf den Zellstress allerdings gegensätzlich zu der proinflammatorischen Wirkung von TAP1 zu sein. Andere



Untersuchungen legten eine Beteiligung von ABCG2 bei der Bewältigung von oxidativem Stress nahe. Hierbei wurde der Efflux verschiedener toxischer und proinflammatorischer Substanzen durch ABCG2 vermutet.<sup>[153, 154]</sup> In kolorektalen Karzinomzelllinien, die Resistenzen gegen platinbasierte Chemotherapie aufwiesen, konnten Hsu *et al.*<sup>[150]</sup> zeigen, dass durch verstärkte ABCG2 Expression die Stressmarker des endoplasmatischen Retikulums deutlich reduziert vorlagen. Durch Inhibition von ABCG2 waren sowohl die Resistenz als auch die Stressmarkerlevel reversibel.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass TAP1 im Vergleich zu ABCG2, mit zunehmender Inkubationsdauer stärker exprimiert vorlag. Das Expressionsniveau von TAP1 war auch nach einem Cisplatin freien Intervall weiterhin erhöht. Da TAP1 im Kontrast zu ABCG2 in die proinflammatorische Signalkaskade eingeschaltet ist, lies das die Annahme zu, dass gesteigerte Inflammation für die Tumorzellen ein potenziell wichtiger Selektionsfaktor für Resistenzen bei der Inkubation mit Cisplatin sein könnte.

Der Efflux von Chemotherapeutika ist bisher der am besten untersuchte Resistenzmechanismus der ABC-Transporter. Allerdings scheinen diese Transporter Chemoresistenzen beispielsweise auch durch die Bildung von Tumorstammzellen, die proinflammatorische Wirkung oder die Senkung des Zellstress zu vermitteln.

### 4.3 *Limitationen des Studiendesigns*

Eine Übertragung von *in vitro* Studien auf den Organismus ist prinzipiell problematisch, da nur ein kleiner Teil des gesamten Systems untersucht wird. Gerade für Tumorzellen bedeutet das, dass beispielsweise die zuvor beschriebenen Wechselwirkungen wie Inflammation durch die Abwesenheit des Immunsystems nicht endgültig geklärt werden können. Dennoch ermöglichen diese Untersuchungen die Erstellung von Modellen, die später in Tierversuchen oder klinischen Studien verifiziert werden können. Im Folgenden sollen das Design und die Durchführung der vorliegenden Studie diskutiert werden.

Die für die Zytotoxizitätstests verwendeten Kristallviolett-Assays stellen eine seit Langem etablierte gut untersuchte Methode zur Zellviabilitätsprüfung dar.<sup>[155]</sup> Ihre Vorteile sind dabei ein hoher Durchsatz an Assays, die Möglichkeit der Lagerung und verlässliche Ergebnisse bei relativ geringen Zellzahlen.<sup>[156]</sup> Da für die Untersuchung der Zellviabilität verschiedene Inkubationszeiten und verschiedene Cisplatin Dosen getestet wurden, mussten viele Zytotoxizitätstests mit den fünf Zelllinien durchgeführt werden. Da PCI-1 und PCI-13 zusätzlich cisplatinempfindlich waren und ihre Zellzahl durch geringe Cisplatinkonzentrationen stark absanken, stellten die Kristallviolett-Assays für diesen Zweck eine gute Messmethode dar.

Allerdings zeigen Kristallviolett-Assays eine Schwäche bei der Untersuchung von Proliferation und Änderung des Metabolismus.<sup>[157]</sup> Derartige Prozesse beeinflussen möglicherweise die Resistenzentwicklung. Aus diesem Grund sollten in weiteren Untersuchungen zusätzlich WST oder MTT Assays durchgeführt werden, da Proliferation und Metabolismus der Zellen von ihnen besser abgebildet werden.

Des Weiteren können nicht-adhärenente Zellen von Kristallviolett-Assays nicht gemessen werden.<sup>[156]</sup> Für Bronchialkarzinomzellen konnte Liang *et al.* zeigen, dass die Expression von ABCG2 mit der von E-Cadherin korrelierte. Eine höhere ABCG2 Expression neigten über EMT zu vermehrter Adhärenz, während niedrigere Expressionen zu verringerter Adhärenz und Zellmigration führten.<sup>[158]</sup> Der Verlust der Zelladhärenz scheint allerdings in den Versuchen der vorliegenden Studie keine Rolle zu spielen, da durch die Inkubation mit Cisplatin bei den Zelllinien PCI-1 und PCI-52, die ABCG2 geringer exprimierten, keine signifikanten Zellviabilitätsveränderungen aufwiesen.

Die in unserer Studie ausgewählten Transporter wurden bereits in verschiedenen Studien in Zusammenhang mit MDR gebracht. Neben den 49 beim Menschen identifizierten ABC-Transportern gibt es noch weitere Transporter, die potenziell mit Resistenzen assoziiert sind.<sup>[89]</sup> Eine Beschränkung auf vielversprechende Kandidaten war darum nötig. Allerdings wurde versucht, auch bisher wenig diskutierte Transporter wie TAP1 einzuschließen.

Die gezeigten Transporterexpressionen sollten in weiteren Untersuchungen verifiziert werden, um nachzuweisen, ob sie nur als Marker für Cisplatinresistenzen einsetzbar sind, oder

direkt Resistenzen verursachen. Einige Autoren konnten durch *knock-down* der von ihnen untersuchten Transporter-Gene die Tumorzellen resensitivieren<sup>[86, 115]</sup>, andere konnten diesen Effekt mit spezifischen Inhibitoren erzielen<sup>[150]</sup>. Für die Klinik ergibt sich ein großes Interesse für den Einsatz solcher Inhibitoren. Durch Identifikation resistenzverursachender Transporter in HNSCC könnte die Chemotherapie in Kombination mit spezifischen Inhibitoren deutlich effektiver eingesetzt werden.

#### 4.4 *Schlussfolgerung*

Die von uns durchgeführte Studie konnte bei keiner der fünf Zelllinien eine Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin nachweisen, weder durch eine gesteigerte Dosis noch über eine Verlängerung der Inkubationszeit. Drei der verwendeten Zelllinien wiesen allerdings eine intrinsisch bestehende Cisplatinresistenz auf.

Diese resistenten Zelllinien zeigten bei der Inkubation mit Cisplatin veränderte Expressionen von bekannten Cisplatin-Efflux-Transportern. Dies lässt darauf schließen, dass diese ABC-Transporter zu den ersten Verteidigungsmechanismen der Zellen gehören, während andere Mechanismen dann im Verlauf an Bedeutung gewinnen. Ebenfalls konnte mit zunehmender Inkubationsdauer eine Überexpression von ABC-Transportern beobachtet werden, deren Substratspektrum Cisplatin nicht umfasste. Allerdings zeigte sich keiner der Transporter in allen resistenten Tumorzellen überexprimiert, weshalb die Chemoresistenz dieser Tumorzelllinien nicht auf einen einzelnen Transporter zurückzuführen war. Diese Transporter scheinen in verschiedener Weise in die Zellfunktionen einzugreifen, weshalb sie weiterer Untersuchungen bedürfen. Die Ergebnisse dieser Studie könnten bei Tumoren mit ähnlichen Expressionsprofilen die Grundlage für zukünftige personalisierte Tumorthherapie darstellen.

## 5 Zusammenfassung

ABC-Transporter sind ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Ziel dieser Studie war es, die Resistenzentwicklung in HNSCC-Zelllinien im Zusammenhang mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen und Inkubationszeiten zu analysieren, sowie die Expression von ABC-Transportern via semi-quantitativer RT-PCR in diesen Zellen zu untersuchen. Die Zellen zeigten dabei keine relevante Resistenzentwicklung im Sinne eines Anstiegs der IC50. Bei drei der Zelllinien konnte jedoch eine hohe intrinsische Cisplatinresistenz beobachtet werden. Diese resistenten Zelllinien wiesen nach Inkubation mit Cisplatin deutlich höhere Expressionswerte für TAP1, TAP2, ABCG2 sowie die ABCC-Transporterfamilie auf. Dabei zeigte sich, dass die Expression der ABCC-Familie mit zunehmender Inkubationsdauer abnahm. TAP1 in PCI-9 und PCI-68 war auch noch nach vierwöchiger Inkubation stark überexprimiert.

Die initiale IC50 dieser Zelllinien lag dabei deutlich über der Plasmakonzentration von Patienten mit Hochdosis-Chemotherapie. Die Expression der Transporter aus der ABCC-Familie ließ die Vermutung zu, dass diese Transporter initial zur Resistenz gegen Cisplatin beitrugen, allerdings mit zunehmender Inkubationsdauer an Bedeutung verloren. Diese Annahme wurde dadurch gestützt, dass die HNSCC-Zelllinien nach einem inkubationsfreien Intervall von vier Wochen im Anschluss an die Inkubation mit Cisplatin deutliche Überexpressionen der ABCC-Transporterfamilie zeigten. Auch für Transporter (ABCG2 und TAP-Transporter), die keine Effluxfunktion für Cisplatin besitzen, konnte ein Zusammenhang der Expression mit der Resistenz der HNSCC-Zellen beobachtet werden. Der Beitrag dieser Transporter zur Resistenz von Tumorzellen könnte über deren Funktionen im Metabolismus von Tumorzellen, deren Fähigkeiten Tumorstammzellen zu bilden und dem Efflux endogener Zellstress verursachender Substrate erklärt werden. Allerdings werden diese Transporter erst seit kurzem mit Resistenzen gegen Cisplatin in Verbindung gebracht. Aufbauend auf diese Studie wäre eine Verifizierung der Kausalität des Resistenzmechanismus durch *knock-down* und Inhibition der von uns untersuchten Transporter sinnvoll.

## 6 Literaturverzeichnis

1. F B., et al.: *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*; In: CA: a cancer journal for clinicians, 68 (6), 2018
2. Bray F., et al.: *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*; In: CA Cancer J Clin, 68 (6), S. 394-424, 2018
3. Kamangar F., G.M. Dores und W.F. Anderson: *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*; In: J Clin Oncol, 24 (14), S. 2137-2150, 2006
4. Dr. Peter Kaatsch D.C.S., Prof. Dr. Alexander Katalinic et al, *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V: Berlin.
5. Dr. Peter Kaatsch D.C.S., Prof. Dr. Alexander Katalinic et al, *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 2013, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V: Berlin.
6. Simard E.P., L.A. Torre und A. Jemal: *International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site*; In: Oral Oncol, 50 (5), S. 387-403, 2014
7. DE J., et al.: *Head and neck squamous cell carcinoma*; In: Nature reviews. Disease primers, 6 (1), 2020
8. Ragin C.C., F. Modugno und S.M. Gollin: *The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus*; In: J Dent Res, 86 (2), S. 104-114, 2007
9. Majchrzak E., et al.: *Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature*; In: Radiol Oncol, 48 (1), S. 1-10, 2014
10. Pulte D. und H. Brenner: *Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis*; In: Oncologist, 15 (9), S. 994-1001, 2010
11. Sturgis E.M. und P.M. Cinciripini: *Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers?*; In: Cancer, 110 (7), S. 1429-1435, 2007
12. Horch D.D.H.-H., et al.: *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*; Vol. 4. Auflage. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2006:670-751
13. Rodgers L.W., et al.: *Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth*; In: Head Neck, 15 (1), S. 16-19, 1993
14. Levendag P.C., et al.: *Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck*; In: Am J Clin Oncol, 19 (5), S. 469-477, 1996
15. Brady L.W. und C.A. Perez: *Perez and Brady's: Principles and Practice of Radiation Oncology*; Vol. 5th. Lippincott Williams & Wilkins, 2007
16. Duncan W., et al.: *Adverse effect of treatment gaps in the outcome of radiotherapy for laryngeal cancer*; In: Radiother Oncol, 41 (3), S. 203-207, 1996
17. Ang K.K., et al.: *Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer*; In: Int J Radiat Oncol Biol Phys, 51 (3), S. 571-578, 2001
18. Awwad H.K., et al.: *Accelerated hyperfractionation (AHF) compared to conventional fractionation (CF) in the postoperative radiotherapy of locally advanced head and neck cancer: influence of proliferation*; In: Br J Cancer, 86 (4), S. 517-523, 2002

19. Holleb A.I., et al.: *American Cancer Society textbook of clinical oncology*, American Chemical Society, 1991
20. Schmoll H.J., K. Höffken und K. Possinger: *Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie: Teil I: Epidemiologie, Tumorbiologie, Zytostatika, Prinzipien der Tumortherapie, Supportive Maßnahmen. Teil II: Therapiekonzepte maligner Tumoren. Teil III: Indikationen und Therapiekonzepte Kurzversion*, Springer Berlin Heidelberg, 2009
21. Blanchard P., et al.: *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site*; In: *Radiother Oncol*, 100 (1), S. 33-40, 2011
22. El-Sayed S. und N. Nelson: *Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta-analysis of prospective and randomized trials*; In: *J Clin Oncol*, 14 (3), S. 838-847, 1996
23. Bachaud J.M., et al.: *Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck carcinoma: final report of a randomized trial*; In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 36 (5), S. 999-1004, 1996
24. Bernier J., et al.: *Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501)*; In: *Head Neck*, 27 (10), S. 843-850, 2005
25. Galluzzi L., et al.: *Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future*; In: *Cell Death Dis*, 5 S. e1257, 2014
26. Budach W., et al.: *A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*; In: *BMC Cancer*, 6 S. 28, 2006
27. Burri R.J. und N.Y. Lee: *Concurrent chemotherapy and radiotherapy for head and neck cancer*; In: *Expert Rev Anticancer Ther*, 9 (3), S. 293-302, 2009
28. Parsons J.T., et al.: *An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity*; In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 39 (1), S. 137-148, 1997
29. Nieuwenhuis E.J., et al.: *Assessment and clinical significance of micrometastases in lymph nodes of head and neck cancer patients detected by E48 (Ly-6D) quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*; In: *Lab Invest*, 83 (8), S. 1233-1240, 2003
30. Postow M.A., M.K. Callahan und J.D. Wolchok: *Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy*; In: *J Clin Oncol*, 33 (17), S. 1974-1982, 2015
31. Sunshine J. und J.M. Taube: *PD-1/PD-L1 inhibitors*; In: *Curr Opin Pharmacol*, 23 S. 32-38, 2015
32. Keir M.E., et al.: *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*; In: *Annu Rev Immunol*, 26 S. 677-704, 2008
33. McDermott D.F. und M.B. Atkins: *PD-1 as a potential target in cancer therapy*; In: *Cancer Med*, 2 (5), S. 662-673, 2013
34. J B.: *The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab*; In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 37 Suppl 4 2001
35. Ferris R.L., et al.: *Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*; In: *N Engl J Med*, 375 (19), S. 1856-1867, 2016
36. Burtneß B., et al.: *Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study*; In: *Lancet*, 394 (10212), S. 1915-1928, 2019

37. Wu Q., et al.: *Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches*; In: *Cancer Lett*, 347 (2), S. 159-166, 2014
38. Szakács G., et al.: *Targeting multidrug resistance in cancer*; In: *Nat Rev Drug Discov*, 5 (3), S. 219-234, 2006
39. Hiddemann W., C.R. Bartram und H. Huber: *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie; Teil 2: Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien*, Springer Berlin Heidelberg, S. 410-412, 2013
40. Gottesman M.M.: *Mechanisms of cancer drug resistance*; In: *Annu Rev Med*, 53 S. 615-627, 2002
41. Theodoulou F.L. und I.D. Kerr: *ABC transporter research: going strong 40 years on*; In: *Biochem Soc Trans*, 43 (5), S. 1033-1040, 2015
42. Higgins C.F.: *Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters*; In: *Nature*, 446 (7137), S. 749-757, 2007
43. Khunweeraphong N., T. Stockner und K. Kuchler: *The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion*; In: *Sci Rep*, 7 (1), S. 13767, 2017
44. Sheps J.A., et al.: *The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes*; In: *Genome Biol*, 5 (3), S. R15, 2004
45. Rees D.C., E. Johnson und O. Lewinson: *ABC transporters: the power to change*; In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (3), S. 218-227, 2009
46. Juliano R.L. und V. Ling: *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*; In: *Biochim Biophys Acta*, 455 (1), S. 152-162, 1976
47. Riordan J.R. und V. Ling: *Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability*; In: *J Biol Chem*, 254 (24), S. 12701-12705, 1979
48. Lage H.: *ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers*; In: *Int J Antimicrob Agents*, 22 (3), S. 188-199, 2003
49. Fletcher J.I., et al.: *ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps*; In: *Nat Rev Cancer*, 10 (2), S. 147-156, 2010
50. Jones P.M. und A.M. George: *Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record*; In: *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48 (1), S. 39-50, 2013
51. Wilkens S.: *Structure and mechanism of ABC transporters*; In: *F1000Prime Rep*, 7 S. 14, 2015
52. Higgins C.F., et al.: *A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria*; In: *Nature*, 323 (6087), S. 448-450, 1986
53. Karpowich N., et al.: *Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter*; In: *Structure*, 9 (7), S. 571-586, 2001
54. Yuan Y.R., et al.: *The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter*; In: *J Biol Chem*, 276 (34), S. 32313-32321, 2001
55. Damas J.M., et al.: *Structural consequences of ATP hydrolysis on the ABC transporter NBD dimer: molecular dynamics studies of HlyB*; In: *Protein Sci*, 20 (7), S. 1220-1230, 2011
56. Xiong J., et al.: *Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily*; In: *Sci Rep*, 5 S. 16724, 2015

57. Dean M. und T. Annilo: *Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates*; In: Annu Rev Genomics Hum Genet, 6 S. 123-142, 2005
58. Qu Q., P.L. Russell und F.J. Sharom: *Stoichiometry and affinity of nucleotide binding to P-glycoprotein during the catalytic cycle*; In: Biochemistry, 42 (4), S. 1170-1177, 2003
59. Biemans-Oldehinkel E., M.K. Doeven und B. Poolman: *ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains*; In: FEBS Lett, 580 (4), S. 1023-1035, 2006
60. Oldham M.L. und J. Chen: *Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis*; 2011
61. Jones P.M. und A.M. George: *Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit*; In: Proc Natl Acad Sci U S A, 99 (20), S. 12639-12644, 2002
62. van Veen H.W., et al.: *The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism*; In: Embo j, 19 (11), S. 2503-2514, 2000
63. Wilkens S., *Structure and mechanism of ABC transporters*, in F1000Prime Rep. 2015.
64. Allen J.D., et al.: *The Mouse Bcrp1/Mxr/Abcp Gene*; 1999
65. Dean M., A. Rzhetsky und R. Allikmets: *The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily*; 2001
66. Pan S.T., et al.: *Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy*; In: Clin Exp Pharmacol Physiol, 43 (8), S. 723-737, 2016
67. Gottesman M.M., T. Fojo und S.E. Bates: *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*; In: Nature Reviews Cancer, 2 (1), S. 48, 2002
68. Boumendjel A., J. Boutonnat und J. Robert: *ABC Transporters and Multidrug Resistance*, Wiley, 2009
69. Guminski A.D., et al.: *MRP2 (ABCC2) and cisplatin sensitivity in hepatocytes and human ovarian carcinoma*; In: Gynecol Oncol, 100 (2), S. 239-246, 2006
70. Choi C.H., *ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal*, in Cancer Cell Int. 2005. S. 30.
71. Weaver D.A., et al.: *ABCC5, ERCC2, XPA and XRCC1 transcript abundance levels correlate with cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cell lines*; In: Mol Cancer, 4 (1), S. 18, 2005
72. Kamazawa S., et al.: *Cellular efflux pump and interaction between cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer cells*; In: Oncology, 59 (4), S. 329-335, 2000
73. Guo Y., et al.: *MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine*; In: J Biol Chem, 278 (32), S. 29509-29514, 2003
74. Jedlitschky G., B. Burchell und D. Keppler: *The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides*; In: J Biol Chem, 275 (39), S. 30069-30074, 2000
75. Pratt S., et al.: *The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites*; In: Mol Cancer Ther, 4 (5), S. 855-863, 2005
76. Oguri T., et al.: *MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil*; In: Mol Cancer Ther, 6 (1), S. 122-127, 2007
77. Ren L., L. Xiao und J. Hu: *MDR1 and MDR3 genes and drug resistance to cisplatin of ovarian cancer cells*; In: J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 27 (6), S. 721-724, 2007



78. Hu H., et al.: *Loss of ABCB4 attenuates the caspase-dependent apoptosis regulating resistance to 5-Fu in colorectal cancer*; In: Biosci Rep, 38 (1), 2018
79. Kiehl S., et al., *ABCB4 is frequently epigenetically silenced in human cancers and inhibits tumor growth*, in *Sci Rep*. 2014.
80. Hlavata I., et al.: *The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer*; In: Mutagenesis, 27 (2), S. 187-196, 2012
81. Nies A.T., et al.: *Role of ABC transporters in fluoropyrimidine-based chemotherapy response*; In: Adv Cancer Res, 125 S. 217-243, 2015
82. Stronach E.A., et al.: *HDAC4-regulated STAT1 activation mediates platinum resistance in ovarian cancer*; In: Cancer Res, 71 (13), S. 4412-4422, 2011
83. Ortmann B., M.J. Androlewicz und P. Cresswell: *MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding*; In: Nature, 368 (6474), S. 864, 1994
84. Ricciardelli C., et al.: *Chemotherapy-induced hyaluronan production: a novel chemoresistance mechanism in ovarian cancer*; In: BMC Cancer, 13 S. 476, 2013
85. Auner V., et al.: *ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue*; In: Gynecol Oncol, 117 (2), S. 198-201, 2010
86. Zhao L., et al.: *Deregulation of the miR-222-ABCG2 regulatory module in tongue squamous cell carcinoma contributes to chemoresistance and enhanced migratory/invasive potential*; In: Oncotarget, 6 (42), S. 44538-44550, 2015
87. Zhang P., et al.: *Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes*; In: Cancer Lett, 277 (2), S. 227-234, 2009
88. Yanamoto S., et al.: *Expression of the cancer stem cell markers CD44v6 and ABCG2 in tongue cancer: effect of neoadjuvant chemotherapy on local recurrence*; In: Int J Oncol, 44 (4), S. 1153-1162, 2014
89. Theile D., et al.: *Evaluation of drug transporters' significance for multidrug resistance in head and neck squamous cell carcinoma*; In: Head Neck, 33 (7), S. 959-968, 2011
90. Heo D.S., et al.: *Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines*; In: Cancer Res, 49 (18), S. 5167-5175, 1989
91. Lansford C.D., et al., *Head and Neck Cancers*, in *Human Cell Culture: Cancer Cell Lines Part 2*, J.R.W. Masters, B. Palsson, Editors. 2002, Springer Netherlands: Dordrecht. S. 185-255.
92. Brands R.C., et al.: *Multi-kinase inhibitors and cisplatin for head and neck cancer treatment in vitro*; In: Oncol Lett, 18 (3), S. 2220-2231, 2019
93. Foo J. und F. Michor: *Evolution of acquired resistance to anti-cancer therapy*; In: J Theor Biol, 0 S. 10-20, 2014
94. Misale S., et al.: *Emergence of*; In: Nature, 486 (7404), S. 532, 2012
95. Turke A.B., et al.: *Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC*; In: Cancer Cell, 17 (1), S. 77-88, 2010
96. Cooke S.L., et al.: *Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma*; In: Oncogene, 29 (35), S. 4905, 2010
97. Housman G., et al., *Drug Resistance in Cancer: An Overview*, in *Cancers (Basel)*. 2014. S. 1769-1792.
98. RC B., et al.: *Co-treatment of wild-type EGFR head and neck cancer cell lines with afatinib and cisplatin*; In: Molecular medicine reports, 13 (3), 2016
99. Knierim M.L., *Efficacy of tyrosine kinase inhibitors in combination chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil oral Squamous cell carcinoma in vitro*, in *Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie*. 2019, Universität Würzburg.

100. Facompre N., et al.: *Stem-like cells and therapy resistance in squamous cell carcinomas*; In: *Adv Pharmacol*, 65 S. 235-265, 2012
101. Okamoto A., et al.: *Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck*; In: *Oral Oncol*, 45 (7), S. 633-639, 2009
102. Fogarty C.E. und A. Bergmann: *Killers creating new life: caspases drive apoptosis-induced proliferation in tissue repair and disease*; In: *Cell Death and Differentiation*, 24 (8), S. 1390, 2017
103. Huang Q., et al.: *Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy*; In: *Nat Med*, 17 (7), S. 860-866, 2011
104. Himmelstein K.J., et al.: *Clinical kinetics on intact cisplatin and some related species*; In: *Clin Pharmacol Ther*, 29 (5), S. 658-664, 1981
105. Corden B.J., et al.: *Clinical pharmacology of high-dose cisplatin*; In: *Cancer Chemother Pharmacol*, 14 (1), S. 38-41, 1985
106. Souid A.K., et al.: *Phase I clinical and pharmacologic study of weekly cisplatin and irinotecan combined with amifostine for refractory solid tumors*; In: *Clin Cancer Res*, 9 (2), S. 703-710, 2003
107. Almeida L.O., et al.: *NFkappaB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*; In: *FEBS Open Bio*, 4 S. 96-104, 2014
108. Yang Z., et al.: *Regulation of cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma by the SRC/ETS-1 signaling pathway*; In: *BMC Cancer*, 19 (1), S. 485, 2019
109. Leonard G.D., T. Fojo und S.E. Bates: *The role of ABC transporters in clinical practice*; In: *Oncologist*, 8 (5), S. 411-424, 2003
110. Lou H. und M. Dean: *Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters*; In: *Oncogene*, 26 (9), S. 1357-1360, 2007
111. Chen Z.S. und A.K. Tiwari: *Multidrug Resistance Proteins (MRPs/ABCCs) in Cancer Chemotherapy and Genetic Diseases*; In: *FEBS J*, 278 (18), S. 3226-3245, 2011
112. Tonigold M., et al.: *A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53(mut) exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels*; In: *J Cancer Res Clin Oncol*, 140 (10), S. 1689-1704, 2014
113. Negro K., et al.: *Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line, KB-R, derived from oral carcinoma cell line, KB*; In: *Int J Oncol*, 30 (6), S. 1325-1332, 2007
114. Ghosh R.D., et al.: *MicroRNA profiling of cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines enriched with cancer-stem-cell-like and epithelial-mesenchymal transition-type features*; In: *Sci Rep*, 6 S. 23932, 2016
115. Beretta G.L., et al.: *Increased levels and defective glycosylation of MRPs in ovarian carcinoma cells resistant to oxaliplatin*; In: *Biochem Pharmacol*, 79 (8), S. 1108-1117, 2010
116. Zhao Y., et al.: *ABCC3 as a marker for multidrug resistance in non-small cell lung cancer*; In: *Scientific Reports*, 3 S. 3120, 2013
117. Oguri T., et al.: *Association between expression of the MRP3 gene and exposure to platinum drugs in lung cancer*; In: *Int J Cancer*, 93 (4), S. 584-589, 2001
118. Kelly A., et al.: *Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex*; In: *Nature*, 355 (6361), S. 641, 2019
119. Gillet J.P., et al.: *Multidrug resistance-linked gene signature predicts overall survival of patients with primary ovarian serous carcinoma*; In: *Clin Cancer Res*, 18 (11), S. 3197-3206, 2012

120. Xie S.L., et al.: *SOX8 regulates cancer stem-like properties and cisplatin-induced EMT in tongue squamous cell carcinoma by acting on the Wnt/beta-catenin pathway*; In: *Int J Cancer*, 142 (6), S. 1252-1265, 2018
121. Ota N., et al.: *In vitro and in vivo expression of aldehyde dehydrogenase 1 in oral squamous cell carcinoma*; In: *International Journal of Oncology*, 44 (2), S. 435-442, 2013
122. Tsai L.L., et al.: *Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma*; In: *J Oral Pathol Med*, 40 (8), S. 621-628, 2011
123. Karthikeyan C., et al.: *Pyrimido[1'',2'':1,5]pyrazolo[3,4-b]quinolines: Novel compounds that reverse ABCG2-mediated resistance in cancer cells*; In: *Cancer Lett*, 376 (1), S. 118-126, 2016
124. Horsey A., et al., *The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers*, in *Biochem Soc Trans*. 2016. S. 824-830.
125. Campa D., et al.: *A comprehensive study of polymorphisms in ABCB1, ABCC2 and ABCG2 and lung cancer chemotherapy response and prognosis*; In: *Int J Cancer*, 131 (12), S. 2920-2928, 2012
126. Borst P., et al.: *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*; In: *J Natl Cancer Inst*, 92 (16), S. 1295-1302, 2000
127. Smith A.J., et al.: *MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping*; In: *J Biol Chem*, 275 (31), S. 23530-23539, 2000
128. Xu J., et al.: *Multidrug resistant lncRNA profile in chemotherapeutic sensitive and resistant ovarian cancer cells*; In: *J Cell Physiol*, 233 (6), S. 5034-5043, 2018
129. van der Blik A.M., et al.: *Sequence of mdr3 cDNA encoding a human P-glycoprotein*; In: *Gene*, 71 (2), S. 401-411, 1988
130. Childs S., et al.: *Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein*; In: *Cancer Res*, 58 (18), S. 4160-4167, 1998
131. Johnsen A.K., et al.: *Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis*; In: *J Immunol*, 163 (8), S. 4224-4231, 1999
132. Zhu K., et al.: *p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides*; In: *Oncogene*, 18 (54), S. 7740, 1999
133. Mohelnikova-Duchonova B., et al.: *Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues*; In: *Pancreas*, 42 (4), S. 707-716, 2013
134. Kasajima A., et al.: *Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer*; In: *Hum Pathol*, 41 (12), S. 1758-1769, 2010
135. Ogino T., et al.: *HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker*; In: *Cancer Res*, 66 (18), S. 9281-9289, 2006
136. Matassa D.S., et al.: *Oxidative metabolism drives inflammation-induced platinum resistance in human ovarian cancer*; In: *Cell Death and Differentiation*, 23 (9), S. 1542, 2016
137. Scheurer M.J.J., et al., *The Selection of NFkB Inhibitors to Block Inflammation and Induce Sensitisation to FasL-Induced Apoptosis in HNSCC Cell Lines Is Critical for Their Use as a Prospective Cancer Therapy*, in *Int J Mol Sci*. 2019.
138. Chuang S.E., et al.: *Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells*; In: *Biochem Pharmacol*, 63 (9), S. 1709-1716, 2002

139. Keysar S. und A. Jimeno: *More than markers: biological significance of cancer stem cell defining-molecules*; In: *Mol Cancer Ther*, 9 (9), S. 2450-2457, 2010
140. Loebinger M.R., et al.: *Squamous cell cancers contain a side population of stem-like cells that are made chemosensitive by ABC transporter blockade*; In: *Br J Cancer*, 98 (2), S. 380-387, 2008
141. Hu J., et al.: *Expression of the cancer stem cell markers ABCG2 and OCT-4 in right-sided colon cancer predicts recurrence and poor outcomes*; In: *Oncotarget*, 8 (17), S. 28463-28470, 2017
142. Wu C. und B.A. Alman: *Side population cells in human cancers*; In: *Cancer Lett*, 268 (1), S. 1-9, 2008
143. Lim Y.C., et al.: *Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas*; In: *Oral Oncol*, 47 (2), S. 83-91, 2011
144. Ding X.W., J.H. Wu und C.P. Jiang: *ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy*; In: *Life Sci*, 86 (17-18), S. 631-637, 2010
145. Wang D., J.T.M. Plukker und R.P. Coppes: *Cancer stem cells with increased metastatic potential as a therapeutic target for esophageal cancer*; In: *Semin Cancer Biol*, 44 S. 60-66, 2017
146. Wang M., Y. Wang und J. Zhong: *Side population cells and drug resistance in breast cancer*; In: *Mol Med Rep*, 11 (6), S. 4297-4302, 2015
147. Yanamoto S., et al.: *Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells*; In: *Oral Oncol*, 47 (9), S. 855-860, 2011
148. Krishnamurthy P., et al.: *The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme*; In: *J Biol Chem*, 279 (23), S. 24218-24225, 2004
149. Chen Z., et al.: *Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation*; In: *Int J Cancer*, 126 (4), S. 841-851, 2010
150. Hsu H.H., et al.: *Oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells is mediated via activation of ABCG2 to alleviate ER stress induced apoptosis*; In: *J Cell Physiol*, 233 (7), S. 5458-5467, 2018
151. Hopper-Borge E.A., et al.: *Mechanisms of tumor resistance to EGFR-targeted therapies*; In: *Expert Opin Ther Targets*, 13 (3), S. 339-362, 2009
152. Ke S.Z., et al.: *Camptothecin and cisplatin upregulate ABCG2 and MRP2 expression by activating the ATM/NF-kappaB pathway in lung cancer cells*; In: *Int J Oncol*, 42 (4), S. 1289-1296, 2013
153. Nie S., et al.: *Protective role of ABCG2 against oxidative stress in colorectal cancer and its potential underlying mechanism*; In: *Oncol Rep*, 40 (4), S. 2137-2146, 2018
154. Singh A., et al.: *Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype*; In: *Mol Cancer Ther*, 9 (8), S. 2365-2376, 2010
155. Flick D.A. und G.E. Gifford: *Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor*; In: *J Immunol Methods*, 68 (1-2), S. 167-175, 1984
156. Feoktistova M., P. Geserick und M. Leverkus: *Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells*; In: *Cold Spring Harb Protoc*, 2016 (4), S. pdb prot087379, 2016
157. Sliwka L., et al.: *The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions*; In: *PLoS One*, 11 (5), S. e0155772, 2016
158. Liang S.C., et al.: *ABCG2 localizes to the nucleus and modulates CDH1 expression in lung cancer cells*; In: *Neoplasia*, 17 (3), S. 265-278, 2015

## Appendix

### Appendix 1: PCI-1 Transporterexpression normalized to control nach Inkubation mit IC20 Cisplatin (n=2)

Transporter	Inkubationszeit	MW	68 % - CI	
ABCG2	24 h	0,154	0,147	0,160
	48 h	0,196	0,089	0,367
	4 Wochen	1,362	1,101	1,661
ABCC5	24 h	0,968	0,749	1,227
	48 h	0,950	0,947	0,953
	4 Wochen	1,025	0,848	1,225
ABCC4	24 h	0,714	0,711	0,718
	48 h	0,748	0,710	0,787
	4 Wochen	0,931	0,744	1,148
ABCC3	24 h	0,640	0,500	0,804
	48 h	1,030	0,947	1,117
	4 Wochen	0,618	0,472	0,791
ABCC2	24 h	0,754	0,589	0,948
	48 h	0,510	0,451	0,573
	4 Wochen	1,245	0,943	1,606
ABCC1	24 h	0,876	0,797	0,960
	48 h	0,905	0,642	1,230
	4 Wochen	1,050	0,910	1,205
ABCB11	24 h	0,909	0,444	1,619
	48 h	1,785	0,520	4,266
	4 Wochen	0,762	0,617	0,928
ABCB4	24 h	0,565	0,242	1,093
	48 h	0,840	0,353	1,644
	4 Wochen	1,491	1,296	1,704
Tap2	24 h	1,012	0,792	1,270
	48 h	1,231	1,161	1,304
	4 Wochen	0,577	0,527	0,631
Tap1	24 h	0,560	0,416	0,736
	48 h	1,235	0,892	1,657
	4 Wochen	0,282	0,246	0,321
ABCB1	24 h	0,750	0,641	0,871
	48 h	1,291	0,871	1,827
	4 Wochen	1,592	1,259	1,980
ABCA2	24 h	0,677	0,516	0,868
	48 h	1,439	1,385	1,495
	4 Wochen	0,210	0,195	0,224

**Appendix 2:** PCI-13 Transporterexpression normalized to control nach Inkubation mit IC20 Cisplatin (n=2)

Transporter	Inkubationszeit	MW	68 % - CI	
ABCG2	24 h	1,545	1,048	2,180
	48 h	1,107	0,565	1,917
	4 Wochen	1,245	1,110	1,392
ABCC5	24 h	0,230	0,015	0,939
	48 h	1,422	0,836	2,233
	4 Wochen	0,711	0,509	0,961
ABCC4	24 h	0,574	0,454	0,714
	48 h	2,177	1,143	3,700
	4 Wochen	0,734	0,707	0,762
ABCC3	24 h	0,470	0,179	0,977
	48 h	1,747	0,810	3,218
	4 Wochen	0,413	0,315	0,529
ABCC2	24 h	1,673	1,136	2,357
	48 h	1,791	1,713	1,872
	4 Wochen	0,657	0,603	0,714
ABCC1	24 h	0,538	0,300	0,879
	48 h	1,849	1,808	1,890
	4 Wochen	0,700	0,578	0,837
ABCB11	24 h	1,241	1,049	1,456
	48 h	2,964	2,120	4,007
	4 Wochen	0,220	0,163	0,289
ABCB4	24 h	0,245	0,000	1,963
	48 h	0,569	0,000	4,552
	4 Wochen	0,278	0,264	0,292
Tap2	24 h	0,685	0,596	0,782
	48 h	1,824	1,603	2,065
	4 Wochen	1,464	1,444	1,484
Tap1	24 h	0,726	0,536	0,958
	48 h	1,830	1,332	2,438
	4 Wochen	1,709	1,397	2,065
ABCB1	24 h	0,338	0,044	1,131
	48 h	1,081	0,259	2,832
	4 Wochen	1,003	0,763	1,288
ABCA2	24 h	0,733	0,730	0,736
	48 h	2,967	2,597	3,371
	4 Wochen	0,388	0,255	0,560

**Appendix 3:** PCI-9 Transporterexpression normalized to control nach Inkubation mit IC20 Cisplatin (n=2)

Transporter	Inkubationszeit	MW	68 % - CI	
ABCG2	24 h	5,524	4,661	6,489
	48 h	2,406	2,386	2,426
	4 Wochen	5,465	4,845	6,137
ABCC5	24 h	1,157	0,818	1,579
	48 h	0,342	0,305	0,382
	4 Wochen	0,509	0,392	0,648
ABCC4	24 h	1,775	1,491	2,093
	48 h	0,830	0,620	1,083
	4 Wochen	1,913	1,579	2,291
ABCC3	24 h	1,738	1,581	1,905
	48 h	0,787	0,627	0,971
	4 Wochen	0,839	0,610	1,119
ABCC2	24 h	2,766	2,589	2,951
	48 h	1,031	0,816	1,280
	4 Wochen	2,000	1,651	2,394
ABCC1	24 h	1,728	1,450	2,040
	48 h	0,957	0,683	1,296
	4 Wochen	1,236	1,020	1,480
ABCB11	24 h	0,598	0,000	4,785
	48 h	0,161	0,000	1,290
	4 Wochen	0,115	0,074	0,169
ABCB4	24 h	0,040	0,000	0,318
	48 h	0,010	0,000	0,081
	4 Wochen	0,000	0,000	0,000
Tap2	24 h	2,665	1,832	3,720
	48 h	2,237	1,640	2,963
	4 Wochen	2,191	2,035	2,354
Tap1	24 h	3,391	2,801	4,058
	48 h	3,346	3,275	3,419
	4 Wochen	4,255	3,755	4,797
ABCB1	24 h	0,006	0,000	0,046
	48 h	0,008	0,000	0,063
	4 Wochen	0,088	0,086	0,090
ABCA2	24 h	2,306	1,861	2,818
	48 h	1,305	1,154	1,468
	4 Wochen	0,899	0,775	1,035

**Appendix 4:** PCI-52 Transporterexpression normalized to control nach Inkubation mit IC20 Cisplatin (n=2)

Transporter	Inkubationszeit	MW	68 % - CI	
ABCG2	24 h	0,831	0,119	2,677
	48 h	0,724	0,035	3,162
	4 Wochen	1,476	1,322	1,642
ABCC5	24 h	1,081	0,475	2,057
	48 h	2,471	0,757	5,760
	4 Wochen	0,498	0,494	0,503
ABCC4	24 h	0,146	0,000	1,168
	48 h	2,550	1,697	3,648
	4 Wochen	1,338	1,272	1,406
ABCC3	24 h	0,784	0,548	1,081
	48 h	2,527	2,071	3,046
	4 Wochen	0,870	0,683	1,088
ABCC2	24 h	0,965	0,542	1,565
	48 h	2,399	1,578	3,466
	4 Wochen	0,783	0,726	0,843
ABCC1	24 h	1,415	1,192	1,663
	48 h	2,321	2,169	2,479
	4 Wochen	1,007	0,972	1,042
ABCB11	24 h	0,230	0,225	0,236
	48 h	0,455	0,250	0,747
	4 Wochen	0,021	0,016	0,025
ABCB4	24 h	1,176	0,037	5,614
	48 h	2,199	0,107	9,614
	4 Wochen	0,001	0,000	0,008
Tap2	24 h	2,436	1,784	3,230
	48 h	3,658	1,948	6,157
	4 Wochen	1,052	0,941	1,171
Tap1	24 h	1,980	1,560	2,470
	48 h	3,205	2,118	4,612
	4 Wochen	0,956	0,672	1,309
ABCB1	24 h	0,000	0,000	0,001
	48 h	0,000	0,000	0,000
	4 Wochen	0,000	0,000	0,000
ABCA2	24 h	0,708	0,470	1,014
	48 h	1,506	1,177	1,892
	4 Wochen	0,835	0,607	1,113



**Appendix 5:** PCI-68 Transporterexpression normalized to control nach Inkubation mit IC20 Cisplatin (n=2)

Transporter	Inkubationszeit	MW	68 % - CI	
ABCG2	24 h	2,541	1,642	3,720
	48 h	4,901	3,442	6,724
	4 Wochen	1,265	1,062	1,491
ABCC5	24 h	0,692	0,471	0,974
	48 h	2,676	1,184	5,078
	4 Wochen	1,337	1,282	1,394
ABCC4	24 h	0,487	0,240	0,864
	48 h	1,962	0,631	4,458
	4 Wochen	1,944	1,937	1,952
ABCC3	24 h	1,428	1,076	1,849
	48 h	6,485	5,858	7,155
	4 Wochen	2,597	2,181	3,063
ABCC2	24 h	0,515	0,131	1,314
	48 h	2,222	0,327	7,089
	4 Wochen	0,792	0,683	0,911
ABCC1	24 h	0,806	0,683	0,943
	48 h	3,999	2,612	5,806
	4 Wochen	1,517	1,449	1,587
ABCB11	24 h	0,394	0,000	3,149
	48 h	2,927	0,324	10,273
	4 Wochen	1,560	1,307	1,844
ABCB4	24 h	0,000	0,000	0,000
	48 h	0,000	0,000	0,000
	4 Wochen	0,000	0,000	0,000
Tap2	24 h	0,738	0,296	1,485
	48 h	2,711	0,462	8,191
	4 Wochen	2,683	2,628	2,738
Tap1	24 h	1,622	1,176	2,167
	48 h	8,816	3,572	17,638
	4 Wochen	3,475	3,269	3,690
ABCB1	24 h	0,099	0,000	0,792
	48 h	1,605	0,000	12,841
	4 Wochen	2,509	2,000	3,096
ABCA2	24 h	0,532	0,265	0,937
	48 h	3,736	1,444	7,682
	4 Wochen	0,964	0,942	0,988

## I. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
5-FU	5-Fluoruracil
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Ca	Karzinom
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CT	Computertomographie
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
GIT	Gastrointestinale Tumoren
h	Stunde(n)
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	humanes Papillomavirus
IC	<i>inhibitory concentration</i>
IL-6	Interleukin-6
M	Molarität (mol/l)
MDR	<i>Multidrug-Resistance</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mol	Stoffmenge
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl der Wiederholungen
NBD	Nukleotid-bindenden-Domänen
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'</i>
nm	Nanometer

NSLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
FDG-PET	Positronen-Emissions-Tomographie
P-gp	P-Glykoprotein
Rb	Retinoblastom-Protein
Ref.	Referenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde(n)
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
SD	<i>standard deviation</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP	<i>side population</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TMD	Transmembrandomänen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UICC	<i>union internationale contre le cancer</i>
Vol.-%	Volumenprozent

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modelle verschiedener ABC-Transporter Typen .....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung des ABC-Transporter-Mechanismus.....	8
Abbildung 3: Schema der Zytotoxizitäts-Assays auf einer 96-Well-Platte .....	19
Abbildung 4: Graphische Darstellung zur Bestimmung der IC50 am Beispiel von PCI-13 ...	23
Abbildung 5: Expressionsanalyse der 12 ABC-Transporter mit qRT-PCR.....	26
Abbildung 6: Zytotoxizitätsanalyse der PCI-1.....	31
Abbildung 7: Zytotoxizitätsanalyse der PCI-13.....	32
Abbildung 8: Zytotoxizitätsanalyse der PCI-9.....	33
Abbildung 9: Zytotoxizitätsanalyse der PCI-52.....	34
Abbildung 10: Zytotoxizitätsanalyse an PCI-68 .....	35
Abbildung 11: ABC-Transporterexpression der PCI-1 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatins .....	38
Abbildung 12: ABC-Transporterexpression der PCI-13 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatins .....	38
Abbildung 13: ABC-Transporterexpression der PCI-9 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatins .....	39
Abbildung 14: ABC-Transporterexpression der PCI-52 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatins .....	39
Abbildung 15: ABC-Transporterexpression der PCI-62 nach Präinkubation mit IC20 Cisplatins .....	40
Abbildung 16: Expressionsanalyse der Zellen, die nach vierwöchiger Präinkubation mit der IC20 Cisplatins weitere 4 Wochen mit Medium inkubiert wurden.....	42

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl von ABC-Transportern mit Bezug zu MDR in Tumoren .....	11
Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der verwendeten Zelllinien .....	13
Tabelle 3: Tabellarische Auflistung der verwendeten Primer .....	14
Tabelle 4: Tabellarische Auflistung der verwendeten Medien, Chemikalien und Zusätze ..	15
Tabelle 5: Tabellarische Auflistung der verwendeten Materialien und Instrumente .....	16
Tabelle 6: IC5- und IC20-Werte von Cisplatin in den verwendeten humanen HNSCC-Tumorzelllinien. Analyse nach 72 h Inkubation mit Cisplatin mit n = 3 Wiederholungen...	27
Tabelle 7: Effekt der in vitro Inkubation mit Cisplatin auf die Cisplatinsensitivität der untersuchten Zelllinien. Angegeben ist die Veränderung der IC50 relativ im Vergleich zu den unbehandelten Zellen mit zugehörigen SD (standard deviation). .....	29

#### IV. Danksagung

Mein Dank gilt besonders allen Personen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Dr. Urs Müller-Richter für das Überlassen dieses Themas und der Ermöglichung dieser Dissertation.

Besonders danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Roman C. Brands für seine ausgezeichnete Betreuung und sein intensives Korrekturlesen.

Ebenso danken möchte ich Herrn Dr. Axel Seher für die unermüdliche Betreuung im Labor, das Einarbeiten und Entwickeln der Methodik.

Außerdem möchte ich Frau Dr. Imme Haubitz und Frau Viktoria Rücker für ihre Anregungen und Ratschläge im Bereich der Statistik danken.

Und nicht zuletzt geht mein Dank an Frau Margit Schleyer für ihre umfassende Hilfe und Unterstützung bei der Laborarbeit.

Abschließend möchte ich meiner Familie und Freunden danken, die jederzeit und mit vollem Einsatz für mich da waren.

## V. Lebenslauf

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

## VI. Publikationen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2019 in Oncology Letters veröffentlicht:

Brands RC, De Donno F, Knierim ML, **Steinacker V**, Hartmann S, Seher A, Kübler AC, Müller-Richter UDA. Multi-kinase inhibitors and cisplatin for head and neck cancer treatment *in vitro*. Oncology Letters 2019.

Beiträge zu weiteren Veröffentlichungen:

Brands RC, Knierim ML, De Donno F, **Steinacker V**, Hartmann S, Seher A, Kübler AC, Müller-Richter UDA. Targeting VEGFR and FGFR in head and neck squamous cell carcinoma *in vitro*. Oncology Reports 2017.

Scheurer MJJ, Seher A, **Steinacker V**, Linz C, Hartmann S, Kübler AC et al. Targeting inhibitors of apoptosis in oral squamous cell carcinoma *in vitro*. J Craniomaxillofac Surg. 2019.