

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. M. Canis)

Etablierung eines 3D-Tumormodells für Kopf-Hals-Tumorzelllinien

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Sabine Gstöttner
aus München
2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. Philipp Baumeister

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Hagedorn

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Sven Becker

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2020

**Meiner Familie gewidmet
und insbesondere meinem Sohn Maximilian Ludwig**

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	10
1.1. Kopf-und Halstumore	10
1.1.1. Epidemiologie & Ätiologie	10
1.1.2. Karzinogenese	11
1.1.3. Stadieneinteilung	13
1.1.4. Therapie	15
1.1.5. Prognose	18
1.2. Präklinische therapeutische Forschung	19
1.3. Problemstellung und Zielsetzung	22
2. MATERIAL & METHODEN	24
2.1. Zelllinien: FaDu, Cal27, PiCa	24
2.2. Materialien	26
2.2.1. Zellkulturmedien	26
2.2.2. Chemikalien und Enzyme	27
2.2.3. Verbrauchsmaterialien und Geräte	28
2.3. Methoden	31
2.3.1. Medienherstellung	31
2.3.2. Einfrieren von Zellen	32
2.3.3. Wachstumskurve und Generationszeit	32
2.3.4. Zellkultivierung	33
2.3.5. Hanging-Drop-Methode	34
2.3.6. Therapie	36
2.3.7. Auswertung	40
2.3.8. WST-8	40
2.4. Statistische Testverfahren	42
3. ERGEBNISSE	43
3.1. Vergleich des Zellenwachstums	43
3.1.1. FaDu	43
3.1.1.1. FaDu 3D: ohne und mit Bestrahlung	43
3.1.1.2. FaDu 3D: Cisplatin (2,5 / 5µM) ohne und mit Bestrahlung	45
3.1.1.3. FaDu 3D: 5-FU (1 / 5µM) ohne und mit Bestrahlung	52
3.1.2. Cal27	58
3.1.2.1. Cal27 3D: ohne und mit Bestrahlung	58
3.1.2.2. Cal27 3D: 5-FU (1 / 5µM) ohne und mit Bestrahlung	60
3.1.3. PiCa	66

3.1.3.1. Pica 3D: ohne und mit Bestrahlung	66
3.1.3.2. Pica 3D: Cisplatin (2,5 / 5 μ M) ohne und mit Bestrahlung	68
3.1.3.3. Pica 3D: 5-FU (10 / 30 μ M) ohne und mit Bestrahlung	75
3.2. Vitalitäten der Zellen	82
3.2.1. Vitalitäten der FaDu-Zellen	83
3.2.2. Vitalitäten der Cal27-Zellen	86
3.2.3. Vitalitäten der Pica-Zellen	88
4. DISKUSSION	91
4.1. Diskussion der Methodik	91
4.2. Diskussion der Ergebnisse	100
4.2.1. Radiosensitivität/Chemosensitivität der Zelllinien	100
4.2.2. Wirkung der Radiochemotherapie auf die Zelllinien	104
5. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	108
6. LITERATURVERZEICHNIS	110
7. ANHANG	125
7.1. Danksagung	125
7.2. Veröffentlichte Teilaspekte aus der Arbeit	126

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BEGM	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium
Ca	Calcium
CA	Carboanhydrase
CAP	Capecitabin
CCVK-I	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
CDHP	5-chloro-2,4-Dihydroxypyridin
Cisplatin	cis-Diamindichloroplatin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CTX	Cetuximab
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
DDP	cis-Diammindichloridoplatin
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonuclein acid
DPBS	Dulbecco´s phosphate buffered saline
DPD	Dihydropyrimidin Dehydrogenase
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal growth factor

FBAL	α -fluoro- β -alanine
FBS	Fetal bovine serum (=FCS, fetal calf serum)
FCS	Fetal calf serum (=FBS, fetal bovine serum)
5-FU	Fluoruracil
5-FdUMP	5-Fluorodesoxyruidinmonophosphat
5-FdUMP/UDP/UTP	5-Fluorodeoxyuridin-mono/di/triphosphat
5-FdUrd	5-Fluoro-2-deoxyuridin
5d5-FUrd	5-deoxy-5-Fluorouridin
5-FUH ₂	5,6-Dihydro-5-fluorouracil
FTO	Ftorafur
FUPA	α -Fluoro- β -Ureidopropion-acid
et al	aus dem lateinischen et alii(männlich), et aliae (weiblich), et alia (neutral) und bedeutet „und andere“
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
ggf.	gegebenenfalls
GSH	Glutathion
Gy	Gray
h	Stunde
HTS	High-Throughput-Screening Assays
HDM	Hanging-Drop-Methode
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomvirus
IGF	Insulin-like growth factor
IQR	Interquartilsabstand
LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	Loss of heterozygosity
LK	Lymphknoten

Mg	Magnesium
mg/m ²	Dosis in Milligramm pro Quadratmeter Körperoberfläche
mRNA	Messenger ribonuclein acid
MRT	Magnetresonanztherapie
N	Nodes = Lymphknoten
Na	Natrium
NaCl	Kochsalz
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PEC	Plattenepithelkarzinom
pM	Pathologische M-Klassifikation
pN	Pathologische N-Klassifikation
pT	Pathologische T-Klassifikation
pTNM	Der Zusatz p (=pathologisch) vor dem TNM-Status bedeutet, dass die Klassifikation nach der histologischen Aufarbeitung des Operationspräparates festgelegt wurde. Diese kann sich von der primär erhobenen klinischen Klassifikation unterscheiden

pO ₂	Sauerstoffpartialdruck (21% O ₂ entsprechen 150mmHg)
Tab.	Tabelle
TNM	Klassifikation maligner Tumore anhand von Tumorausdehnung; (T=Tumor), Lymphknotenmetastasierung (N=Nodus) und Fernmetastasen (M=Metastase) nach den international gültigen Richtlinien der UICC.
TP	Thymidin-Phosphorylase
TS	Thymidylatsynthase
WST	Water soluble tetrazolium salt
U	Uracil
UICC	Union Internationale contre le cancer
XTT	[2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl] -2H- tetrazolium hydroxide

1. EINLEITUNG

1.1. Kopf- und Halstumore

1.1.1. Epidemiologie & Ätiologie

Bei etwa 90% der malignen Kopf- und Halstumore handelt es sich pathomorphologisch um Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtrakts (HNSCC = Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) (Marur und Forastiere 2008; Duvvuri und Myers 2009). Maligne Kopf- und Halstumore stehen weltweit an sechster Stelle der Tumorneuerkrankungen und gehören damit zu den häufigsten bösartigen Tumoren beim Menschen (Duvvuri und Myers 2009). Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) geht für das Jahr 2014 von etwa 476.000 neu aufgetretenen Krebserkrankungen in Deutschland aus, wobei in der Mehrzahl Männer betroffen sind (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2015).

Die Gründe für die Entstehung eines Tumors sind auf vielfältige genetische, chemische, virale oder physikale Faktoren zurückzuführen. Es ist daher meist nicht möglich eine einzelne Ursache eines Tumors zu identifizieren (Reiß 2009). Die häufigsten Risikofaktoren in Europa sind Tabak- und Alkoholkonsum (Sturgis et al. 2004; Blot et al. 1988; Goldenberg et al. 2004). Bei Karzinomen, deren Entstehung mit einem übermäßigen Genuss von Tabak und alkoholischen Getränken vergesellschaftet ist, sind häufig Veränderung des Erbguts festzustellen (Carlos de Vicente et al. 2004). Dabei kumuliert die Krebsentstehungs-Wahrscheinlichkeit mit der Gesamtmenge der Schadstoffe, wobei man sich beim Tabakrauchen auf die „Pack-Years“ (20 Zigaretten/Tag, pro Jahr) und beim Alkoholgenuss auf die Menge pro Woche und Jahr bezieht (Gerok 2007; Gillison et al. 2008). Des Weiteren führt eine mangelnde Mundhygiene, Parodontose und chronische Entzündungen dazu, dass die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms begünstigt werden kann (Divaris et al. 2010; Maier et al. 1993). Neben den bekannten Hauptrisikofaktoren Tabak- und Alkoholkonsum ist nach neueren Erkenntnissen auch das Humane Papillomavirus (HPV) ein Risikofaktor, welcher zu einer gesteigerten Inzidenz von oropharyngealen Tumoren führt (Hennessey et al. 2009; Argiris et al. 2008; Wang et al. 2015). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das HPV-Virus, welches bei der Frau ursächlich für ein Cervix-Karzinom sein kann, über Sexualkontakte übertragen

werden kann. Persistierende Infektionen mit Hoch-Risiko-HPV, vor allem HPV-16 und -18 (Mishra und Verma 2015) gelten als ursächliche für Plattenepithelkarzinome, die vor allem bei jüngeren Patienten mit keiner oder nur sehr geringer Schadstoffbelastung auftreten (Seiwert et al. 2015; D'Souza et al. 2007; Gillison et al. 2015; Mourad et al. 2017; Gingerich et al. 2018). Das Risiko an einem HPV-assoziierten oropharyngealen Karzinom zu erkranken korreliert mit der Anzahl der Sexualpartner und praktiziertem Oralverkehr (Gillison et al. 2008). Dieser neu identifizierte ätiologische Faktor gewinnt in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung. Im Vergleich zu Patienten mit Tumoren, die durch Tabakrauch oder Alkoholabusus ausgelöst wurden, haben Patienten mit einem HPV-assoziierten Oropharynxkarzinom eine deutlich bessere Prognose (Fakhry et al. 2008; Licitra et al. 2006; Ang et al. 2010).

1.1.2. Karzinogenese

Veränderungen des zellulären Erbguts (Mutationen) können ohne externe Einflüsse spontan auftreten oder durch Karzinogene hervorgerufen werden (Nennstiel 2009). Zu den chemischen Karzinogenen zählen Chemikalien wie beispielsweise polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Teerprodukte, die alle in Tabakrauch nachweisbar sind (He et al. 2016; Kim et al. 2013; Morabito et al. 2017; Leischner 2014) Die chemische Karzinogenese verläuft in einem sogenannten „Mehrstufenprozess“, der typischerweise über mehrere Jahre und Jahrzehnte andauert (Califano et al. 1996; Breheny et al. 2011).

Der erste Schritt ist die **Initiation**. Es kommt zu wenigen Mutationen, die zu einer gesteigerten Proliferation bzw. einer erniedrigten Empfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden/apoptotischen Signalen der betroffenen Zelle führen. Diesen Veränderungen liegen Mutationen zugrunde, die eine dauerhafte Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen verursachen. Dabei ist für die Aktivierung von proliferations-steigernden Onkogenen in der Regel eine Mutation eines Allels ausreichend, während zur Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen sowohl mütterliches als auch väterliches Allel verändert sein muss. Im Vergleich zu den unmittelbar benachbarten Zellen hat diese Zelle somit einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil, der längerfristig dazu führt, dass sich die Tochterzellen dieser Zelle, die ebenfalls die stattgefundenene Mutation

aufweisen, in dem betroffenen Areal durchsetzen werden. Somit kommt es während der **Promotion** zur Ausbildung eines *patches*, der aus mutierten Schleimhautzellen besteht (Braakhuis et al. 2003).

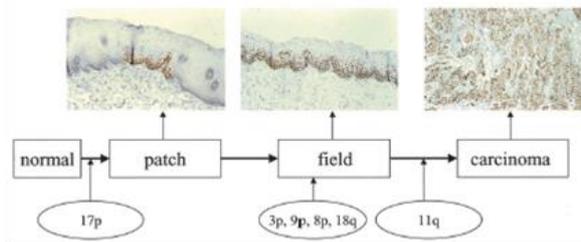


Abbildung 1: Chemische Karzinogenese: (Braakhuis et al. 2003)

Zuerst entwickelt sich ein *Patch* der aus TP53 mutierten Zellen besteht, das kommt durch den Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 17p zustande. Der nächste Schritt ist die Umwandlung vom Patch zum Feld. Diese epitheliale Läsion besteht aus genetisch veränderten Krebszellen. Derzeit ist nicht bekannt, welche genetischen Veränderungen an der Umwandlung vom Patch zum Feld beteiligt sind. Danach kommt es zur Feldprogression, die mit einer Reihe von genetischen Veränderungen verbunden ist. In der Abbildung sind die chromosomalen Positionen für die LOH (Loss of Heterozygosity) dargestellt (3p, 9p, 8p, 18q) (Braakhuis et al. 2003). Für den Übergang vom Feld zum Karzinom erwies sich die Amplifikation 11q13 als entscheidend (Izzo et al. 1998).

Der Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 17 (17p), auf dem sich das p53-Tumorsuppressorgen befindet, ist eine in den Anfangsstadien der Kopf-Hals-Karzinogenese häufig feststellbare Mutation (Braakhuis et al. 2003).

Die dritte Stufe ist die **Progression**, bei der es durch anhaltende Einwirkung der Karzinogene zu weiteren Mutationen von Tumorsuppressor- und Protoonkogenen kommt. In dieser Stufe der Karzinogenese kommt es zu weiteren Tumorwachstum, als Folge von klonalen Wachstum, Tumorangiogenese und Tumorerogenität, außerdem zur Invasion und Metastasierung von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg 2000; Braakhuis et al. 2004).

Bei der HPV-assoziierten Karzinogenese spielen zumindest am Anfang der Krebsentstehung Mutationen eine weit geringere Rolle. Das HPV kodiert zwei Onkogene, E6 und E7. Die beiden Proteine führen zu einer Degradation der zellulären Tumorsuppressoren p53 (E6) und pRb (E7; siehe Abbildung 2), wodurch die Zellen unempfindlich gegenüber apoptotischen Signalen werden bzw. die Proliferation der Zellen stimuliert wird. Die Inaktivierung von p53 als „Wächter des Genoms“ trägt zudem zu einer Akkumulation von Mutationen bei (Romagosa et al. 2011; Kobayashi et al. 2018).

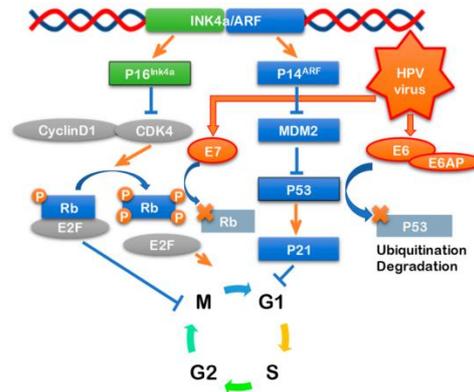


Abbildung 2: HPV assoziierte Karzinogenese: (Kobayashi et al. 2018)

Signalweg von highrisk-HPV-Onkogenen. Das HPV kodiert zwei bekannte virale Onkogene, das E6 und E7 Protein. E6 inaktiviert das Tumorsuppressorgen p53, was zu DNA-Schäden und zur Inaktivierung des Apoptose-Pfads führt. Das E7 Protein inaktiviert das Tumorsuppressorgen pRb und blockiert damit die Regulation des Zellzyklus (Romagosa et al. 2011; Kobayashi et al. 2018).

1.1.3. Stadieneinteilung

Die malignen Tumore werden nach dem TNM-System der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) eingeteilt (Brierley et al. 2017). Das TNM erfasst die Tumorgöße (T), die Lymphknotenbeteiligung (N) und die Fernmetastasen (M) (Wittekind 2017). Die TNM-Klassen werden durch verschiedene Untersuchungen ermittelt, die laut Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften) die körperliche Untersuchung, Sono/Dopplersono, CT, MRT und die radiologische Thoraxaufnahme umfassen (Kagawa et al. 2011; Hung et al. 2012; Feinmesser et al. 1990; Wolff et al. 2012). Zur Unterscheidung der HPV-assoziierten und der HPV-negativen Tumoren wird von der NCCN (National Comprehensive Cancer Network) eine Austestung auf p16 mittels Immunhistochemie (IHC) empfohlen (Weinberger et al. 2006; Cantley et al. 2011; Jordan et al. 2012). Weitere Tests umfassen die HPV-Analyse durch PCR und die In-Situ-Hybridisierung (ISH) (Cantley et al. 2011; Jordan et al. 2012). Die Sensibilität der IHC-Färbung und PCR ist für p16 zwar hoch aber die Spezifität ist für ISH am höchsten (Cantley et al. 2011).

Die Einteilung der Tumorstadien nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer) wird zur Auskunft über die prognostischen Stadien (0-IVc) bei der Anwendung von Standardtherapien eingesetzt und beinhaltet alle TNM-Faktoren. Dabei wird das Carcinoma-in-situ als Stufe 0 eingestuft. Die meisten Tumore, die an dem Ursprungsorgan lokalisiert sind, werden je nach Ausmaß in Stadium I oder II eingeteilt. Tumore mit lokaler Ausbreitung auf regionale Lymphknoten werden als

Stadium III kategorisiert und das Auftreten von Fernmetastasen wird als Stadium IVc bezeichnet. Stadium IV kann noch unterteilt werden in IVa-IVc, je nach Größe der Lymphknoten. In der aktuellen 8.TNM-Auflage wurde für die Oropharynx-Karzinome eine Unterteilung in p16-positive und p16-negative bzw. nicht durchgeführte Immunhistochemie vorgenommen. Da in aktuellen Analysen großer Datenbanken und retrospektiver Erfahrungen, die Stadieneinteilung und die damit in Verbindung stehende Prognose auf HPV assoziierte Tumoren nicht zutreffend war, wurde ein eigenes Stagingssystem für p16-positive Oropharynx-Karzinome erstellt. Das neue Staging verfügt über drei Stufen I-III für nicht metastasierende HPV assoziierte oropharynx-Karzinome und unterscheidet sich besonders in der N-Klassifikation von p16-positiven und p16-negativen Tumoren (siehe Tab.1) (Wittekind 2017; Würdemann et al. 2017).

Tabelle 1: UICC (Union Internationale Contre le Cancer) Tumorstadien Einteilung (Wittekind 2017)

Stadien der Kopf- und Halstumoren (außer Nasopharynx) (p16-negativ)			
Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3 T1/2/3	N0 N1	M0 M0
IVa	T4a T1/2/3/4a	N0 oder N1 N2	M0 M0
IVb	Jedes T T4b	N3 Jedes N	M0 M0
IVc	Jedes T	Jedes N	M1
Stadien der p16-positiven Oropharynxtumore			
Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0, N1	M0
II	T1, T2 T3	N2 N0, N1, N2	M0 M0
III	T1, T2, T3, T4 T4	N3 Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

1.1.4. Therapie

Die möglichen Therapiemodalitäten von HNSCC umfassen die Chirurgie, Radio(chemo)therapie, zielgerichtete Therapie und Immuntherapie. Dabei werden die NCCN-Guidelines zur stadiengerechten Behandlung von HNSCC herangezogen. In den frühen Stadien der Kopf-Halstumore (Stadium I/II), die in etwa 30-40% der Fälle auftreten, werden unimodale Therapiekonzepte eingesetzt. Dabei wird bevorzugt eine chirurgische Tumoresektion oder Bestrahlungstherapie als kurative Therapie vorgenommen. Die Erhaltung der Lebensqualität hat dabei oberste Priorität und es muss organ- und funktionserhaltend vorgegangen werden (Adelstein et al. 2017).

Bei den fortgeschrittenen Kopf- und Halstumoren wendet man multimodale Therapien an. Die Therapieentscheidung für betroffene Patienten wird heute in interdisziplinären Tumorboards getroffen, welche individuell anhand der vorliegenden Befunde ein Therapiekonzept empfehlen. Dabei ist die Tumorlokalisierung, Tumorausdehnung und der Allgemeinzustand des Patienten entscheidend (Bettag 2006). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei fortgeschrittenen Tumoren, die nicht resezierbar sind, liegt allerdings seit über 30 Jahren bei unter 10% (Reuter et al. 2007; Browman und Cronin 1994; Chu et al. 2007; Morton et al. 1985). Diese schlechte Prognose liegt laut American Joint Committee on Cancer (AJCC) insbesondere daran, dass Kopf-Halstumoren aufgrund von unspezifischer Symptome oft erst spät diagnostiziert werden (>60% Stadium III/IV), aber auch an häufigen loko-regionären Rezidiven, der Fernmetastasierung (ca. 50%) und Zweitkarzinomen (Rapidis und Scully 2009; Jimenez et al. 2015). Durch die diffizilen anatomischen Begebenheiten im Kopf-Halsbereich, ist die chirurgische Entfernung des Tumors vor allem bei fortgeschrittenen malignen Tumoren schwierig, vor allem in Hinblick auf funktionelle Aspekte. Der Tumor muss mit einem Sicherheitsabstand entfernt und die Schnittträger intraoperativ kontrolliert werden. Ein ausreichender Sicherheitsabstand von >5mm (R0-Resektion) sollte erreicht werden um das Rezidivrisiko niedrig zu halten (Sessions et al. 2000; Hinni et al. 2013; Boehm et al. 2010). Um die Funktion und Ästhetik zu erhalten muss der entstandene Defekt rekonstruiert werden. Dies wird durch Schleimhautplastiken, sowie durch Haut- und Knochentransplantate im Sinne von gestielten lokalen und Fernlappen oder von mikrochirurgisch anastomosierten Transplantaten erreicht (Rogers et al. 2004; Henry und McCaul

2016). Weiterhin muss im Rahmen der chirurgischen Resektion von den meisten Kopf-Hals-Karzinomen eine elektive bzw. therapeutische Neck Dissection durchgeführt werden. Durch die vollständige Entfernung des Fett- und Bindegewebes vor allem der Gefäßnervenscheide und ggf. weiterer befallener Strukturen werden klinisch okkulte oder offene Halslymphknotenmetastasen reseziert (Ferlito et al. 2011).

Die kurativen Therapiekonzepte der Kopf- und Halstumore umfassen neben der chirurgischen Resektion ggf. zusätzliche adjuvante Behandlungen im Sinne einer alleinigen Bestrahlung oder einer Radiochemotherapie (Dietz und Keilholz 2016). Alternativ kommt eine primäre definitive Radiochemotherapie mit höherer Strahlendosis in Frage (Remmert et al. 2017; Seiwert und Cohen 2005). Die Radiochemotherapie ist die kombinierte Strahlen- und Chemotherapie, die sowohl sequentiell als auch simultan, d.h. parallel stattfinden kann. Bei der Bestrahlung verwendet man energiereiche Strahlen um maligne Tumoren zu bekämpfen. Dazu werden elektromagnetische Röntgen-, Gammastrahlen oder korpuskuläre Strahlen wie Neutronen- oder Protonenstrahler eingesetzt. Generiert werden diese Strahlen entweder in der Röntgenröhre oder durch radioaktiven Zerfall. Die Bestrahlung wirkt auf Zellen die sich in der Zellteilung befinden, somit werden Tumorzellen, die sich in der Regel schneller teilen, stärker angegriffen, als das gesunde umliegende Gewebe (Schwenzer und Ehrenfeld 2010). Die Radiotherapie und die Chemotherapie wirken auf zellulärer Ebene an unterschiedlichen Angriffspunkten und können dadurch ihre Wirkung gegenseitig verstärken (Hill 1990). Einige Chemotherapeutika verursachen einen radiosensibilisierenden Effekt und verstärken damit die Wirkung der Bestrahlung. Dies ist beispielsweise bei den Zytostatika Cisplatin, 5-FU und Taxol der Fall (Begg et al. 1986; Byfield 1991; Dewit 1987; Douple 1990). Die Medikamente der Wahl für Kopf- und Halstumoren sind Cis- oder Carboplatin, 5-FU (Fluoruracil) und/oder Taxane (Grégoire et al. 2010). Eine alleinige Chemotherapie wird nur in der Palliation verabreicht (Bettag 2006). Laut der Studien von Pless hat eine kombinierte Chemotherapie mit Cisplatin und 5-FU im Vergleich zu einer Einzeltherapie eine geringere Rezidivrate und eine höhere Überlebensrate (Pless 2000). Die Chemotherapie wirkt systemisch und hemmt das Wachstum der Zellen irreversibel, wovon besonders schnellteilende Zellen, wie Tumorzellen, betroffen sind. Aber auch gesunde stoffwechselaktive Zellen wie Mundschleimhautzellen, Schleimhautzellen im

Darm, blutbildende Zellen des Knochenmarks und die Haarwurzelzellen, können dadurch Schaden erleiden. Hierbei kann es zu den typischen Nebenwirkungen der Chemotherapeutika wie Haarausfall, Entzündungen der Mundschleimhaut, Störungen der Blutbildung aber auch Übelkeit, Erbrechen und Durchfall kommen (Rodriguez-Frias und Lee 2007; Jordan et al. 2017).

Bestrahlungstherapien, die als postoperative adjuvante Strahlentherapien durchgeführt werden, führen zur Verbesserung der lokalen Rezidivrate bei fortgeschrittenen Tumoren (Stadium III/ IV). Dabei erfolgt die konventionell fraktionierte Strahlentherapie, über mehrere Wochen, bis zu einer Dosis von 60-66Gy (Bernier et al. 2004; Awwad et al. 2002; Cooper et al. 2004). Nach den NCCN-Guidelines wird eine Radiochemotherapie vor allem dann empfohlen, wenn die Resektionsränder nicht den nötigen Mindestabstand aufweisen oder ein extrakapsuläres Tumorwachstum vorhanden ist (Adelstein et al. 2017). Ein extrakapsuläres Wachstum kommt meist in Kombination mit Tumormetastasierung im fortgeschrittenen Stadium vor. Anfangs ist der Tumor dabei auf die Lymphknotenkapsel beschränkt, im späteren Verlauf kommt es zur Invasion des Bindegewebes und dann zum Durchbruch der Lymphknotenkapsel (Toker 1963). Neben den klassischen Chemotherapeutika gibt es auch zielgerichtete Therapien mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab (CTX), die vor allem bei fortgeschrittenen Stadien und auch in Kombination mit einer Bestrahlung angewendet werden (Bonner et al. 2006). Diese Therapien stellen ein wachsendes Feld in der Behandlung von Kopf- und Halstumoren dar und können bei Resistenzen sinnvoll werden (Bossi und Alfieri 2016). CTX bindet selektiv an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), was zu einer Hemmung der EGF-Verknüpfung und zu einer Unterbrechung der Phosphorylierungskaskade führt. Dadurch verhindert CTX die Zellvermehrung, Angiogenese und Metastasenbildung (Hanck-Silva et al. 2019).

Immuncheckpoint-Inhibitoren haben sich als neuer Standard für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem nichtkleinzelligen Lungenkrebs etabliert. Sie können als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie verabreicht werden. Sie stellen eine weniger toxische und effektivere Behandlung dar als die Chemotherapie allein (Pistamaltzian et al. 2019). Aber auch für weitere Indikationen wie das maligne Melanom, Nierenzellkarzinom, Hodgkinlymphom, Urothelkarzinom und für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich wurden Immuntherapeutika entwickelt

(Ishihara et al. 2019; Ansell 2019; Izumo et al. 2019; Castet et al. 2019). Zugelassene Substanzen für die Immuntherapie sind Ipilimumab, Durvalumab, Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab und Atzolizumab. Direkt an PD-1 (programmed cell death protein 1) binden Nivolumab und Pembrolizumab und an den PD-L1 (programmed cell death ligand 1) greifen die Medikamente Durvalumab, Avelumab und Atezolizumab an. Das Wirkprinzip ist die Demaskierung der Tumorzellen, um sie für die körpereigene Immunabwehr sichtbar zu machen (Lee et al. 2017; Rajan et al. 2016; Kwok et al. 2016; Heery et al. 2017). Ipilimumab wird zur Therapie gegen das maligne Melanom eingesetzt. Es liegt demselben Wirkprinzip zugrunde, unterbricht aber die Herunterregulierung des Oberflächenproteins CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) der Immunzellen, um eine stabile Abwehr zu gewährleisten (Weber et al. 2017; Savoia et al. 2016). Die Entwicklung zuverlässiger Biomarker und die anschließende Anwendung des geeigneten immunbasierten Ansatzes, werden die Bedeutung der Immuntherapie in den kommenden Jahren verändern (Pistamaltzian et al. 2019).

1.1.5. Prognose

Die HNSCC zeichnen sich in ihrem biologischen Verhalten durch eine ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität aus. Daher können Tumore des gleichen Stadiums oft unterschiedlich auf dieselbe Behandlung reagieren. Deshalb ist es wichtig, Marker zu identifizieren, die Unterschiede im Tumorverhalten aufdecken können (Hardisson 2003). Die Prognose der HPV-negativen HNSCC ist seit Jahrzehnten unverändert schlecht. Die Bedeutung der inter- und intratumoralen Heterogenität bei der Progression eines Tumors ist bereits bekannt und gehört zu den etablierten Ursachen für Behandlungsresistenz und Metastasenbildung. Aus diesem Grund wäre eine sinnvolle Ergänzung für das TNM-System, ein Maß für die Heterogenität zu finden, um die Prognose des Patienten besser abschätzen zu können. Für die Patientenversorgung würde eine bessere prognostische Genauigkeit das Design klinischer Studien unterstützen und helfen die Therapien zu personalisieren. Die Messung der Heterogenität innerhalb des Tumors könnte so letztlich zu einer Hilfe für die klinische Entscheidungsfindung hinsichtlich der Behandlung werden. Trotzdem wird diese Heterogenität in klinischen Studien selten untersucht (Mroz et al. 2015).

Auch für die eigenständige Tumorentität der HPV-positiven HNSCC gibt es noch nicht genügend Daten. Laut NCCN haben Patienten mit lokal fortgeschrittenen HPV-positiven Kopf- und Halstumoren bessere Ergebnisse im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren. Derzeit bedarf es noch weiterer Studien, um eine weniger intensive Behandlung für Patienten mit HPV-positiven HNSCC zu empfehlen. Der HPV-Status ist ein prognostischer Faktor und sollte in klinischen Studien zunehmend aufgenommen werden, um biologische und behandlungsbedingte Fragen zu beantworten (Adelstein et al. 2017). Daher ist es erstrebenswert für jeden Patienten eine personalisierte und individualisierte Behandlung zu verwirklichen. Um dies zu erreichen sind realitätsnahe präklinische Modelle wie das 3D-Tumormodell notwendig.

1.2. Präklinische therapeutische Forschung

Um den therapeutischen Wert eines Medikaments für den Patienten mit einer bestimmten Krankheit zu ermitteln, sind präklinische Studien nötig. Diese Chemikalien direkt am Menschen, ohne in vitro und in vivo Studien an ausgewählten Tierarten auszutesten, wäre schon aus ethischen Gründen undenkbar (Garattini und Grignaschi 2017). Zellkulturen sind heute unverzichtbarer Bestandteil der onkologisch-therapeutischen Forschung. In zwei Versuchsreihen hat Carrel im Jahre 1911 erstmalig aseptische Techniken entwickelt um aus einem Hühnerembryo Herzmuskelzellen in Langzeitkultur anzulegen (Carrel 1912). Inzwischen sind zahlreiche Zelllinien kultiviert (Pollack 1981).

Ein großer Vorteil von Tiermodellen ist, dass Medikamente die Zellen auf ähnliche Weise penetrieren, wie auch im menschlichen Körper. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Komplexität der Organsysteme unter anderem durch die Präsenz von Entzündungszellen, Enzymen, Durchblutung, Bindegewebe u. a. Faktoren, vergleichbar ist. Die Schwierigkeit der Zellkulturen liegt immer noch darin, die in vitro Kultur den in vivo Bedingungen anzugleichen. Um dies zu erreichen, müssen viele Parameter beachtet werden. Dabei ist die Tatsache, dass es sich um ein lebendes System handelt, welches einer eigenen Dynamik unterliegt, nicht zu vernachlässigen (Garattini und Grignaschi 2017). Kulturbedingungen, Zellteilungsraten und genetische Veränderungen spielen dabei eine wichtige Rolle, so dass kultivierte Zellen sich dadurch von den ursprünglichen Zellen stark

unterscheiden können. Im Gegensatz zu lang etablierten Zelllinien, gibt es primäre Zelllinien, die erst vor kurzem aus einem Organ oder Gewebe isoliert wurden. Diese sind häufig noch schwer anzuzüchten, da die optimalen Kulturbedingungen noch unbekannt sind. Es wird davon ausgegangen, dass sie der Ursprungszelle sehr ähnlich sind und daher auch unter in vitro Bedingungen die Eigenschaften realitätsgetreuer und das physiologische Verhalten besser widerspiegeln (Mack et al. 2013; Spitzbart und Schmidt 1970). Aus verschiedenen Versuchen geht hervor, dass signifikante Unterschiede zwischen lang etablierten Zelllinien im Vergleich zu den Ursprungszellen bestehen. Zelllinien in der Kultur können sich im Laufe der Zeit ändern. Insbesondere wenn sie aus vielen Passagen hervorgehen, können Zellen Mutationen, Chromosomenduplizierungen oder Rekombinationen und epigenetische Veränderungen durchlaufen, die ihren Phänotypen verändern (Lorsch et al. 2014; Greshock et al. 2007). Gegenwärtig nutzen vor allem Forschung und pharmazeutische Unternehmen Zellkultursysteme zur Entdeckung neuer Angriffspunkte und Austestung von neuen Wirkstoffen (Li et al. 2010). In der onkologischen Forschung werden immer mehr potentielle Zielstrukturen entdeckt, deren pharmakologische Beeinflussung einen günstigen Effekt gegen das Tumorzellwachstum hat. Hierzu sind stabile Testverfahren erforderlich (van Montfort und Workman 2017; Sandberg und Ernberg 2005).

In der pharmakologischen Forschung werden meist High-Throughput-Screening Assays (HTS-Assays) eingesetzt. Dies sind automatische Hochdurchsatzverfahren bei dem tausende von Wirkstoffen gleichzeitig getestet werden können. In den letzten Jahren wurde eine große Vielfalt an unterschiedlichen HTS-Assays entwickelt, die aus biochemischen Testverfahren bestehen (Gill et al. 2007; Pereira und Williams 2007; Trivedi et al. 2008; Zimmermann et al. 2008). Jedoch gibt es bei den HTS einige Limitierungen, da die Austestung in dreidimensionalen Assays noch nicht vorgenommen werden kann und somit die klinische Effizienz noch nicht ausreichend geklärt ist (Kunz-Schughart et al. 2004).

Zwar lässt sich die Wirksamkeit neuer Therapeutika anhand kommerzieller Zellkulturverfahren austesten, jedoch sind die Ergebnisse nicht direkt mit den in vivo Bedingungen eines dreidimensionalen Tumors gleichzusetzen (Sun et al. 2006). 3D-Zellkulturen, die in Mikrosphäroiden wachsen, sind bezüglich der Morphologie, der

Mikroumgebung und der entstehenden Gradienten von Nährstoffen und Gasen einem in vivo Tumor ähnlicher als ein 2D-Modell. Die gewonnenen Ergebnisse sind daher besser in die Klinik übertragbar (Ho et al. 2010). Es bestehen zahlreiche Möglichkeiten für die Anzucht von sphärischen Mikrogeweben. Eine bewährte Kulturmethode ist die „Hanging-drop-Methode“ (HDM) bei der aufgrund fehlender Anheftungsmöglichkeit der Zellen im hängenden Tropfen kugelige dreidimensionale Zellaggregate entstehen. Neben Zellen anderer Gewebearten konnten auch Tumorzelllinien mit der HDM sphärisch angezüchtet werden (Drewitz et al. 2011). In einfachen HDM wurden Zellsuspensionstropfen auf dem Deckel einer Petrischale abgelegt, welcher dann umgedreht wurde und die Zellen so kultiviert wurden (Foty 2011). Diese einfache und günstige Methode hatte aber auch den Nachteil, dass die Sphäroide sehr instabil waren und eine Langzeitkultur schwierig und nicht effizient war (Katt et al. 2016). Inzwischen stehen verschiedene Technologien zur Verfügung, welche die Erzeugung von „hanging-drops“ und die nachfolgenden Arbeiten erleichtern. Systematische Untersuchungen mittels der HDM an Kopf-Hals-Tumorzelllinien sind bis dato nicht beschrieben. Jedoch bietet diese Methode gegenüber den anderen 3D-Zellkulturmodellen einige Vorteile. Dazu zählen die einfache Durchführung, gute Erfahrungen mit anderen Zelllinien, eine große Anzahl an Wells (n = 96), sowie die Möglichkeit der Bearbeitung und Auswertung im Vollautomaten. Die HDM kann somit neue Möglichkeiten zum Screening neuer Wirksubstanzen eröffnen.

Langfristig wäre es denkbar primäres Tumorgewebe aus dem Patienten, nach entsprechender Aufbereitung der Zellen, mittels der HDM anzuzüchten. Vollautomatisiert könnten dann unterschiedliche Therapiekonzepte (verschiedene Chemotherapeutika +/- Bestrahlung) am Patientenmaterial getestet werden, um im Anschluß das optimale Konzept für den Patienten zur Anwendung zu bringen. Dies würde wiederum einen wichtigen Beitrag zur personalisierten Tumorthherapie leisten.

1.3. Problemstellung und Zielsetzung

Ziel der Dissertation ist die systematische Untersuchung der Radio- und / oder Chemosensitivität dreidimensionaler Tumorsphäroide dreier Kopf-Hals-Tumorzelllinien mit Hilfe der HDM. Mittelfristig sollen darauf aufbauend dreidimensionale Hochdurchsatz-Screeningverfahren etabliert werden die es ermöglichen neue Therapieansätze an einer großen Zahl vergleichbarer Sphäroide zu testen. Langfristig könnten Sphäroide aus Patientenbiopsien es ermöglichen vor Beginn der Therapie ein Ansprechen auf bestimmte Therapieschemata auszutesten und somit einen Beitrag zur personalisierten Tumorthherapie leisten. Die daraus gewonnenen Ergebnisse könnten wirkungsvoll zur Verbesserung des Therapieerfolgs und einer Reduktion der Nebenwirkungen beitragen.

Im Rahmen der Dissertation sollen folgende Fragen geklärt werden:

- 1.) Zeigen sich Veränderungen im Wachstum und der Zellvitalität der 3D-Sphäroide unter Bestrahlung
- 2.) Zeigen sich Veränderungen im Wachstum und der Zellvitalität der 3D-Sphäroide unter Chemotherapie mit Cisplatin oder 5-FU
- 3.) Zeigen sich Veränderungen im Wachstum und der Zellvitalität der 3D-Sphäroide unter einer Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Chemotherapie
- 4.) Gibt es Unterschiede im Ansprechen der drei verwendeten Zelllinien (FaDu/Cal27/PiCa)

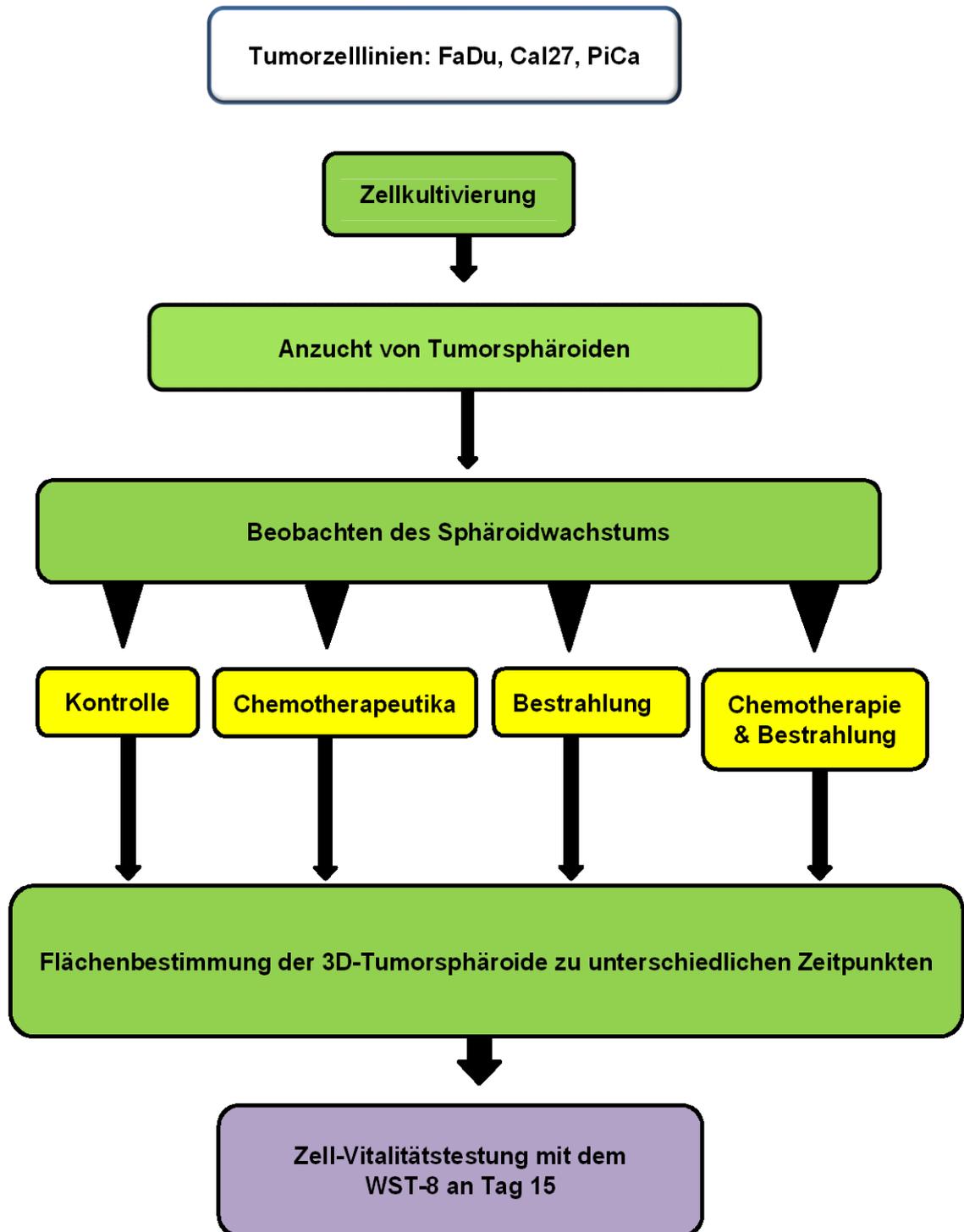


Abbildung 3: Schema zur Etablierung des 3D-Tumormodells

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zelllinien: FaDu, Cal27, PiCa

FaDu

Die aus einem menschlichen Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx gewonnene Zelllinie FaDu wurde 1968 etabliert (Rangan 1972) und 1974 wurde die Passage 102 in die American Type Culture Collection aufgenommen (ATCC, Rockville, Maryland, USA).

Cal27

Die Zelllinie Cal27 stammt aus einem G3 Plattenepithelkarzinom der Zunge eines 56-jährigen Mannes und wurde erstmals 1982 beschrieben (Gioanni et al. 1988).

PiCa

Intermediäre Zelllinie PiCa welche aus einem Larynx-Karzinom entnommen und vom HNO-Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Klinikums der Universität München, Deutschland generiert wurde (Mack et al. 2013). Die in den Versuchen verwendeten Zellen stammten aus den ersten 20 Passagen dieser neu generierten Zelllinie.

Tabelle 2: Zelllinien

ZELLINIEN

Zelllinien	Hersteller
FaDu Organismus: Homo sapiens Gewebe: Pharynx Plattenepithelkarzinom ATCC HTB-43	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
Cal 27 Organismus: Homo sapiens Gewebe: Zunge Plattenepithelkarzinom DSMZ ACC446	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
PiCa Organismus: Homo sapiens Gewebe: Larynx Plattenepithelkarzinom	HNO-Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren- Heilkunde des Klinikums der Universität München, Deutschland

2.2. Materialien

2.2.1. Zellkulturmedien

Tabelle 3: Zellkulturmedien

ZELLKULTURMEDIEN

Produkt	Hersteller
Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) + 100µl 0,02% Amphotericin B (250µg/ml) + 5 ml 5% Gentamycin (5mg/ml) + Supplement Mix: Bovine Pituitary Extract, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortisone, Epinephrine, Triiodo-L- Thyronine, Transferrin (holo, human), Retinoic Acid	Promocell, Heidelberg Gibco Life, Eggenstein Biochrom, Berlin Promocell, Heidelberg
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Promokine, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (w4,5g/l D-Glucose; 25mM Hepes; 3,7g/l NaHCO ₃ ; 4,4g/l NaCl) + 5 ml Penicillin/ Streptomycin 10.000 U/ml/ 10.000 µg/ml + 5 ml Non-essential amino acids 100x + 5 ml L-Glutamin 200mM + 5 ml Sodium Pyruvate 100mM +50m FCS	Biochrom AG, Berlin Biochrom AG, Berlin Invitrogen, Karlsruhe Biochrom AG, Berlin Biochrom AG, Berlin Invitrogen, Karlsruhe Gibco Life Technologies, Eggenstein
Dulbeccos's phosphate buffered saline (DPBS)	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Life Technologies, Eggenstein

2.2.2. Chemikalien und Enzyme

Tabelle 4: verwendete Chemikalien und Enzyme

CHEMIKALIEN	
Produkt	Hersteller
Amphotericin B	Gibco Life, Eggenstein
CCVK-I 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium	Promokine, Heidelberg
Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin; DDP)	Sigma-Aldrich, Seelze bei Hannover
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco Life, Eggenstein
5-Fluoruracil (5-FU)	Sigma-Aldrich, Seelze bei Hannover
Gentamycin	Promocell, Heidelberg
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Non-essential amino acids	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Saline sodium citrate buffer (SSC)	Abbott, Illinois, USA
Sodium Pyruvate	Biochrom AG, Berlin
Trypanblau 0,4%	Merck, Darmstadt
Trypsin / EDTA Solution 0,05% / 0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca 2+ w/o Mg 2+	Biochrom AG, Berlin

2.2.3. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 5: verwendete Verbrauchsmaterialien

VERBRAUCHSMATERIALIEN	
Produkt	Hersteller
96-Well-Platte Gravity Plus	In Sphero, Zürich
96-Well-Platte Gravity Trap	In Sphero, Zürich
96-Well-Platte	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen 2ml, steril	Nalgene, Rochester USA
Pasteurpipetten, steril 7mm	Merck, Darmstadt
Pipetten (10µl, 100-200µl, 200µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluß (15ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluß (50ml)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturfläschchen für adhärente Zellen (25ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 6: verwendete Geräte**GERÄTE UND SONSTIGES**

Produkt	Hersteller
Analysenfeinwaage Voyager Messbereich 0,1mg -110g	Ohaus, Gießen
Brutschrank BB 16CU	Heraeus Instruments, Hanau
Gefrierschrank (-85°C) Ultra Low Freezer U57085	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kühlschrank (+4°C)	Kirsch/Bosch, Stuttgart
Kühlschrank (+4°C) und Gefrierschrank (-30°C) Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroskop Zeiss Objektiv 40x/0,75 Mikroskop Leica IM DRB (Photodokumentation) Objektive 4x/0,1	Zeiss, Oberkochen Leica, Herbruggen, Schweiz
Mikrotiterplatten-Lesegerät (450nm Filter) – Versa max	Molecular Devices, USA
Nikon Digitalcamera D 7100	Nikon, Thailand
Programm Excel Programm ImageJ	Mikrosoft, USA Freeware
Röntgentherapiegerät RT 100.	Poliklinik Innenstadt in der Abteilung für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. C. Belka) Die Zellen wurden dort mit jeweils 2 Gy bei 70kV bestrahlt.
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau

Waage 1419	Sartorius, Gießen
Zählkammer nach Neubauer	Merck, Darmstadt
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus, Hanau
Vortex Genie 2	Scientific, USA

2.3. Methoden

Um ein gleichmäßiges Wachstumsverhalten und einen standardisierten Arbeitsablauf zu gewährleisten, mussten vorab die Nährmedien auf den Zelllinien getestet werden und in Vorversuchen die Zellzahl optimiert werden, um ein bestmögliches Sphäroid-Wachstum zu ermöglichen. Bei den verwendeten Zelllinien und der Hanging-Drop-Methode, wurde das beste Ergebnis bei der Verwendung von DMEM und BEGM-Medien erzielt. Des Weiteren ist auch die Kulturdauer der Zellen individuell auf die Zelllinien abgestimmt und im Vorfeld ausgetestet worden. Die Vorversuche waren dabei nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Alle drei Zelllinien ließen sich gut im hängenden Tropfen anzüchten.

2.3.3. Medienherstellung:

FaDu, Cal27 und PiCa wurden mit Dulbeccos's modified eagle medium (DMEM, Biochrom AG Berlin, Germany) behandelt. Dazu wurde jeweils 10% inaktiviertes fetal bovine serum (FBS, Gibco Life Technologies, Paisley, UK), 1% Penicillin / Streptomycin (10000U/ml / 10000µg/ml Biochrom, Berlin, Germany), 1% Sodium Pyruvat (100mM, Biochrom, Berlin, Germany), 1% nicht-essentielle Aminosäuren (NEA (100x), Biochrom, Berlin, Germany) und 1% L-Glutamine (200mM, Gibco Life Technologies) zugesetzt.

Tabelle 7: Medienherstellung von Dulbeccos's modified eagle medium(DMEM) und von Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)

Herstellung von Dulbeccos's modified eagle medium(DMEM)		
<u>Zusätze:</u> + 5ml Penicillin/ Streptomycin 10.000U/ml/ 10.000µg/ml + 5ml Non-essential amino acids 100x + 5ml L-Glutamin 200mM + 5ml Sodium Pyruvate 100mM +50ml FCS	<u>DMEM:</u> 500ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (w4,5g/l D-Glucose; 25mM Hepes; 3,7g/l NaHCO ₃ ; 4,4g/l NaCl)	1. Zusätze unter steriler Werkbank zu 500ml DMEM zugeben 2. mischen 3. bei 4°C lagern

Herstellung von Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)

<u>Supplement Mix:</u> -Bovine Pituitary Extrakt -Epidermal Growth Factor -Insulin -Hydrocortisone -Epinephrine -Triiodo-L-Thyronine -Transferrin(holo, human) -Retinoic Acid		<u>Antibiotikum & Antimykotikum:</u> +100µl 0,02% Amphotericin B (250µg/ml) +5ml 5% Gentamycin (5mg/ml)	1. Supplement Mix, Antibiotikum und Antimykotikum unter steriler Werkbank zu 500ml Bronchial Epithelial Basalmedium zugeben 2. mischen 3. bei 4°C lagern
---	---	---	--

2.3.2. Einfrieren von Zellen

Um die Zelllinien längerfristig zu lagern, wurden sie bei -80°C eingefroren. Dazu mussten die Zelllinien mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst und 10min bei 900U/min zentrifugiert werden. Das Pallet in 1ml Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Hiervon wurden 1Mio. Zellen mit 1ml Einfriermedium (Einfriermedium: DMEM+10%FCS+10%DMSO) in ein Kryoröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen in den Cryo Freezing Container (Fa. Nalgene) bei -1°C/min kontinuierlich durch 100% Isopropylalkohol im Gefrierschrank herunter gekühlt. Nach 24h war die gewünschte Temperatur von -80°C erreicht, bei der die Zellen gelagert wurden.

2.3.3. Wachstumskurve und Generationszeit

Um die Generationszeit der verschiedenen Zelllinien zu bestimmen, wurden Wachstumskurven erstellt. Der Zeitraum, den eine Zelle benötigt um sich einmal zu teilen, nennt sich Generationszeit (Doubling Time) und variiert bei den verschiedenen Tumorzelllinien zwischen 10 und 60 Stunden. Die jeweilige Doubling Time der drei Zelllinien wurde ermittelt, um ein sinnvolles Zeitintervall für die Behandlung mit den gewählten Chemotherapeutika zu finden.

Tabelle 8: Ermittelte Doubling Time und Mittelwerte der drei Zelllinien FaDu, Cal27, PiCa

<u>Doubling Time:</u>	
FaDu	20-37h >>Mittelwert: 28h
Cal27	26-38h >>Mittelwert: 33h
PiCa	24-53h >>Mittelwert: 42h

2.3.4. Zellkultivierung

Zellen kultivieren

Die Zelllinien wurden tiefgefroren gelagert und mussten zur Inkulturnahme unter sterilen Bedingungen aufgetaut werden. Die Zellsuspension wurde zunächst mit 5ml PBS gewaschen und anschließend für 5min bei 900U/min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands, wurde das verbleibende Zellpellet in 1ml DMEM resuspendiert und im Anschluss daran die Zellzahl und Vitalität der Zellsuspension bestimmt. In jede Kulturflasche (25cm²) wurden eine Million Zellen eingesät, die Kultur erfolgte in 10ml DMEM und die Zellen wurden bei 80-90% Konfluenz passagiert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt, um verbrauchte Nährstoffe zu ersetzen und Stoffwechselmetabolite der Zellen, wie Lactat und Ammoniak, zu entfernen, da diese den pH-Wert des Mediums und somit den Redox-Status der Zellen beeinflussen (Lindl und Gstraunthaler 2008). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ in 25cm² Kulturflaschen mit Ventilöffnung.

Mediumwechsel

Bei der Wahl des Mediums musste darauf geachtet werden, den Ansprüchen der kultivierten Zellen bezüglich der Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren gerecht zu werden, denn nur so war ein optimales Wachstum der Zellen zu erreichen. Das Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) wurde als Standardmedium eingesetzt und eignet sich für ein breites Spektrum an Zellen. Das Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) enthielt als Spezialmedium verschiedene Zellwachstums- und Anheftungsfaktoren wie Rinderhypophysenextrakt, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortisone und Retinoic Acid. Transferrin förderte die Eisenaufnahme, das Triiodo-L-thyronine den Metabolismus und das Zellwachstum (Bobik et al. 2019; Deisenroth et al. 2019). Beim Mediumwechsel der adhärennten Zellen wurde das alte Medium DMEM abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

Passagieren der Zellen

Durch zwei Waschschrte mit Dulbecco´s phosphate buffered saline (DPBS, Gibco Life Technologies, Paisley, UK) wurde das restliche Medium entfernt, die Zellen mit 2ml vorgewärmter Trypsin / EDTA Lösung (0,05% / 0,02% (w/v) in PBS w/o Ca²⁺ w/o

Mg²⁺, Biochrom, Berlin, Germany) bei 37°C inkubiert und das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 2ml DMEM gestoppt und anschließend für 10min bei 900U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit 1ml DMEM Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50µl der Zellsuspension mit 50µl Trypanblau suspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (insgesamt 16 Quadrate in 4 Großquadraten). Die Vitalität ließ sich anhand der Farbe der Zellen bestimmen. Da Trypanblau nicht durch die Zellmembran einer vitalen Zelle eindringen konnte, blieb das Cytosol farblos. Bei Zellen mit geschädigter Zellmembran wird das Cytosol durch den eindringenden Farbstoff blau angefärbt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

Formel 1: Zellzahlbestimmung

gezählte Zellen

x 2 (Verdünnungsfaktor)

x 10000 (Umrechnungsfaktor um die Zellkonzentration in ml zu erhalten)

Zellen in dieser Suspension

Auf Grundlage der berechneten Zellzahl wurden frische Kulturflaschen mit den Zellen inokuliert und mit 10ml DMEM aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank.

2.3.5. Hanging-Drop-Methode

40µl der jeweiligen Zellsuspension (1000 FaDu-Zellen, 2000 Cal27-Zellen bzw. 1000 PiCa-Zellen) wurden in die GravityPlus™ 3D Culture Platte (InSphero) pipettiert. Die Inkubation der Platten erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die besten Ergebnisse für die Morphologie der Sphäroide wurden durch eine Kultivierung der Zelltropfen der Zelllinie FaDu für 3 Tage, für Cal27- und PiCa 5 Tage erzielt.

Das Modell wurde auf Grundlage der „Hanging-drop“-Technologie entwickelt. Entscheidend ist dabei die dreidimensionale Anzucht der Tumorzelllinien zu einem Mikrotumor. In einem zweiten Schritt werden diese dann auf ihre Sensitivität gegen verschiedene Kombinationen aus Chemo- und Radiotherapie untersucht.

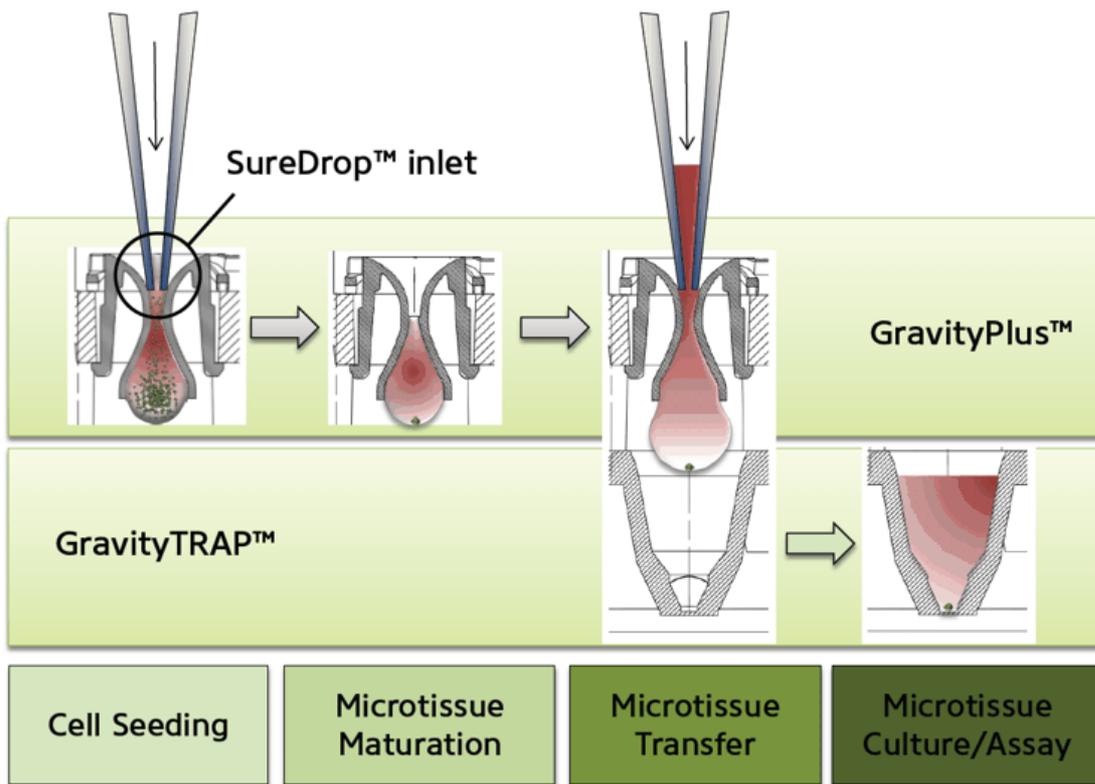


Abbildung 4: Prinzip der Hanging-Drop-Methode und Funktionsweise der GravityPlus und GravityTrap Kulturplatten (Bildmaterial der Firma Insphero): Zellsuspension wird auf die GravityPlus Platte pipettiert, Inkubation im Brutschrank bei 37°C, durch Zugabe von Medium Induktion der Tropfenüberföhrung/Sphäroidüberföhrung auf die GravityTrap Platte, 3D-Sphäroid-Kultur/Mikrogewebekultur befindet sich nun auf der GravityTrap Platte zur Kultivierung (Messner et al. 2013)

Zelltransfer auf die Gravity-Trap-Platte

Die Überföhrung der Tumorsphäroide von der GravityPLUS™-3D-Kulturplatte auf die GravityTRAP™-Platte wurde zelllinienabhängig zu unterschiedlichen Zeitpunkten (siehe oben) durchgeführt. Dazu wurde die Hanging-Drop-Platte (Gravity PLUS™) auf die GravityTRAP™-Platte überföhrt und durch Zugabe von 70µl (50% DMEM und 50% BEGM) Medium die Ablösung der Tropfen induziert. Der Tropfen fiel mitsamt dem enthaltenen Sphäroid in einen Well der darunterliegende GravityTRAP™-Platte. Die Mikrotumore wurden 14 Tage kultiviert, wobei jeden zweiten bis dritten Tag das Medium (1:1 DMEM / BEGM) gewechselt wurde. Auf der GravityTRAP™ -Platte konnte das weitere Wachstum mikroskopisch fotodokumentiert und mithilfe von ImageJ analysiert und ausgemessen werden.

2.3.6. Therapie

Cisplatin (CDDP)

Cisplatin wurde von Rosenberg et al. 1965 erstmalig bei Versuchen mit *E. coli* Bakterien entdeckt (Rosenberg et al. 1965). Seit 1979 ist Cisplatin als Chemotherapeutikum zugelassen und gehört zu den meist genutzten Zytostatika (Kreienberg 2009). Dieses wird sowohl in Einzeltherapie als auch in Kombinationstherapie mit weiteren synergistisch wirkenden Chemotherapeutika gegen Kopf- und Halstumoren aber auch gegen andere Tumore z. B. des Urogenitaltrakts, der Lunge, des Eierstocks und bei Hodenkrebs eingesetzt. Zur Behandlung von HNSCC wird Cisplatin häufig in der Kombination mit 5-FU kombiniert (Wittes et al. 1977). Fujishima et al. hat eine über den additiven Synergismus hinausgehende Wirkungsverstärkung beschrieben. Da er durch seine Studien festgestellt hat, dass 5-FU, wenn es in die RNA integriert ist, sowohl die GSH-Synthese (Glutathion) als auch die Reparatur von Platin-DNA-Addukten hemmen kann (Fujishima et al. 1997). Cisplatin gehört zu den Alkylanzien mit starker Zytotoxizität. Dabei werden benachbarte Guanin-Moleküle über Wasserstoffketten vernetzt und die DNA-Replikation und Transkription wird dadurch gehemmt. Der Zellzyklus wird unterbrochen und es kommt zum Zelltod (siehe Abb. 5). Diese antineoplastische Wirkung wird jedoch vor allem durch nephro- und ototoxische Nebenwirkungen, allergische Reaktionen, verringerte Immunität gegen Infektionen, Magen-Darmerkrankungen, Hämorrhagien und Arzneimittelresistenzen begrenzt (Dasari und Tchounwou 2014)(Herdegen 2014, 2014; Apps et al. 2015; Skiba-Tatarska et al. 2016).

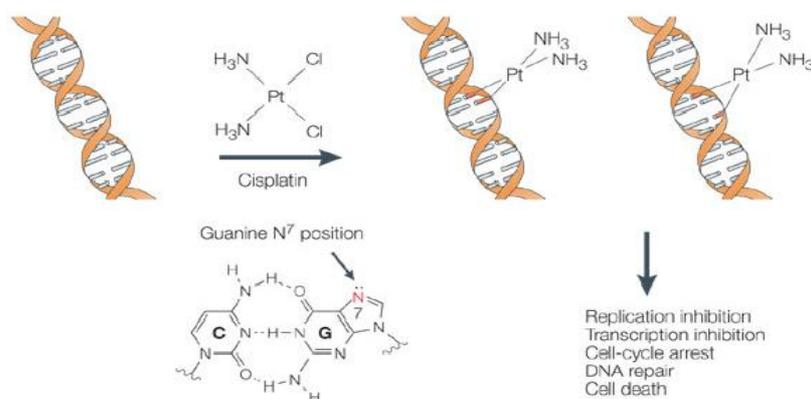


Abbildung 5: Zelluläre Wirkung von Cisplatin (Bildmaterial von der Nature Reviews Drug Discovery): Cisplatin vernetzt benachbarte Guanin Moleküle an Position 7 über Wasserstoffketten und induziert dass die DNA-Replikation und Transkription dadurch gehemmt wird. Der Zellzyklus wird unterbrochen und es kommt zum Zelltod (Wang und Lippard 2005).

5-Fluoruracil

5-Fluoruracil (5-FU) gehört zur Gruppe der Pyrimidinanaloga. Fluorpyrimidine, sind weit verbreitet in der Behandlung von malignen Tumoren und werden häufig in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt. Das 5-FU unterliegt einem komplexen Metabolismus, dabei wird 5-FU von der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD), die auch am Katabolismus von Thymin und Uracil beteiligt ist, in 5-Fluor-Desoxyuridin-Monophosphat (5-FdUMP) umgewandelt und bildet einen stabilen Komplex mit reduzierten Folaten und der Thymidylat-Synthase (TS), dies hemmt die TS und führt gleichzeitig zur Hemmung der DNA-Synthese. Die Fluorpyrimidin-Desoxynukleotid-Analoga werden in die DNA und RNA eingebaut und bewirken eine Störung der Zellproliferation. Die Aktivität der Fluorpyrimidine hängen vom Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Wegen ab. Mehr als 80% der verabreichten Dosis von 5-FU werden in inaktive Metabolite umgewandelt, wobei die restlichen 20% oder weniger für die therapeutische Wirkung verantwortlich sind. (siehe Abb. 6). Es hat eine relativ kurze Halbwertszeit (<30 Minuten) und gelangt durch passive Diffusion ohne weiteres ins Gehirn. Daher können Symptome wie Verwirrtheit und Gedächtnisstörungen die für Monate bis Jahre anhalten können auftreten. Aber auch gastrointestinale und hämatologische Toxizitäten führen häufig zum Behandlungsabbruch. Klinisch wird es sowohl als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt. Daher ist es erforderlich die genauen Mechanismen zu verstehen und Strategien zur Prävention dieser Nebenwirkungen zu entwickeln (Wigmore et al. 2010; Del Re et al. 2010).

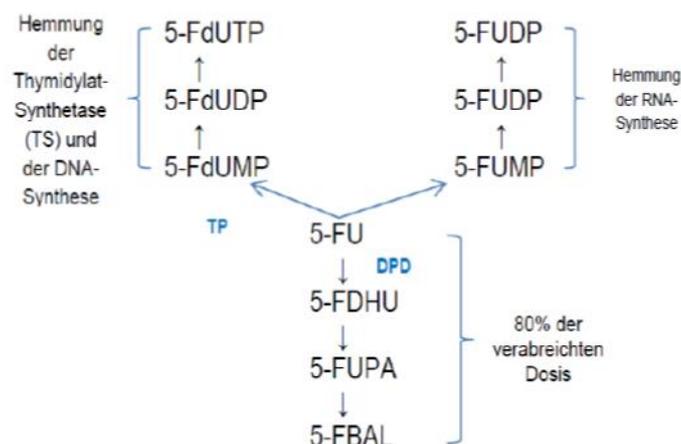


Abbildung 6: Wirkmechanismus von 5-FU: (Del Re et al. 2010)

5-FU wird auf drei verschiedenen Wegen verstoffwechselt: 1.) Hemmung der Thymidylat-Synthetase, die für die Methylierung von dUMP nötig ist und somit Blockierung der DNA-Synthese 2.) Einbau von 5-FU wegen der Ähnlichkeit zu Uracil in die RNA, führen zur Hemmung der RNA-Synthese 3.) 80% der verabreichten Dosis kann durch die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) abgebaut werden (Del Re et al. 2010).

Folgende Konzentrationen der Chemotherapeutika wurden verwendet:

Tabelle 9: Chemotherapeutika-Konzentrationen, die in den Versuchen verwendet wurden (2,5/5µM Cisplatin FaDu und PiCa, 1/5µM 5-Fluoruracil Cal27 und FaDu, 10/30µM 5-Fluoruracil PiCa)

Cisplatin	5-Fluoruracil
2,5µM FaDu/PiCa	1µM Cal27/FaDu
5µM FaDu/PiCa	5µM Cal27/FaDu
	10µM PiCa
	30µM PiCa

Die Therapie mit den beiden Chemotherapeutika erfolgte an Tag 0 (Tag der Überführung von GravityPLUS™ auf GravityTRAP™) über 24h, 48h bzw. 72h (je nach Doubling Time und Dosis-Wirkungs-Kurve des Chemotherapeutikums). Im Anschluss wurde ein Mediumwechsel mit 1:1 DMEM und BEGM durchgeführt.

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Inkubationszeiten (24/48/72h) der Chemotherapeutika (Cisplatin/5-FU) je Zelllinie (FaDu, Cal27, PiCa)

	Kontrolle	Cisplatin	5-FU
FaDu	ohne Chemotherapeutikum	24h	48h
Cal27	ohne Chemotherapeutikum		48h
PiCa	ohne Chemotherapeutikum	24h	72h

Bestrahlung

Bei der Bestrahlung verwendet man energiereiche Strahlen um maligne Tumoren zu bekämpfen. Dazu werden elektromagnetische Röntgen-, Gammastrahlen oder korpuskuläre Strahlen wie Neutronen- oder Protonenstrahler eingesetzt. Generiert werden diese Strahlen entweder in der Röntgenröhre oder durch radioaktiven Zerfall. Die Bestrahlung wirkt auf Zellen die sich in der Zellteilung befinden. Somit werden schnell teilende Tumorzellen stärker angegriffen als das gesunde umliegende Gewebe (Schwenzer und Ehrenfeld 2010).

Die Bestrahlung der Sphäroide wurde jeweils dreimal durchgeführt (siehe Tab. 11). Bestrahlt wurde mit einer Dosis an Röntgenstrahlen von 2Gy. Dem Versuch lag folgendes Behandlungsregime zu Grunde:

Tabelle 11: Bestrahlungsregime der 4 Ansätze je Zelllinie (FaDu, Cal27, PiCa)

	1.Ansatz:	2.Ansatz:	3.Ansatz:	4.Ansatz
Tag	Kontrollplatte	Bestrahlung	Chemotherapeutika	Chemotherapeutika und Bestrahlung
0	-	Bestrahlung an Tag 0	Chemotherapie	Chemotherapie und Bestrahlung an Tag 0
2	-	Bestrahlung an Tag 2	-	Bestrahlung an Tag 2
4	-	Bestrahlung an Tag 4	-	Bestrahlung an Tag 4

Der erste Ansatz wurde als Kontrollplatte gewertet und bekam keine Radio- oder Chemotherapie. Beim zweiten Ansatz wurde an Tag 0, 2 und 4 eine Bestrahlung mit 2Gy vorgenommen. Der dritte Ansatz wurde direkt mit Chemotherapeutika behandelt ohne vorherige Bestrahlung. Der vierte Ansatz wurde einmal an Tag 0 mit 2Gy bestrahlt und anschließend die oben genannten Chemotherapeutika zugegeben und entsprechend ihrer Inkubationszeiten belassen und an Tag 2 und 4 zusätzlich bestrahlt (siehe Tab. 9, 10 und 11).

2.3.7. Auswertung

Die Sphäroide wurden für 14 Tage unter denselben Bedingungen kultiviert und das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Das Wachstum und die Veränderungen der Sphäroide wurden beobachtet und dokumentiert. Dazu wurde jedes Mikrosphäroid unter dem Mikroskop fotografiert, beurteilt und ausgemessen. Diese Sphäroid-Bilder wurden mit Image J ausgewertet, indem die Fläche durch Bestimmung des Umfangs berechnet wurde. Dadurch konnte indirekt auf das Zellwachstum rückgeschlossen und die einzelnen Therapieregime miteinander verglichen werden.

Die Bewertung des Zellwachstums der kugelförmigen Mikrotumore erfolgte über die Planimetrie des Tumor-Sphäroids in der Durchlichtmikroskopie. Durch die Markierung der Grenzfläche des Tumors konnte mit Hilfe von ImageJ die Fläche berechnet werden (siehe Abb.5). Die Auswertung erfolgte anhand von Digitalfotos, welche am Computer mit Hilfe von ImageJ vermessen wurden.

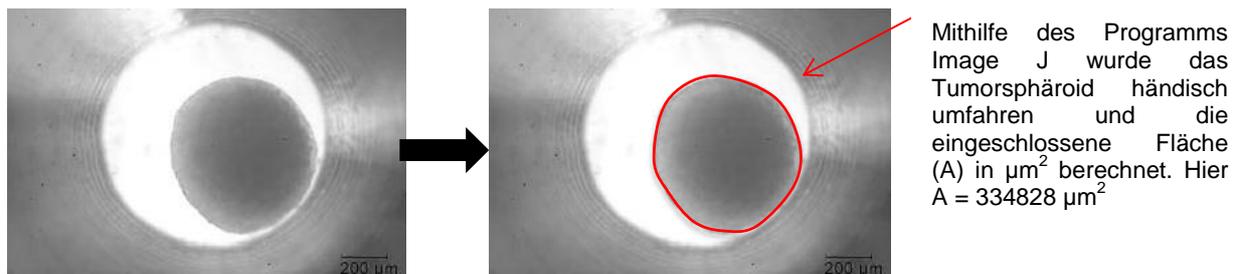


Abbildung 7: Beispielbild zur Erklärung der Flächenmessung mithilfe von dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (unter dem Zeiss Mikroskop, Objektiv 40x) am Beispiel der FaDu Kontrollzellen: Fläche $A = 334828 \mu\text{m}^2$ am Tag 10 im hängenden Tropfen)

2.3.8. WST-8 (=Water soluble Tetrazolium Salt 8)

Da planimetrisch nur die Sphäroidfläche erfasst, dadurch aber keine Aussage über die Vitalitäten der Zellen getroffen werden konnte, war ein weiterer Test notwendig, um dies nach vollendeter Behandlung zu bestimmen. Zur Bestimmung wurde der WST-8-Test angewendet, der darauf beruht, dass die vitalen Zellen den Farbstoff (WST8) zu Formazan umsetzen. Das wasserlösliche 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (CCVK-I Lösung) wurde bei vitalen stoffwechselaktiven Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu orangem Formazan reduziert (siehe Abb. 8). Über die Farbtiefe konnte anhand des Photometers bei 450 nm Wellenlänge indirekt der Anteil noch lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle bestimmt werden. Die Farbtiefe korreliert mit der Anzahl der noch stoffwechselaktiven Zellen (Ishiyama et al. 1997; Promokine 2014). Dabei ist

der WST-8 ein sehr sensibler Test für die Vitalität der Zellen. Er weist eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu herkömmlichen mit Tetrazoliumsalzen durchgeführten Tests auf (Chamchoy et al. 2019).

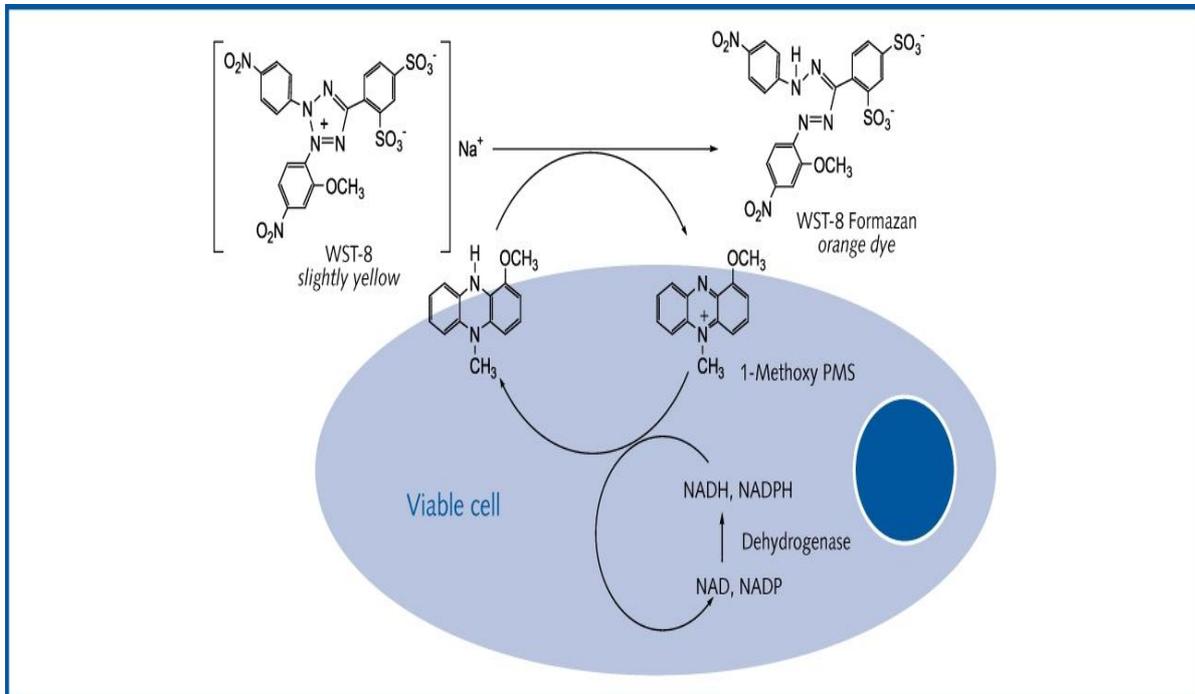


Abbildung 8: Biochemischer Ablauf bei der Farbentstehung beim WST-8 (Promokine 2014) kolorimetrischer Assay bei dem Tetrazoliumsalz (2- (2-Methoxy-4-nitrophenyl) -3- (4-nitrophenyl) -5- (2,4-Disulfophenyl) -2H-tetrazolium, Mononatriumsalz), das nach Reduktion in Gegenwart von 1-Methoxy PMS den wasserlöslichen, gelb gefärbten Formazanfarbstoff liefert. WST-8 wird durch zelluläre Dehydrogenasen zu einem orangefarbenen (löslichen)Formazanprodukt reduziert. Die Menge an Formazan ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen (Promokine 2014).

Vorgehensweise WST-8

Für diesen Test wurde je ein Sphäroid aus einem Well in ein Eppendorfgefäß überführt und für 2,5 min bei 3000U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und die Sphäroide mit 100µl PBS 2,5 min bei 3000U/min zentrifugiert. Danach wurden die Überstände entfernt und die Sphäroide mit 100µl Accutase für 8min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10s aufgeschüttelt und die enzymatische Reaktion mit jeweils 100µl DMEM gestoppt. Dies musste nochmal bei 3000U/min 2,5 min zentrifugiert werden, der Überstand abgegossen und die Zellen resuspendiert werden. Darauf wurden 100µM DMEM gegeben. Die gesamten 100µl wurden dann auf eine 96-Well-Platte (Fa.Greiner) pipettiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert, um die Anheftung der Zellen zu gewährleisten. In alle Wells wurden 10µl WST-8-Reagenz gegeben, diese für 1h im Brutschrank belassen und abschließend im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450nm ausgelesen.

2.4. Statistische Testverfahren

Mit Hilfe des Programms SPSS™ Version 23 wurde die statistische Auswertung vorgenommen und eine grafische Darstellung mittels Boxplot verwendet. Durch den Median, der waagrecht durch die Box verläuft, wurde die Verteilung der Einzelwerte und deren Schiefe dargestellt, dabei sind 25% der Werte oberhalb und 25% der Werte unterhalb des Medians. Innerhalb der Box liegen somit die mittleren 50% der Ergebnisse. Das obere und das untere Quartil begrenzen die Box. Der Interquartilsabstand (IQR) entspricht somit der Länge der Box. Oberhalb und unterhalb der Box befinden sich die Whisker, die maximal das 1,5fache des Interquartilsabstandes ($1,5 \times \text{IQR}$) betragen. Zwischen $1,5 \times \text{IQR}$ und $3 \times \text{IQR}$ befinden sich die „milden Ausreißer“, die mit einem Kreis (°) und außerhalb des 3-fachen IQR die „extremen“ Ausreißer, die mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet wurden. Zur statistischen Auswertung wurde aus den jeweils 12 Einzelwerten das arithmetische Mittel bestimmt. Durch den Kolmogorov-Smirnov-Test konnte die Normalverteilung der Werte ermittelt werden. Für die gegebene Bedingung des Vergleichs von abhängigen Größen einer Gruppe wurde der verbundene T-Test angewandt, wenn die Daten normal verteilt waren. Hingegen wurde für abhängige Daten, die nicht normal verteilt waren, der Wilcoxon-Test verwendet.

Die Werte der mit Chemotherapeutikum Cisplatin bzw. 5-FU (in verschiedenen Konzentrationen, siehe 2.3.6. Therapie) behandelten Zellen wurden den Kontrollzellen gegenübergestellt und die bestrahlten mit den unbestrahlten Zellgrößen verglichen. Somit wurden in dieser Arbeit nur abhängige Größen verwendet. Durch diese statistischen Tests wurde die Signifikanz überprüft. Diese Irrtumswahrscheinlichkeit wird als Signifikanzniveau bezeichnet und darf nicht mehr als 5% betragen. Das bedeutet, dass $p \leq 0,05$ signifikant ist. Dem Problem der Inkonsistenz und der Inflation des Alphafehlers bei multiplen Nullhypothesen wurde mit der Bonferroni-Korrektur begegnet und ein lokales Signifikanzniveau für jede Nullhypothese definiert. Dazu wurde das globale Signifikanzniveau durch die Anzahl der Tests innerhalb einer Gruppe dividiert.

Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde darauf verzichtet die Signifikanzen im Graphen darzustellen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vergleich des Zellenwachstums

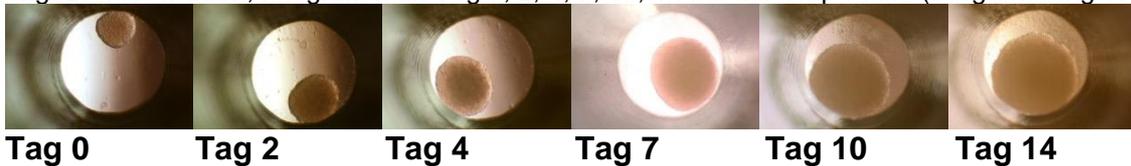
Das Wachstumsverhalten der Zellsphäroide wurde an verschiedenen Tagen fotografisch festgehalten und die Größenzunahme ermittelt, indem der Umfang gemessen und vom Programm in Flächenwerte umgerechnet wurde (siehe 3.3.7. Auswertung). Dabei war jeweils $n=12$.

3.1.1. FaDu

3.1.1.1. FaDu 3D: ohne und mit Bestrahlung

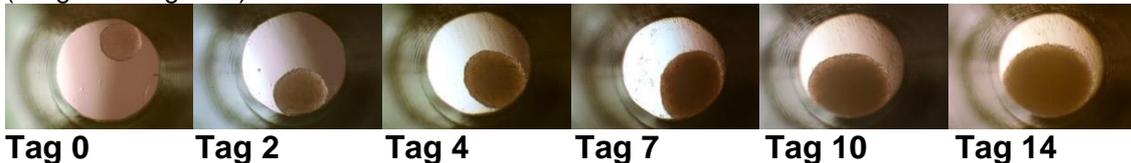
FaDu ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 1: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide, die im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



FaDu mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 2: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide, die mit $3 \times 2\text{Gy}$ bestrahlt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Wachstum FaDu 3D: ohne und mit Bestrahlung

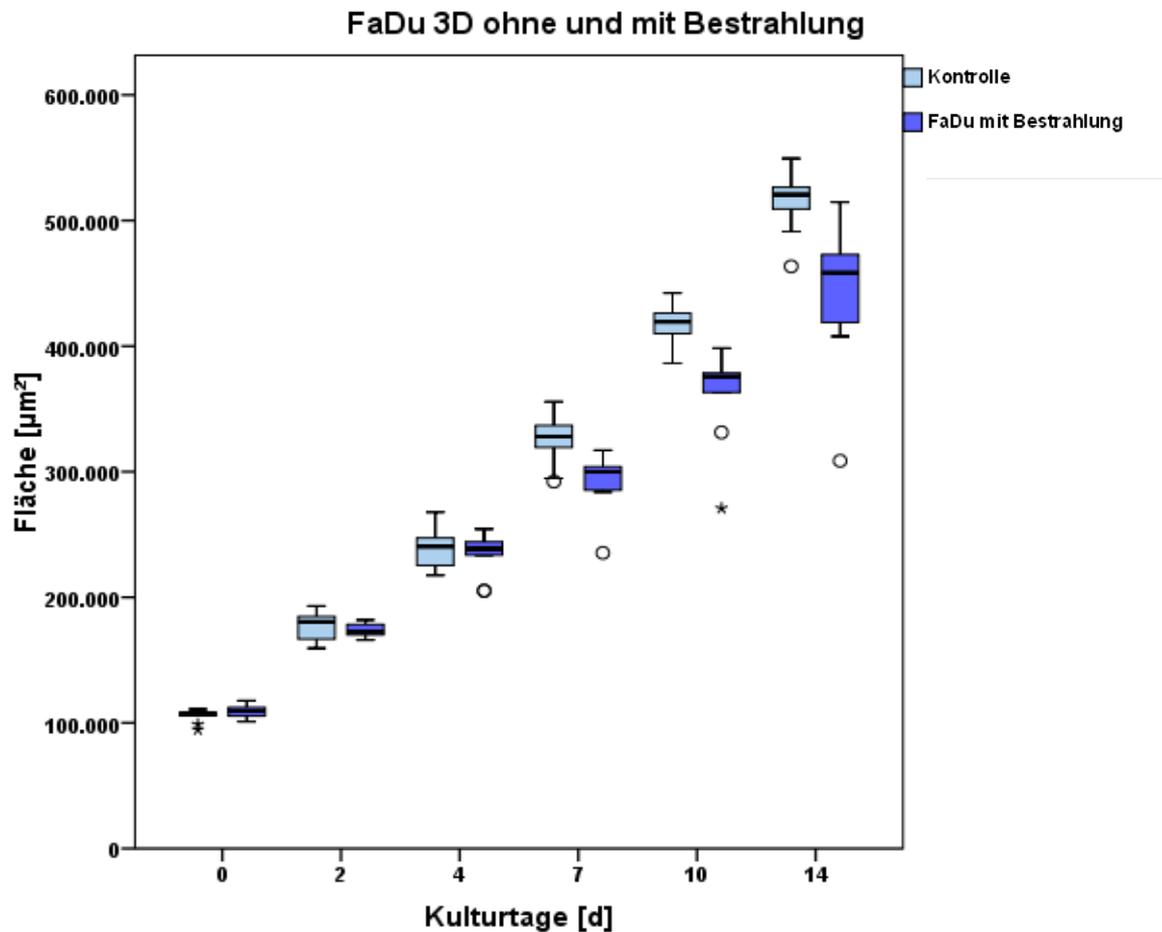


Abbildung 9: Zelllinie FaDu: Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 12: gemessene Flächenwerte der FaDu-Zellen in μm^2 und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen, $n=12$ pro Gruppe. * $p \leq 0,05$

Flächenwerte in μm^2	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Kontrolle	105376	177582	239218	325955	416939	515836
FaDu mit Bestrahlung	108121	170340	234013	292374	363421	447630
p-Werte	0,178	0,226	0,253	0,003*	0,001*	0,003*

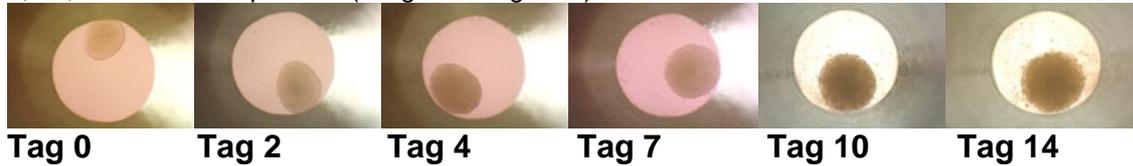
Im Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen konnte man eine Wachstumshemmung durch die Bestrahlung mit 3 x 2Gy feststellen.

Die Bestrahlung bewirkte bei den FaDu-Zellen ein signifikant geringeres Wachstum ab dem Tag 7 ($p \leq 0,003$).

3.1.1.2. FaDu 3D: Cisplatin (2,5 / 5µM) ohne und mit Bestrahlung

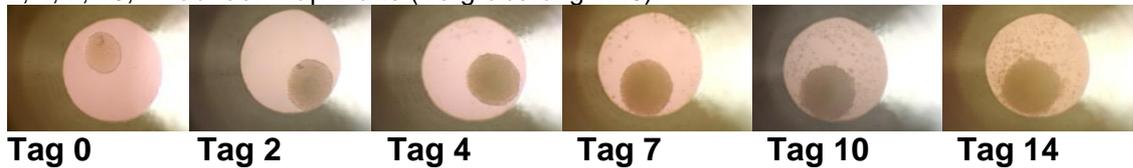
FaDu 2,5µM Cisplatin ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 3: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide ohne Bestrahlung, die mit 2,5µM Cisplatin behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



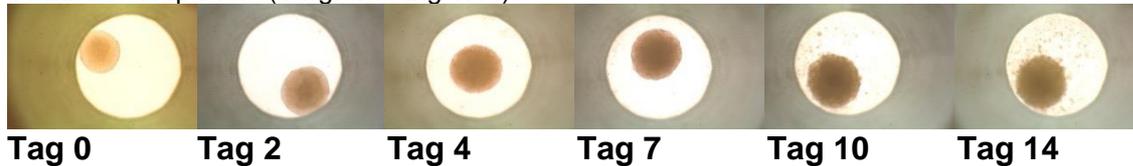
FaDu 2,5µM Cisplatin mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 4: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide mit 3 x 2Gy Bestrahlung, die mit 2,5µM Cisplatin behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



FaDu 5µM Cisplatin ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 5: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide ohne Bestrahlung, die mit 5µM Cisplatin behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



FaDu 5µM Cisplatin mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 6: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide mit 3 x 2Gy Bestrahlung, die mit 5µM Cisplatin behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Wachstum FaDu 3D: 2,5µM Cisplatin ohne und mit Bestrahlung

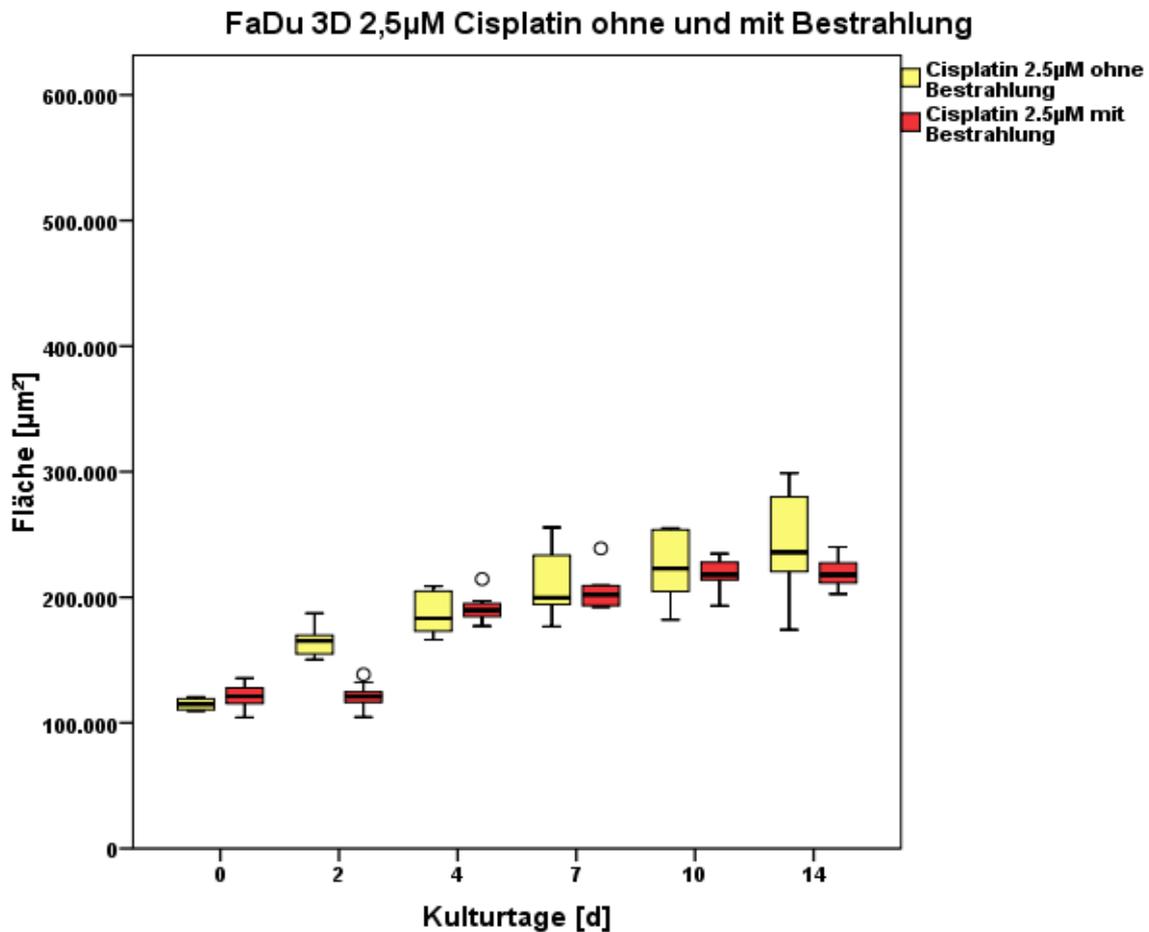


Abbildung 10: Zelllinie FaDu: mit 2,5µM Cisplatin behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung

Tabelle 13: Gemessene Flächenwerte der FaDu-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 2,5µM Cisplatin (24h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. *p ≤ 0,05.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Cis 2,5µM ohne Bestrahlung	114924	164918	186389	210302	225015	243738
Cis 2,5µM mit Bestrahlung	118099	119311	190278	202718	213249	214567
p-Werte	0,104	≤0,001*	0,471	0,576	0,394	0,008*

Beim Größenvergleich der unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Sphäroide, die gleichzeitig mit 2,5µM Cisplatin behandelt wurden, war durch die Bestrahlung eine tendenzielle Hemmung des Wachstums erkennbar. Eine Ausnahme war nur an Tag 4 vorhanden.

Signifikante Werte von p≤0,008 waren nur an Tag 2 und Tag 14 vorhanden.

Wachstum FaDu 3D: 5µM Cisplatin ohne und mit Bestrahlung

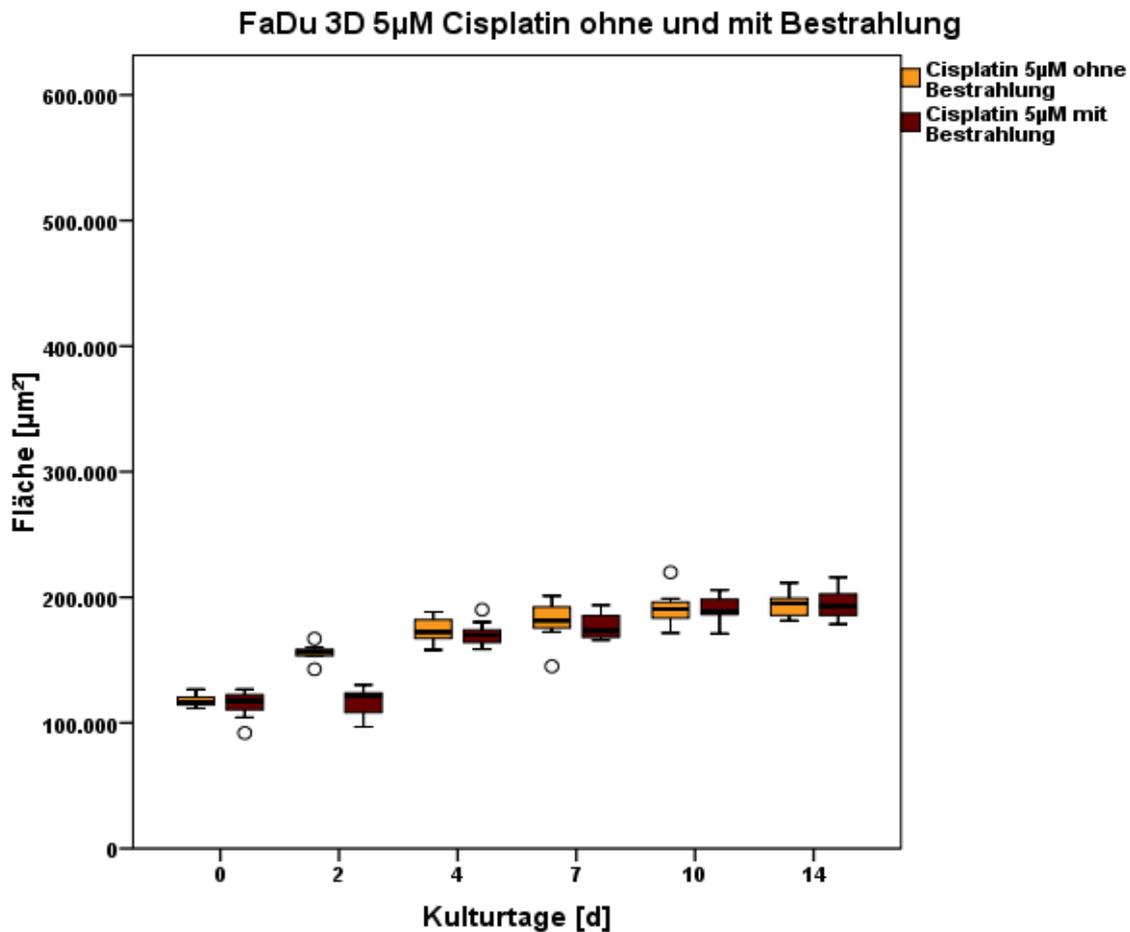


Abbildung 11: Zelllinie FaDu: mit 5µM Cisplatin behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung

Tabelle 14: Gemessene Flächenwerte der FADU-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 5µM Cisplatin (24h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. *p≤0,05

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Cis 5µM ohne Bestrahlung	117931	156050	173141	180640	191367	194380
Cis 5µM mit Bestrahlung	114258	115524	169118	176356	189622	191885
p-Werte	0,421	≤0,001*	0,621	0,513	0,878	0,860

Vergleicht man die unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen, die mit 5µM Cisplatin behandelt wurden, waren die bestrahlten Zellen tendenziell an allen Tagen kleiner als die unbestrahlten, wobei nur an Tag 2 eine Signifikanz von p≤0,001 zu verzeichnen war.

Wachstum FaDu 3D: Cisplatin-Konzentrationen (2,5 / 5µM) im Vergleich (ohne Bestrahlung)

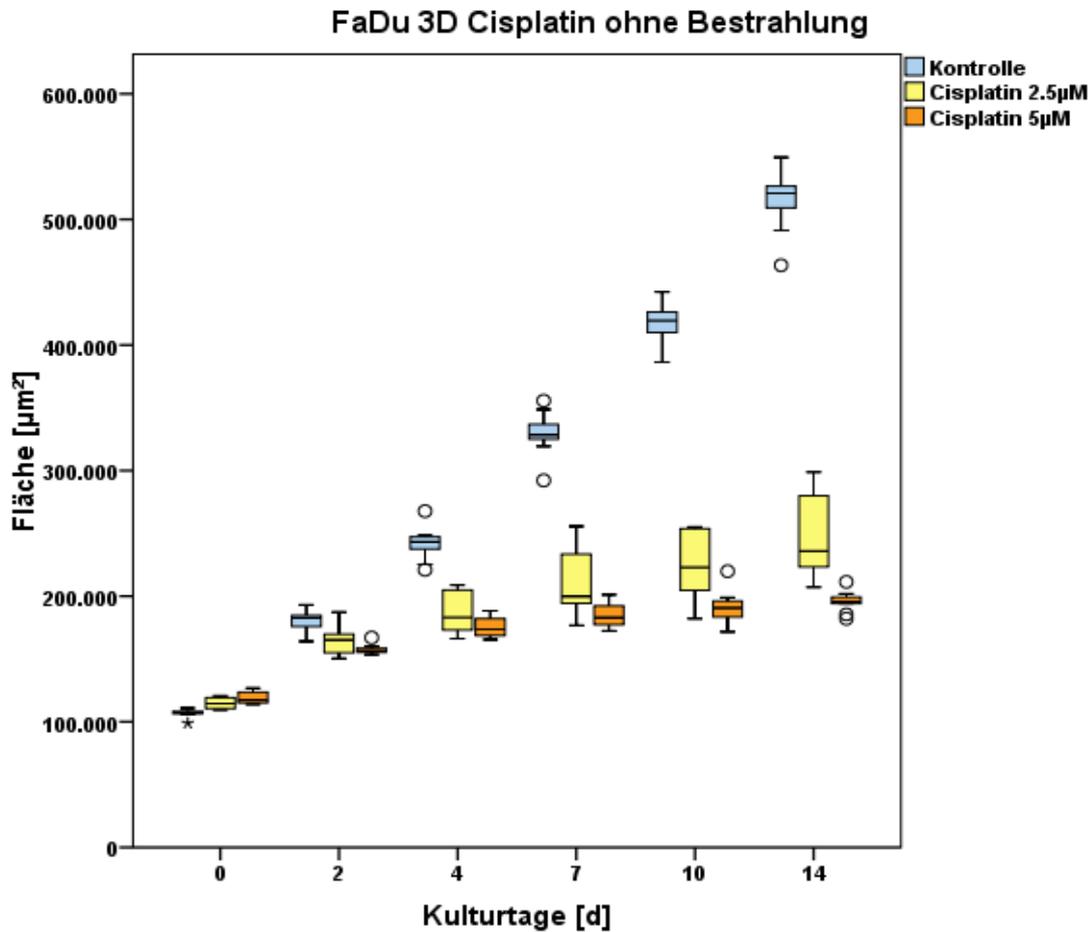


Abbildung 12: Zelllinie FaDu: Cisplatin-Konzentrationen (2,5 / 5µM) im Vergleich (ohne Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 15: Gemessene Flächenwerte der FaDu-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 2,5µM bzw. 5µM Cisplatin (24h) behandelten FaDu-Zellen. Und Vergleich der Konzentrationen (ohne Bestrahlung), n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Kontrolle ohne Bestrahlung	105376	177582	239218	325955	416939	515836
Cis 2,5µM ohne Bestrahlung	114924	164918	186389	210302	225015	243738
Cis 5µM ohne Bestrahlung	117931	156050	173141	180640	191367	194380
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: *p≤0,025						
Ko vs. 2,5µM Cis	0,008*	0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*
Ko vs. 5µM Cis	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*
*p≤0,05						
Cis 2,5 vs. 5µM	0,147	0,158	0,087	0,033*	0,002*	0,002*

Die unbestrahlten FaDu-Zellen, die mit den Cisplatin-Konzentrationen 2,5 μ M und 5 μ M behandelt wurden, zeigten durch das Chemotherapeutikum kleinere Flächenwerte im Vergleich zur Kontrolle außer an Tag 0. Dieser Effekt nahm mit steigender Konzentration zu.

Im Vergleich zur Kontrolle waren beide Cisplatinkonzentrationen (2,5 und 5 μ M) an allen Tagen signifikant, bei 2,5 μ M $p \leq 0,008$ und bei 5 μ M $p \leq 0,001$. Beim Vergleich der beiden Cisplatinkonzentrationen traten ab dem Tag 7 signifikante Unterschiede von $p \leq 0,033$ auf.

Wachstum FaDu 3D: Cisplatin-Konzentrationen (2,5 / 5µM) im Vergleich (mit Bestrahlung)

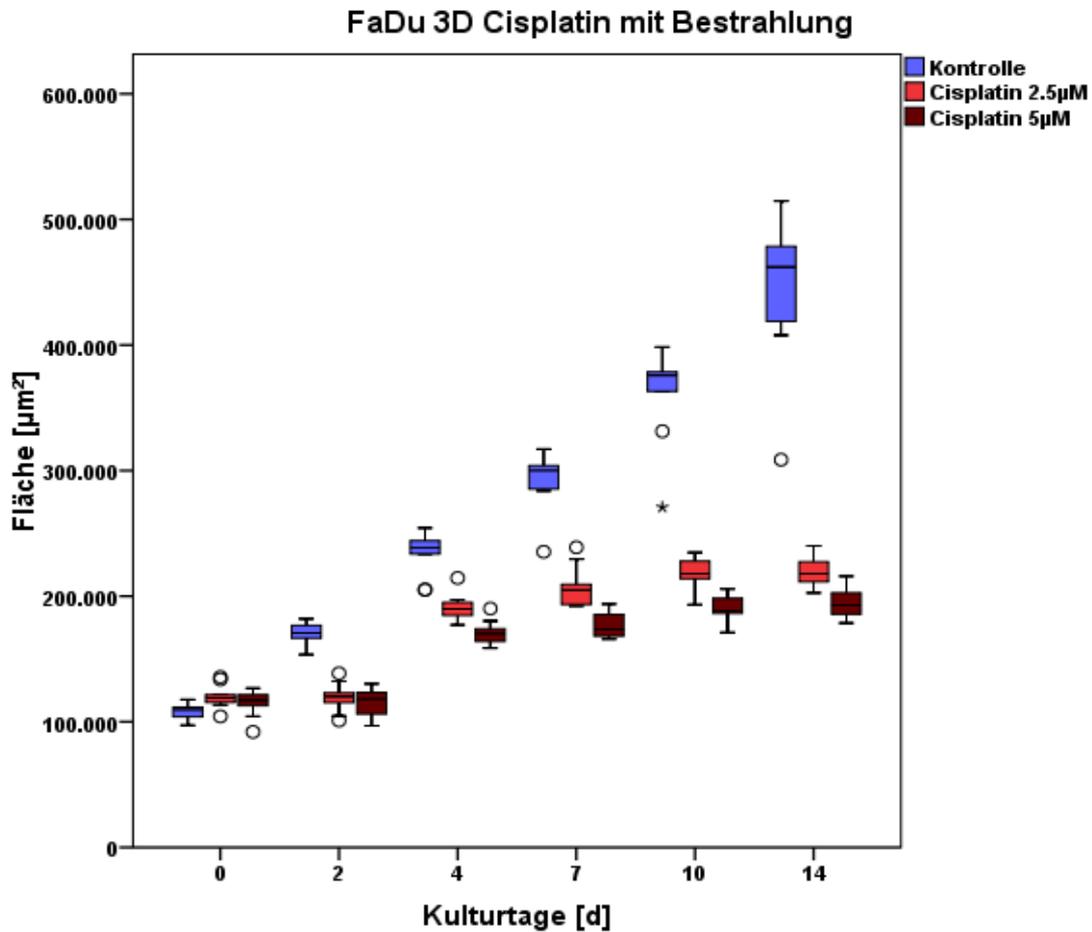


Abbildung 13: Zelllinie FaDu: Cisplatinkonzentrationen (2,5 / 5µM) im Vergleich (mit Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet); für den folgenden Versuch entsprachen die bestrahlten FaDu der Kontrollgruppe

Tabelle 16: Gemessene Flächenwerte der FaDu-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 2,5µM bzw. 5µM Cisplatin (24h) behandelten FaDu-Zellen. Und Vergleich der Konzentrationen (mit Bestrahlung), n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
FaDu mit Bestrahlung	108121	170340	234013	292374	363421	447630
Cis 2,5µM mit Bestrahlung	118099	119311	190278	202718	213249	214567
Cis 5µM mit Bestrahlung	114258	115524	169118	176356	189622	191885
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur *p≤0,025						
Ko vs. 2,5µM Cis	0,011*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*
Ko vs. 5µM Cis	0,031	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*
*p≤0,05						
Cis 2,5µM vs. 5µM	0,442	0,429	0,001*	0,002*	≤0,001*	0,001*

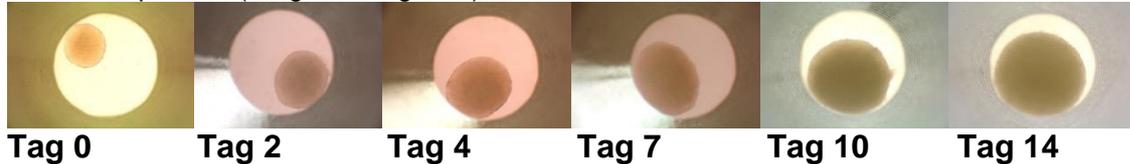
Die bestrahlten FaDu-Zellen zeigten in beiden Cisplatin-Konzentrationen (2,5µM und 5µM) geringere Flächenwerte als die Kontrolle. Signifikante Unterschiede waren an allen Tagen erkennbar, bei 2,5µM $p \leq 0,001$ und bei 5µM $p \leq 0,001$.

Beim Vergleich der beiden Cisplatin-Konzentrationen untereinander gab es Signifikanzen ab dem Tag 4 mit $p \leq 0,002$.

3.1.1.3. FaDu 3D: 5-FU (1 / 5 μ M) ohne und mit Bestrahlung

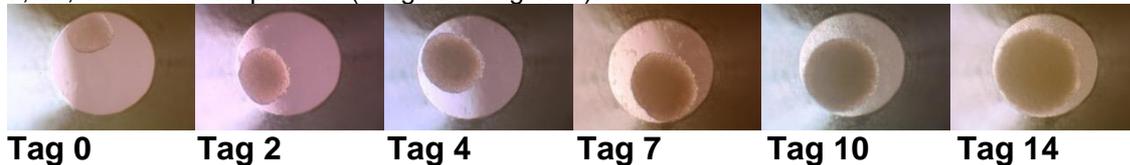
FaDu 1 μ M 5-FU ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 7: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide ohne Bestrahlung, die mit 1 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



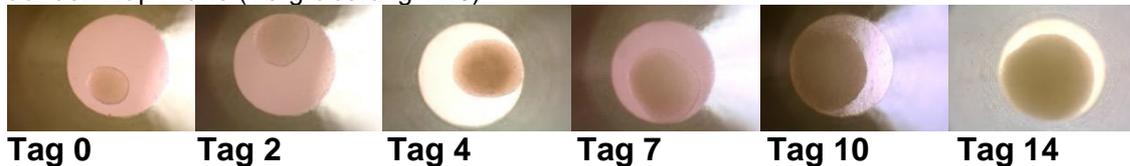
FaDu 1 μ M 5-FU mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 8: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide mit 3 x 2Gy Bestrahlung, die mit 1 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



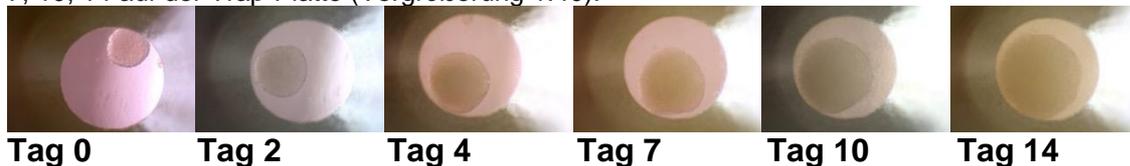
FaDu 5 μ M 5-FU ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 9: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide ohne Bestrahlung, die mit 5 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



FaDu 5 μ M 5-FU mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 10: Mikroskopische Bilder der FaDu-Sphäroide mit 3 x 2Gy Bestrahlung, die mit 5 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Wachstum FaDu 3D: 1µM 5-FU ohne und mit Bestrahlung

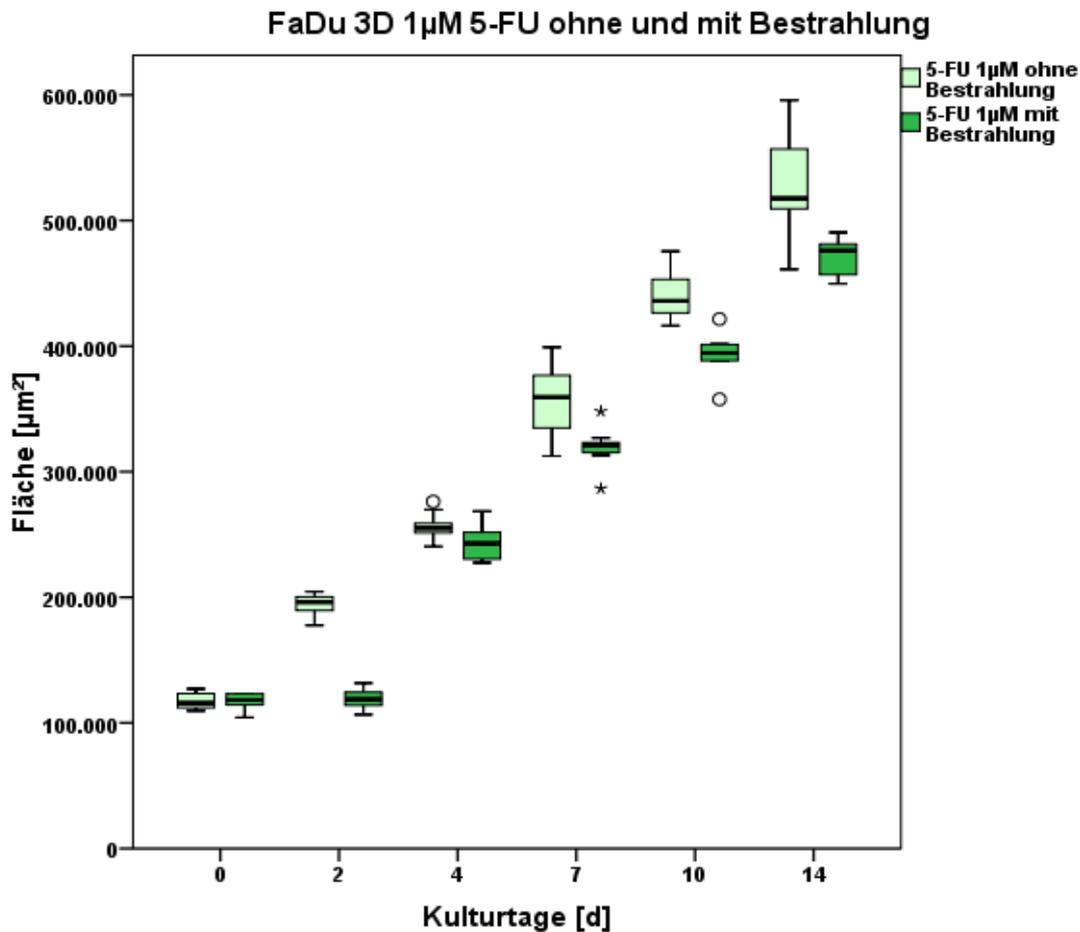


Abbildung 14: Zelllinie FaDu: mit 1µM 5-FU behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 17: Gemessene Flächenwerte der FaDu-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 1µM 5-FU (48h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. *p≤0,05

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
5-FU 1µM ohne Bestrahlung	118258	194576	255897	356597	440013	528449
5-FU 1µM mit Bestrahlung	117283	117371	241396	317102	393085	469187
p-Werte	0,785	≤0,001*	0,083	0,006*	≤0,001*	0,002*

Vergleich man die unbestrahlten mit den bestrahlten FaDu-Zellen, die mit 1µM 5-FU behandelt wurden, waren tendenziell geringere Flächenwerte bei den bestrahlten Zellen erkennbar. Signifikante Unterschiede waren an Tag 2, 7, 10 und 14 erkennbar mit p≤0,006.

Wachstum FaDu 3D: 5µM 5-FU ohne und mit Bestrahlung

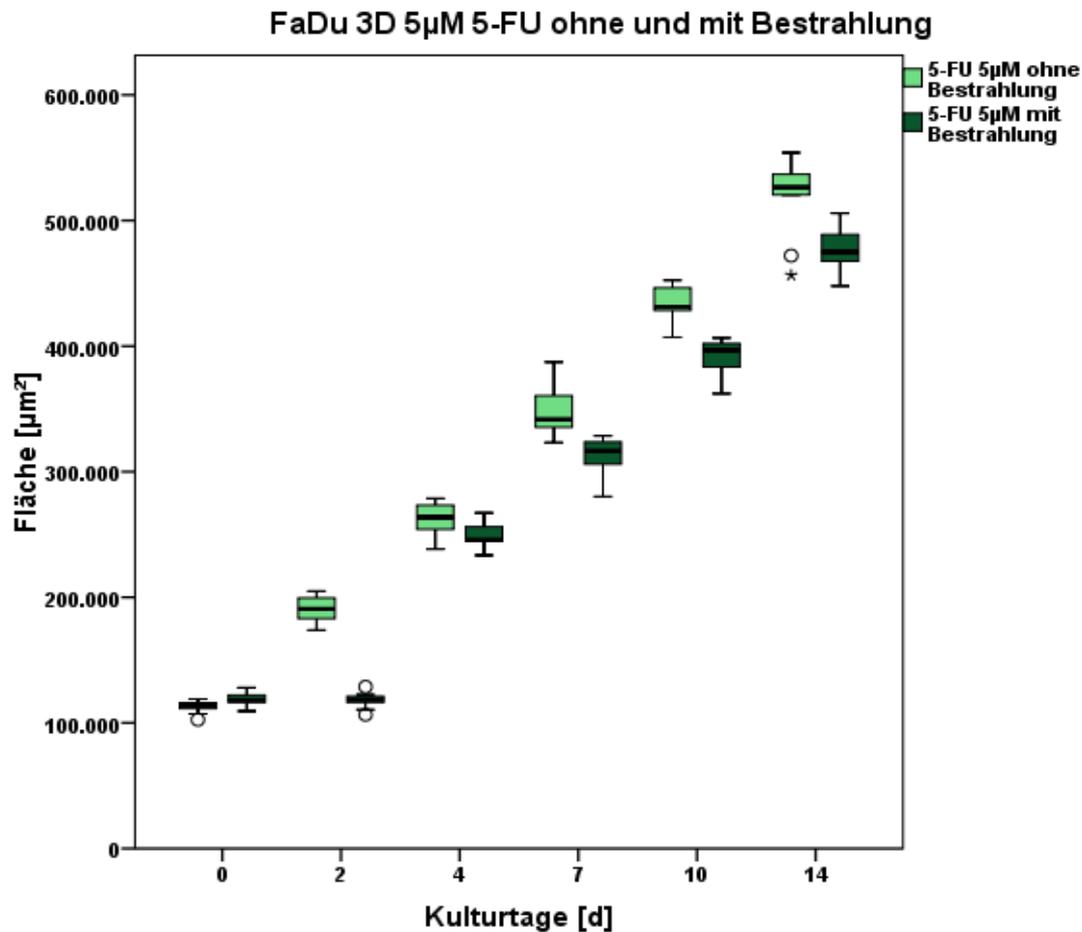


Abbildung 15: Zelllinie FaDu: mit 5µM 5-FU behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 18: Gemessene Flächenwerte der FaDu-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 5µM 5-FU (48h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. *p≤0,05

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
5-FU 5µM ohne Bestrahlung	112940	190579	262471	348795	434910	517911
5-FU 5µM mit Bestrahlung	116939	117483	247171	312765	390588	471419
p-Werte	0,002*	≤0,001*	0,018*	0,001*	≤0,001*	≤0,001*

Bei den FaDu-Zellen, die mit 5µM 5-FU behandelt wurden, waren tendenziell kleinere Flächenwerte der bestrahlten Zellen zu verzeichnen.

Signifikanzen zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Zellen waren an allen Tagen vorhanden mit p≤0,018.

**Wachstum FaDu 3D: 5-FU-Konzentrationen (1 / 5µM) im Vergleich
(ohne Bestrahlung)**

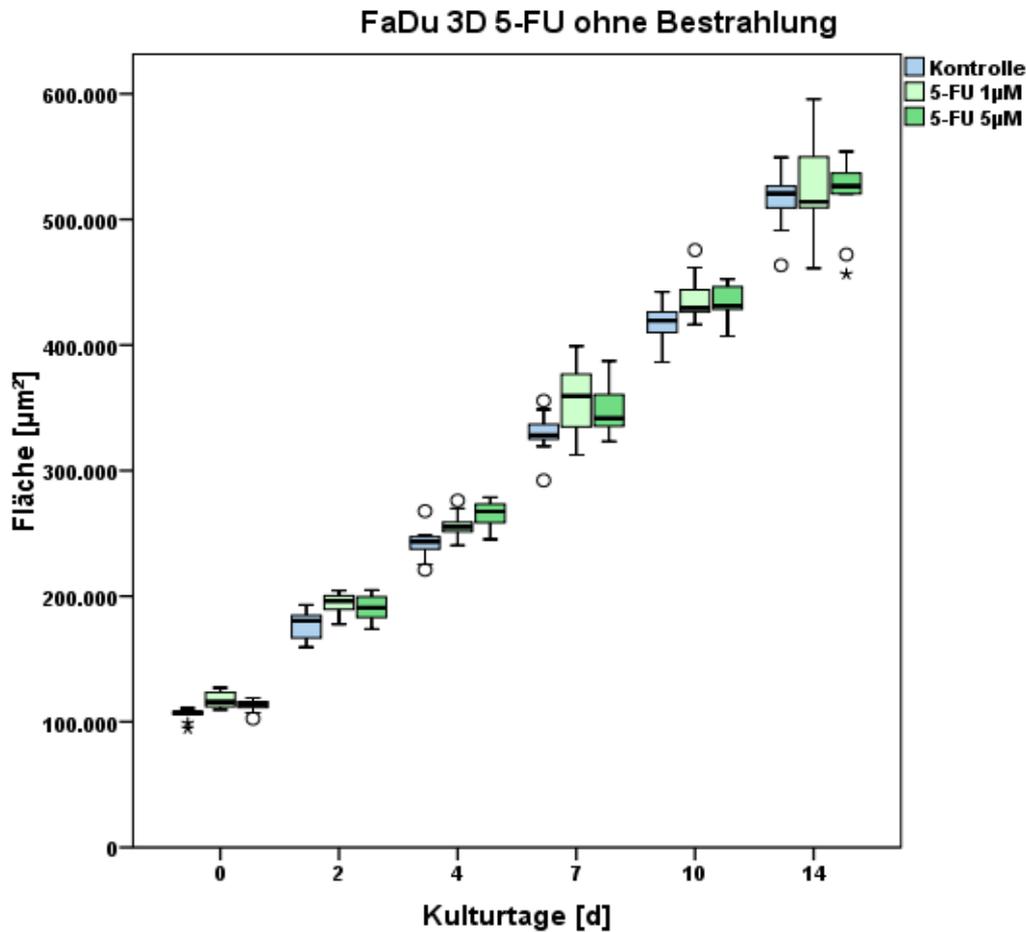


Abbildung 16: Zelllinie FaDu: 5-FU-Konzentrationen (1 / 5µM) im Vergleich (ohne Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 19: Gemessene Flächenwerte der FaDu-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 1µM bzw. 5µM 5-FU (48h) behandelten FaDu-Zellen (ohne Bestrahlung). Und Vergleich der Konzentrationen, n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Kontrolle ohne Bestrahlung	105376	177582	239218	325955	416939	515836
5-FU 1µM ohne Bestrahlung	118258	194576	255897	356597	440013	528449
5-FU 5µM ohne Bestrahlung	112940	190579	262471	348795	434910	517911
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur *p≤0,025						
Ko vs. 1µM 5-FU	≤0,001*	≤0,001*	0,005*	0,056	0,009*	0,552
Ko vs. 5µM 5-FU	≤0,001*	0,024*	0,001*	0,031	0,001*	0,724
*p≤0,05						
5-FU 1µM vs. 5µM	0,048*	0,193	0,100	0,578	0,701	0,680

Beim Vergleich der beiden 5-FU-Konzentrationen (1µM und 5µM) und der Kontrolle der unbestrahlten FaDu-Zellen war eine Flächenzunahme zu erkennen. Im Vergleich

zur Kontrolle hat die niedrigere Konzentration (1 μ M) an Tag 0, 2, 4 und 10 signifikante Werte ($p \leq 0,009$) und die höhere Konzentration (5 μ M) an Tag 0, 4 und 10 ($p \leq 0,024$). Beim Vergleich der beiden 5-FU Konzentrationen, gab es ab Tag 2 keine Signifikanzen ($p \geq 0,100$).

**Wachstum FaDu 3D: 5-FU-Konzentrationen (1 / 5µM) im Vergleich
(mit Bestrahlung)**

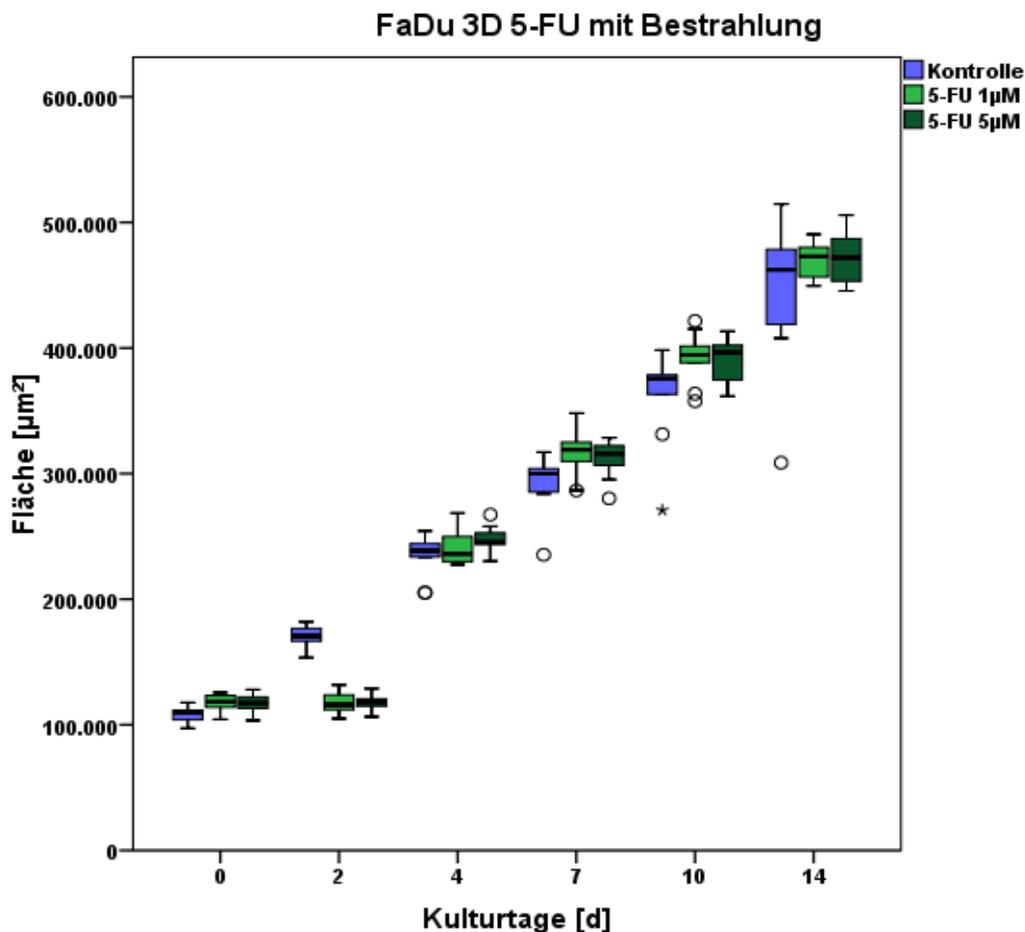


Abbildung 17: Zelllinie FaDu: 5-FU Konzentrationen (1 / 5µM) im Vergleich (mit Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet) für den folgenden Versuch entsprachen die bestrahlten FaDu der Kontrollgruppe

Tabelle 20: Gemessene Flächenwerte der FaDu-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 1µM bzw. 5µM 5-FU (48h) behandelten FaDu-Zellen (mit Bestrahlung). Und Vergleich der beiden Konzentrationen, n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
FaDu mit Bestrahlung	108121	170340	234013	292374	363421	447630
5-FU 1µM mit Bestrahlung	117283	117371	241396	317102	393085	469187
5-FU 5µM mit Bestrahlung	116939	117483	247171	312765	390588	471419
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur *p≤0,025						
Ko vs. 1µM 5-FU	0,006	≤0,001*	0,120	0,010*	0,031	0,255
Ko vs. 5µM 5-FU	0,002*	≤0,001*	0,037	0,004*	0,049	0,149
*p≤0,05						
5-FU 1µM vs. 5µM	0,673	0,772	0,326	0,501	0,654	0,677

Die bestrahlten FaDu-Zellen zeigten in beiden Konzentrationen (1 und 5µM) von 5-FU an Tag 2 ein signifikant geringeres Wachstum, im Vergleich zur Kontrolle mit

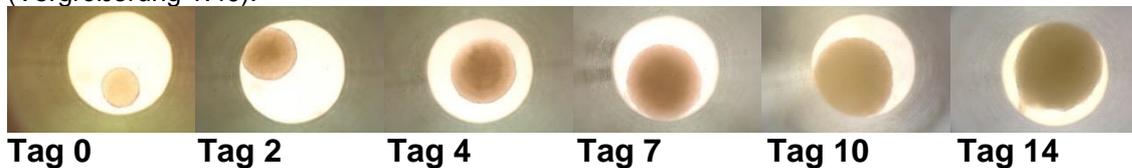
$p \leq 0,001$. An Tag 7 waren im Vergleich zur Kontrolle die FaDu-Zellen in beiden 5-FU-Konzentrationen signifikant größer ($1\mu\text{M } p \leq 0,010$ und $5\mu\text{M } p \leq 0,004$). Beim Vergleich der beiden Konzentrationen gab es keine signifikanten Unterschiede ($p \geq 0,326$).

3.1.2. Cal27

3.1.2.1. Cal27 3D: ohne und mit Bestrahlung

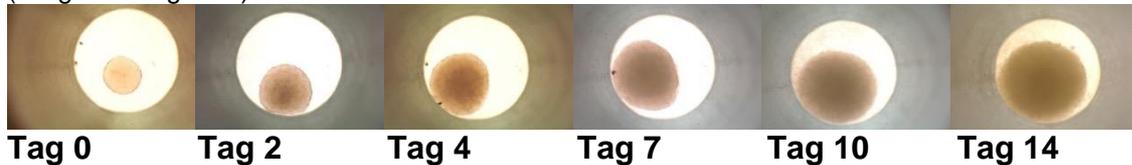
Cal27 ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 11: Mikroskopische Bilder der Cal27-Sphäroide ohne Bestrahlung und im hängenden Tropfen angezchtet, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Cal27 mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 12: Mikroskopische Bilder der Cal27-Sphäroide mit Bestrahlung $3 \times 2\text{Gy}$ und im hängenden Tropfen angezchtet, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Wachstum Cal27 3D: ohne und mit Bestrahlung

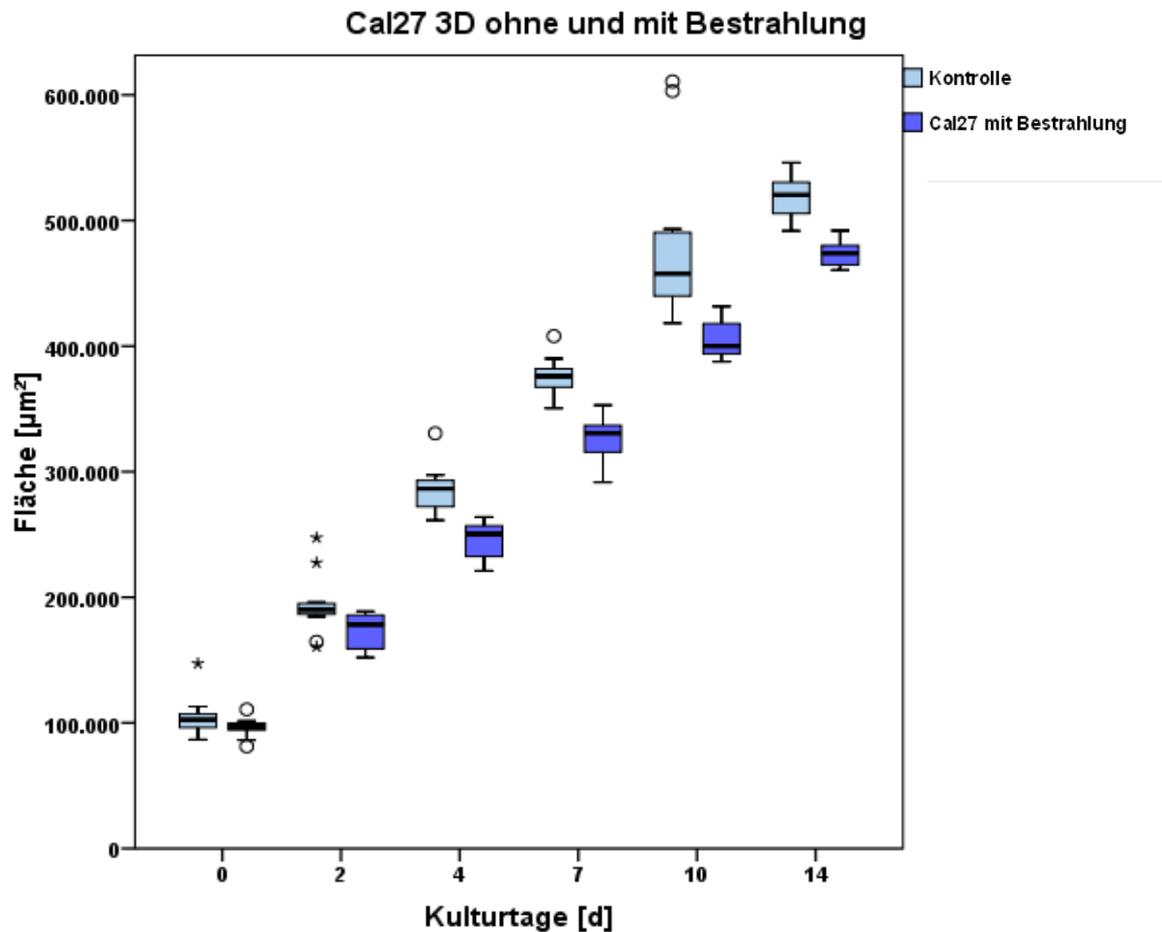


Abbildung 18: Zelllinie Cal27: Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 21: Gemessene Flächenwerte der Cal27-Zellen in μm^2 und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten Cal27-Zellen, $n=12$ pro Gruppe. $*p \leq 0,05$

Flächenwerte in μm^2	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Kontrolle	104455	194042	285348	376169	481852	519270
Cal27 mit Bestrahlung	96280	173364	246424	327349	405465	473275
p-Werte	0,155	0,041*	0,001*	$\leq 0,001^*$	0,004*	$\leq 0,001^*$

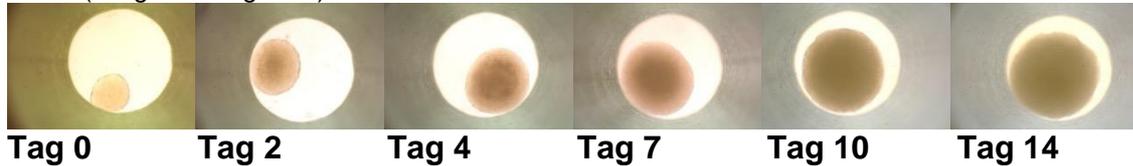
Im Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten Cal27-Zellen, waren kleinere Flächenwerte bei den bestrahlten Zellen zu erkennen.

Dabei sind die unbestrahlten und bestrahlten Cal27-Zellen ab dem Tag 2 signifikant zueinander ($p \leq 0,041$).

3.1.2.2. Cal27 3D: 5-FU (1 / 5 μ M) ohne und mit Bestrahlung

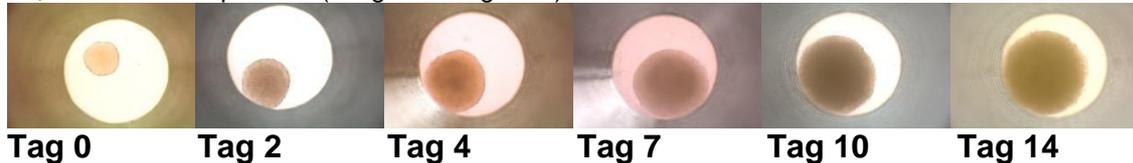
Cal27 1 μ M 5-FU ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 13: Mikroskopische Bilder der Cal27-Sphäroide, die mit 1 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



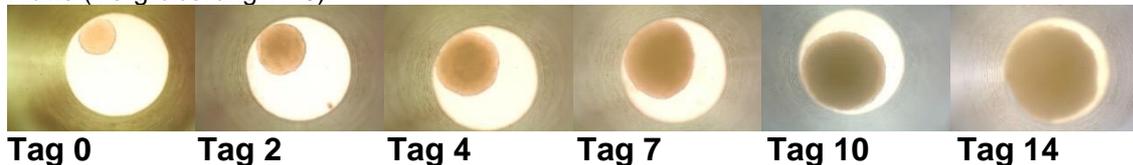
Cal27 1 μ M 5-FU mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 14: Mikroskopische Bilder der Cal27-Sphäroide, die mit 3 x 2Gy bestrahlt, mit 1 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Cal27 5 μ M 5-FU ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 15: Mikroskopische Bilder der Cal27-Sphäroide, die mit 5 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Cal27 5 μ M 5-FU mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 16: Mikroskopische Bilder der Cal27-Sphäroide, die mit 3 x 2Gy bestrahlt, mit 5 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10, 14 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Wachstum Cal27 3D: 1µM 5-FU ohne und mit Bestrahlung

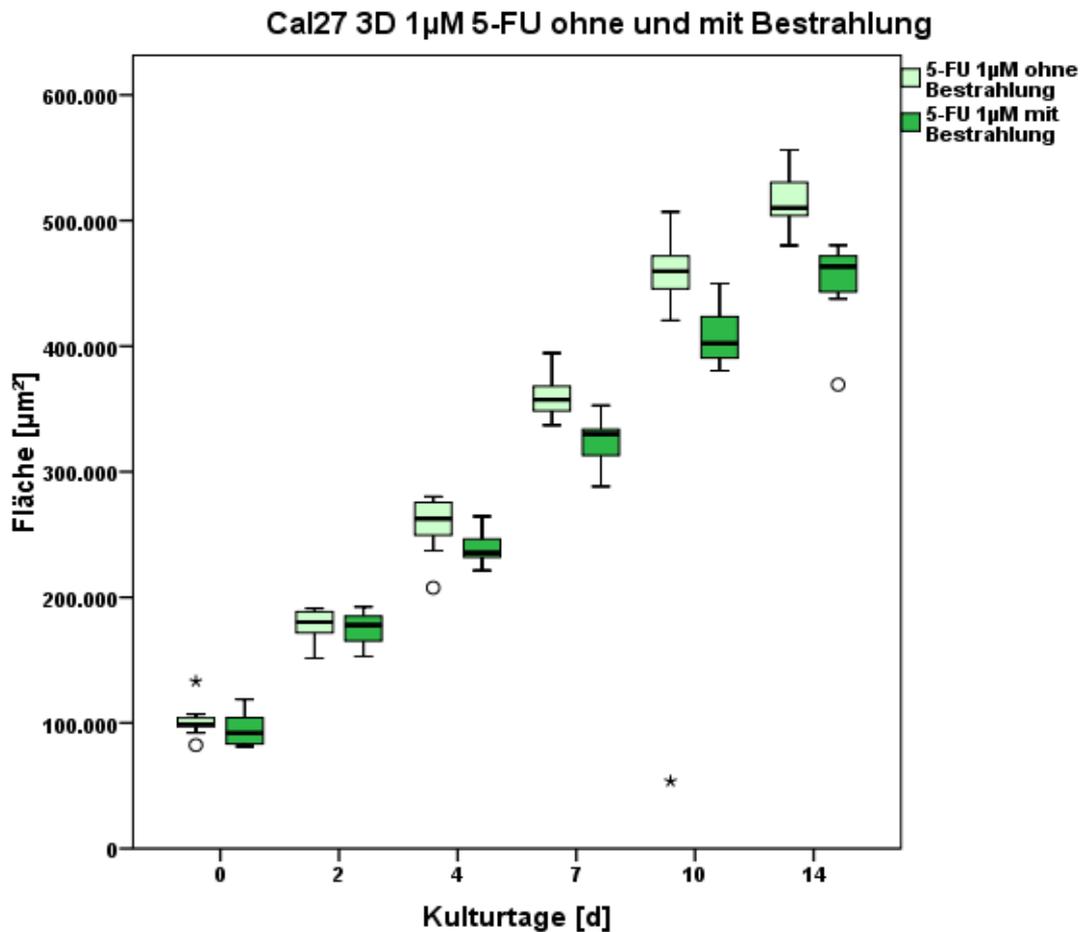


Abbildung 19: Zelllinie Cal27: mit 1µM 5-FU behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 22: Gemessene Flächenwerte der Cal27-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten Cal27-Zellen die gleichzeitig mit 1µM 5-FU (48h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. *p≤0,05

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
5-FU 1µM ohne Bestrahlung	101300	176865	258028	359880	469267	515020
5-FU 1µM mit Bestrahlung	94734	175335	239708	324895	408115	453935
p-Werte	0,209	0,486	0,070	0,004*	0,050*	≤0,001*

Die mit 1µM 5-FU behandelten Cal27-Zellen zeigten im Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen tendenziell geringere Flächenwerte durch die Bestrahlung.

Die Signifikanzen sind ab Tag 7 sichtbar (p≤0,05).

Wachstum Cal27 3D: 5µM 5-FU ohne und mit Bestrahlung

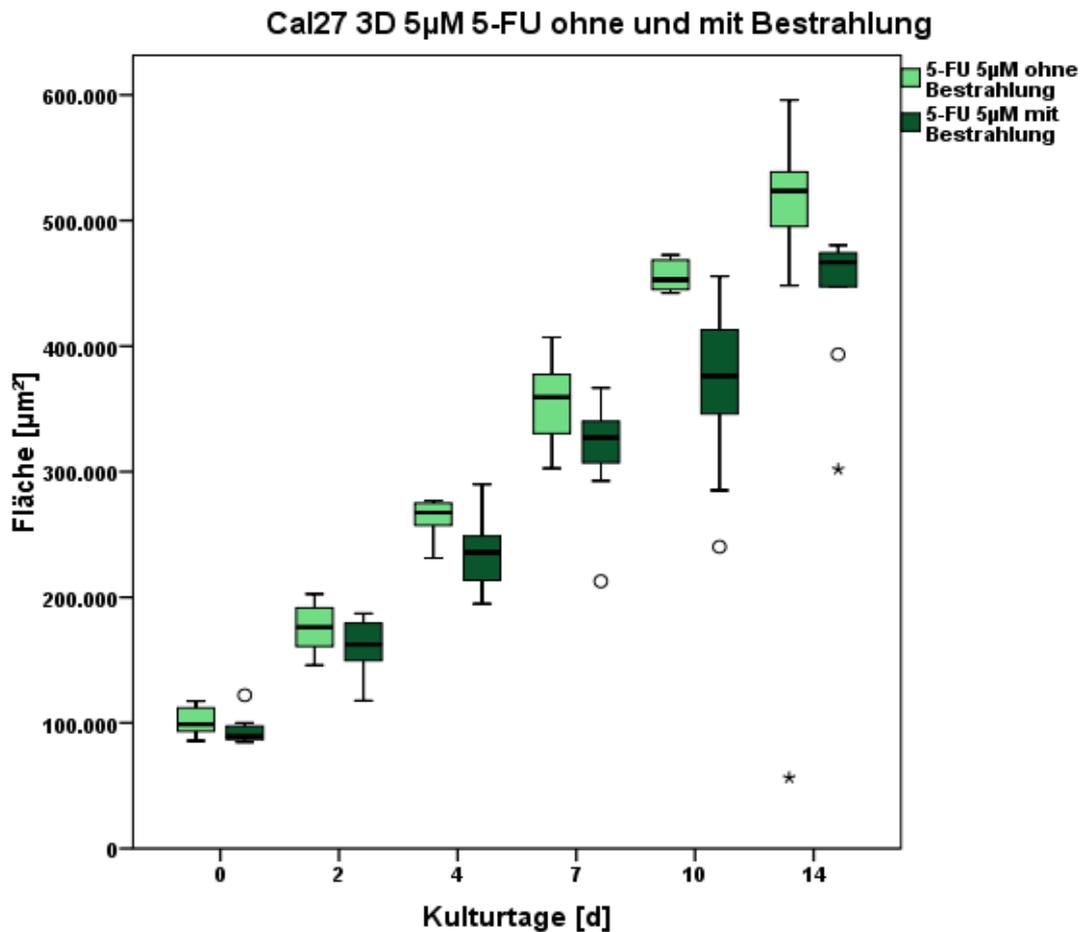


Abbildung 20: Zelllinie Cal27: mit 5µM 5-FU behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 23: Gemessene Flächenwerte der Cal27-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten Cal-27-Zellen, die gleichzeitig mit 5µM 5-FU (48h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. *p≤0,05

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
5-FU 5µM ohne Bestrahlung	101566	176781	261385	355057	455600	526448
5-FU 5µM mit Bestrahlung	94080	160474	235121	316327	368683	444491
p-Werte	0,214	0,189	0,003*	0,005*	0,005*	0,074

Beim Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten Cal27, die mit 5µM 5-FU behandelt wurden, waren kleinere Flächenwerte bei den bestrahlten Zellen zu erkennen.

Signifikante Unterschiede waren an Tag 4, 7 und 10 vorhanden (p≤0,005).

**Wachstum Cal27 3D: 5-FU-Konzentrationen (1 / 5µM) im Vergleich
(ohne Bestrahlung)**

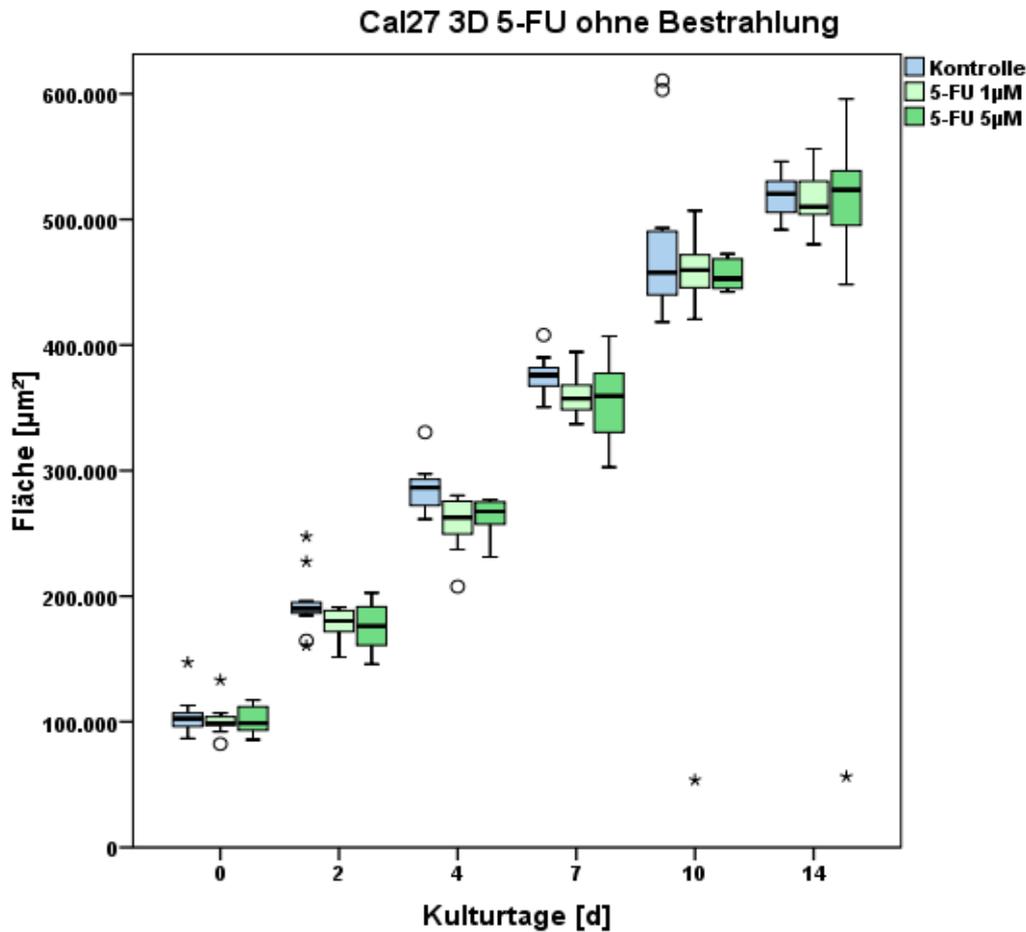


Abbildung 21: Zelllinie Cal27: 5-FU-Konzentrationen (1 / 5µM) im Vergleich (ohne Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 24: Gemessene Flächenwerte der Cal27-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 1µM bzw. 5µM 5-FU behandelten Cal27-Zellen (ohne Bestrahlung). Und Vergleich der Konzentrationen, n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Kontrolle ohne Bestrahlung	104455	194042	285348	376169	481852	519270
5-FU 1µM ohne Bestrahlung	101300	176865	258028	359880	469267	515020
5-FU 5µM ohne Bestrahlung	101566	176781	261385	355057	455600	526448
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur *p≤0,025						
Ko vs. 1µM 5-FU	0,648	0,114	0,008*	0,058	0,131	0,679
Ko vs. 5µM 5-FU	0,628	0,059	0,009*	0,102	0,314	0,878
*p≤0,05						
5-FU 1µM vs. 5µM	0,959	0,990	0,410	0,691	0,594	0,508

Die nicht bestrahlten Cal27-Zellen zeigten in den beiden 5-FU Konzentrationen

(1 μ M und 5 μ M) im Vergleich zur Kontrolle nur eine geringe Wachstumshemmung. Es gab Signifikanzen zwischen der Kontrolle und 1 μ M 5-FU ($p=0,008$) und zwischen Kontrolle und 5 μ M 5-FU ($p=0,009$) jeweils an Tag 4, sonst waren keine Signifikanzen vorhanden.

Wachstum Cal27 3D: 5-FU-Konzentrationen (1 / 5µM) im Vergleich (mit Bestrahlung)

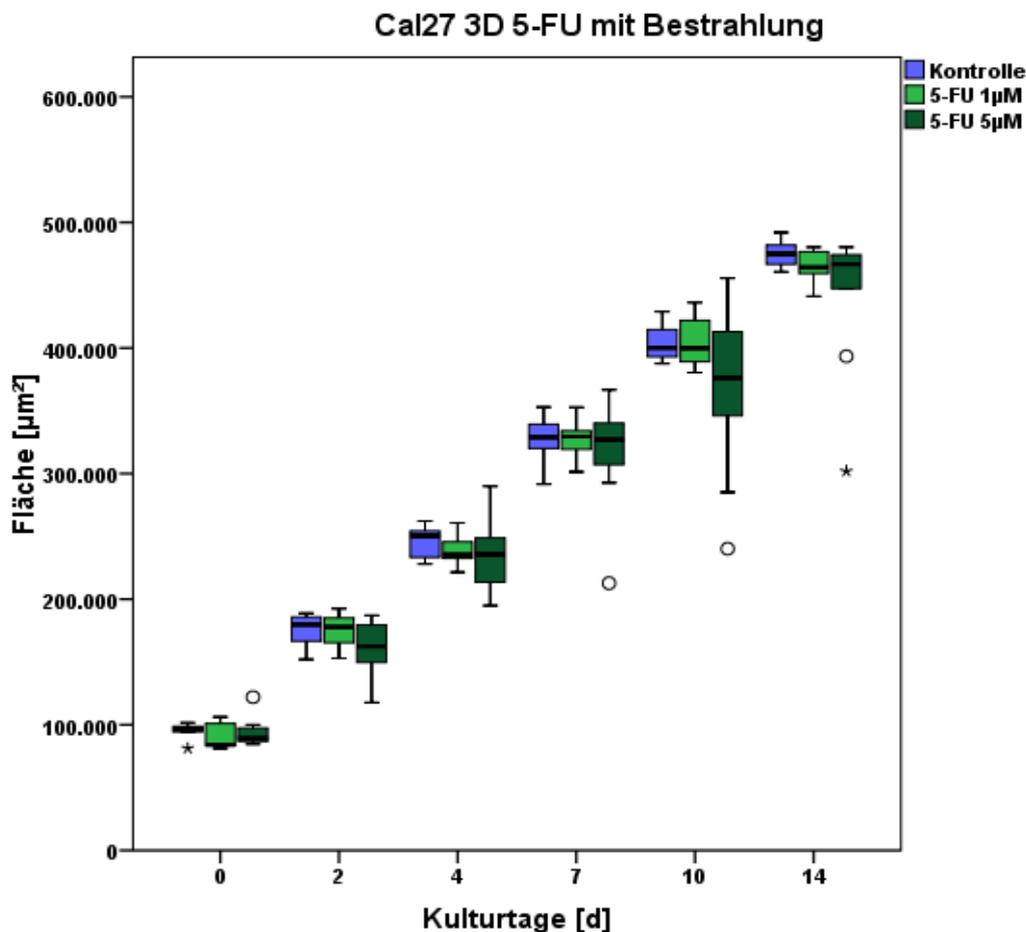


Abbildung 22: Zelllinie Cal27: mit 5-FU-Konzentrationen im Vergleich (mit Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet); für den folgenden Versuch entsprachen die bestrahlten Cal27 der Kontrollgruppe

Tabelle 25: Gemessene Flächenwerte der Cal27-Zellen in μm^2 und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den $1\mu\text{M}$ bzw. $5\mu\text{M}$ 5-FU (48h) behandelten Cal27-Zellen (mit Bestrahlung). Und Vergleich der Konzentrationen, n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in μm^2	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Cal27 mit Bestrahlung	96280	173364	246424	327349	405465	473275
5-FU $1\mu\text{M}$ mit Bestrahlung	94734	175335	239708	324895	408115	453935
5-FU $5\mu\text{M}$ mit Bestrahlung	94080	160474	235121	316327	368683	444491
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur * $p \leq 0,025$						
Ko vs. $1\mu\text{M}$ 5-FU	0,756	0,979	0,350	0,773	0,720	0,068
Ko vs. $5\mu\text{M}$ 5-FU	0,724	0,036	0,135	0,359	0,129	0,139
* $p \leq 0,05$						
5-FU $1\mu\text{M}$ vs. $5\mu\text{M}$	0,577	0,099	0,737	0,530	0,124	0,169

Die bestrahlten Cal27 zeigten in beiden Konzentrationen (1 und $5\mu\text{M}$) nur eine

tendenzielle Flächenabnahme, im Vergleich zur Kontrolle. Es gab keine Signifikanzen beim Vergleich der Kontrolle mit 1 μ M $p \geq 0,068$ bzw. 5 μ M 5-FU von $p \geq 0,036$. Beim Vergleich der beiden Konzentrationen untereinander gab es auch keine signifikanten Unterschiede ($p \geq 0,099$).

3.1.3. PiCa

3.1.3.1. PiCa 3D: ohne und mit Bestrahlung

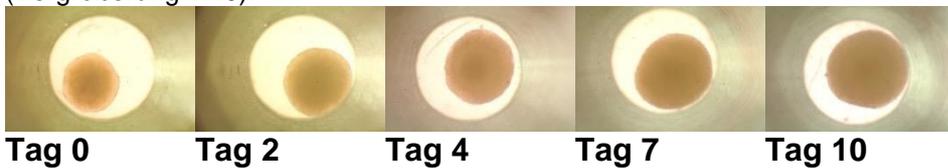
PiCa ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 17: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide angezchtet im hängenden Tropfen, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



PiCa mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 18: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 3 x2Gy bestrahlt und im hängenden Tropfen angezchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Wachstum PiCa 3D: ohne und mit Bestrahlung

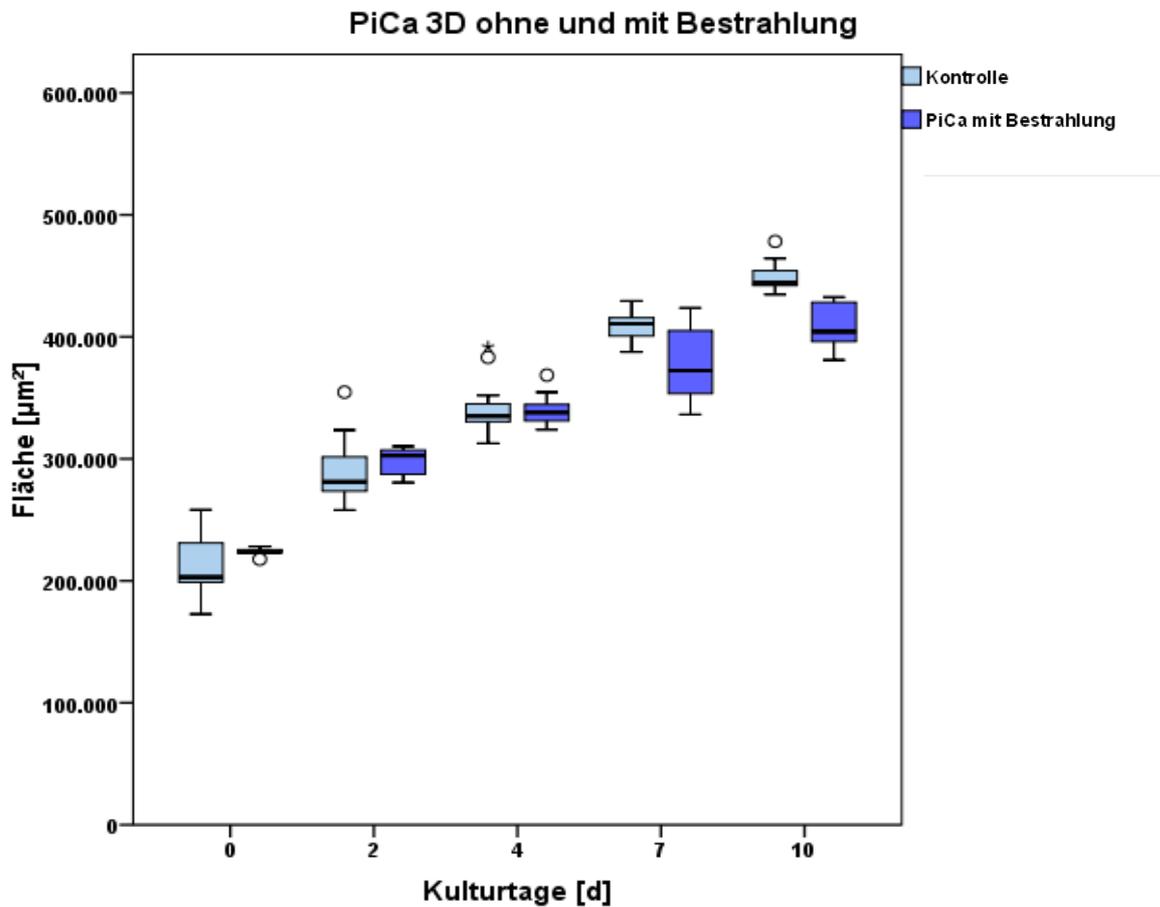


Abbildung 23: Zelllinie PiCa: Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 26: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in μm^2 und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten PiCa-Zellen, n=12 pro Gruppe. * $p \leq 0,05$

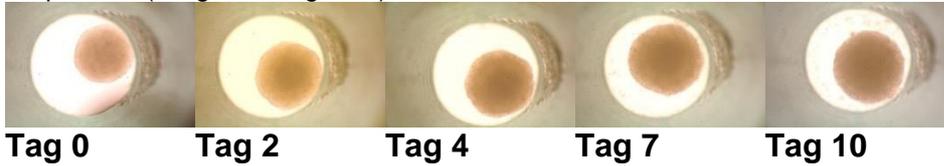
Flächenwerte in μm^2	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
Kontrolle	208443	289682	340026	408406	442543
PiCa mit Bestrahlung	223761	298170	339993	376113	407944
p-Werte	0,208	0,182	1,000	0,011*	0,002*

Bei den PiCa-Zellen gab es erst ab dem Tag 7 signifikant kleinere Flächen durch die Bestrahlung mit 3 x 2Gy im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,011$).

3.1.3.2. PiCa 3D: Cisplatin (2,5 / 5 μ M) ohne und mit Bestrahlung

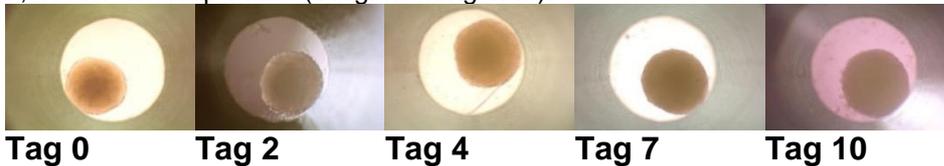
PiCa 2,5 μ M Cisplatin ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 19: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 2,5 μ M Cisplatin behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



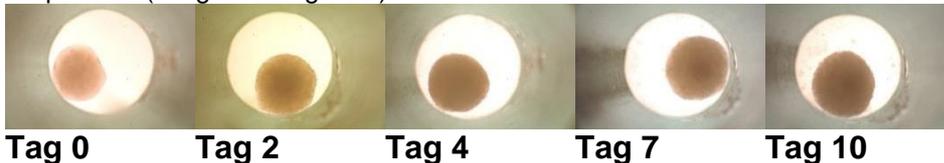
PiCa 2,5 μ M Cisplatin mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 20: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 3 x 2Gy bestrahlt, mit 2,5 μ M Cisplatin behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



PiCa 5 μ M Cisplatin ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 21: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 5 μ M Cisplatin behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



PiCa 5 μ M Cisplatin mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 22: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 3 x 2Gy bestrahlt, mit 5 μ M Cisplatin behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Wachstum PiCa 3D: 2,5µM Cisplatin ohne und mit Bestrahlung

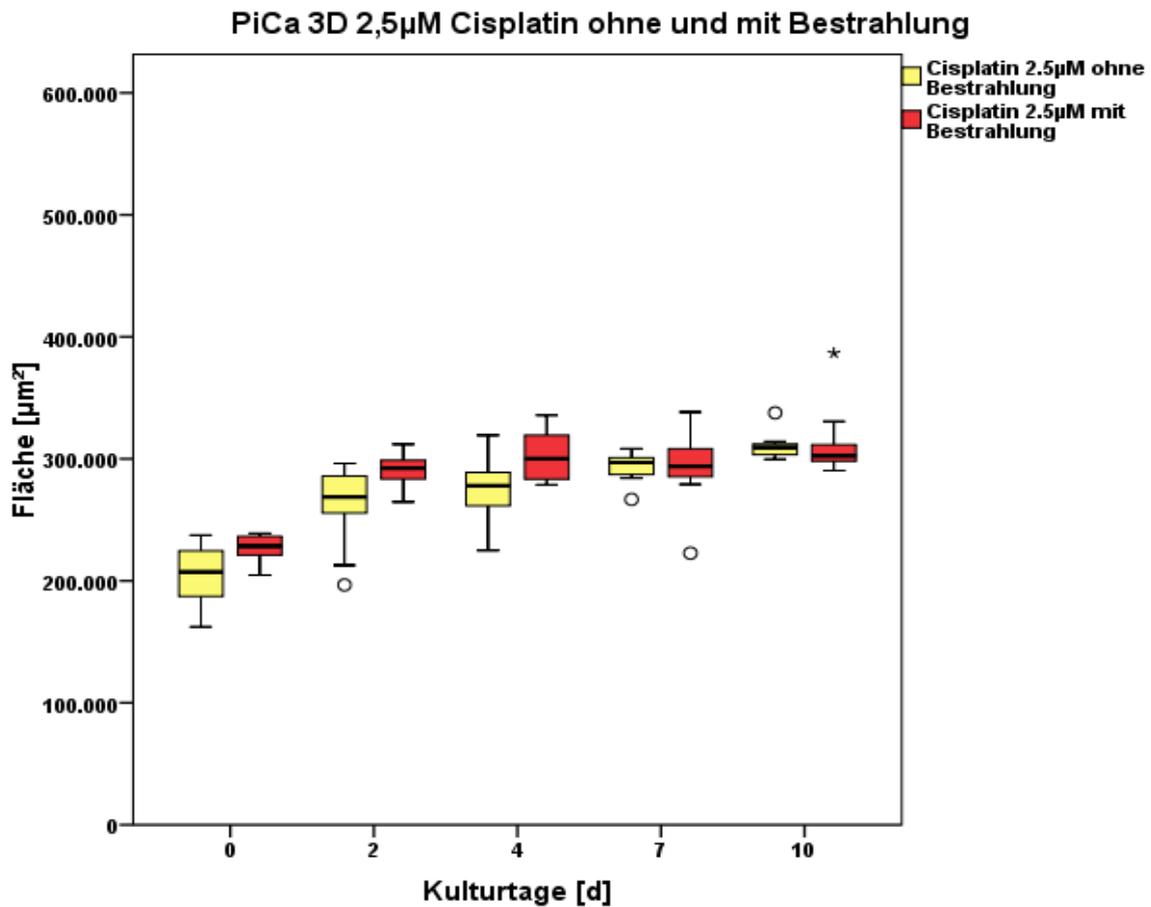


Abbildung 24: Zelllinie PiCa: mit 2,5 µM Cisplatin behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 27: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten PiCa-Zellen die gleichzeitig mit 2,5µM Cisplatin (24h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. *p≤0,05

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
Cis 2,5µM ohne Bestrahlung	201604	262717	275878	293680	306907
Cis 2,5µM mit Bestrahlung	225166	290262	302030	295118	313971
p-Werte	0,027*	0,010*	0,003*	0,889	0,767

Die PiCa-Zellen, die mit 2,5µM Cisplatin behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle durch die Bestrahlung größere Flächenwerte. Dabei gab es Signifikanzen an Tag 0, 2 und 4 mit p≤0,027.

Wachstum PiCa 3D: 5 μM Cisplatin ohne und mit Bestrahlung

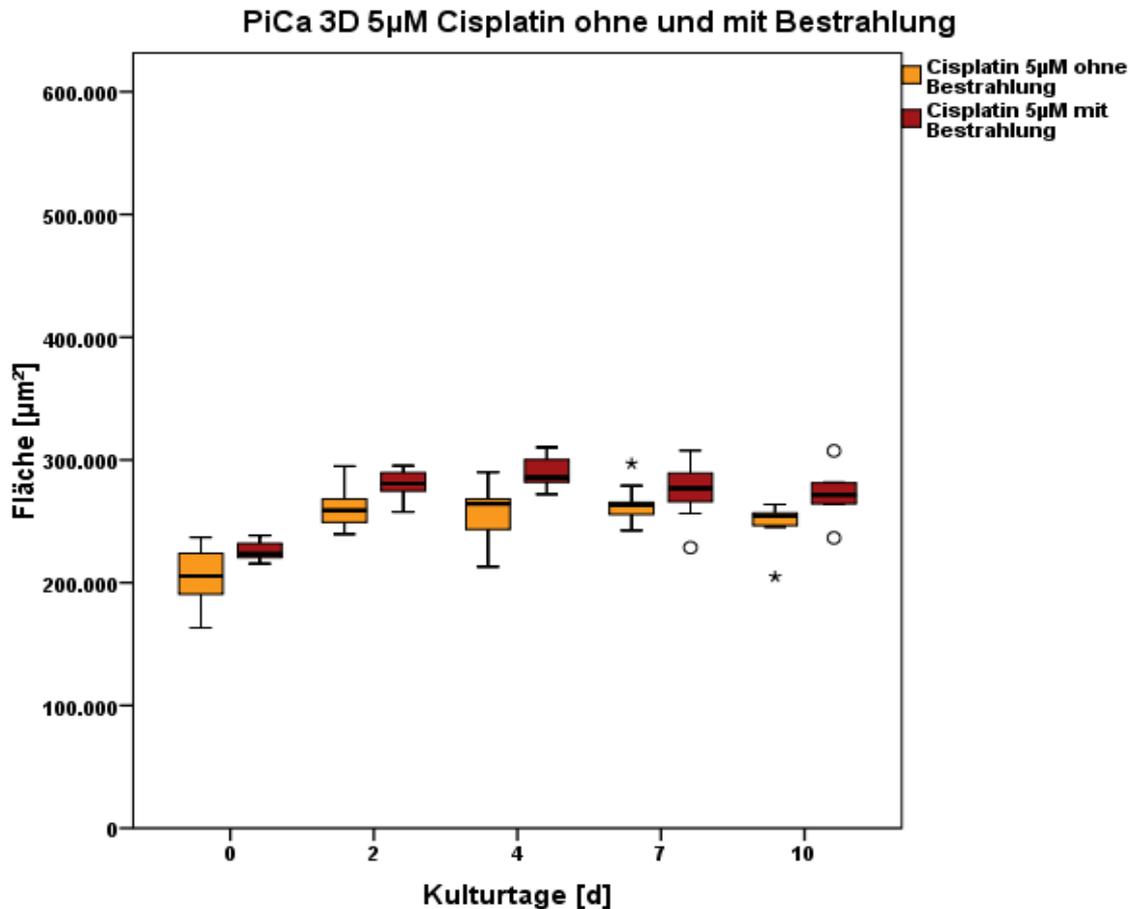


Abbildung 25: Zelllinie PiCa: mit 5 μM Cisplatin behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 28: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in μm^2 und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten PiCa-Zellen die gleichzeitig mit 5 μM Cisplatin (24h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. * $p \leq 0,05$

Flächenwerte in μm^2	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
Cis 5 μM ohne Bestrahlung	204415	261121	257195	263313	251773
Cis 5 μM mit Bestrahlung	225726	278828	288078	271413	273732
p-Werte	0,061	0,003*	0,005*	0,131	0,079

Bei den mit 5 μM Cisplatin behandelten PiCa-Zellen war tendenziell eine Flächenzunahme durch Bestrahlung zu identifizieren. Signifikante Werte gab es nur an Tag 2 und 4 ($p \leq 0,005$).

Wachstum PiCa 3D: Cisplatin-Konzentrationen (2,5 / 5µM) im Vergleich (ohne Bestrahlung)

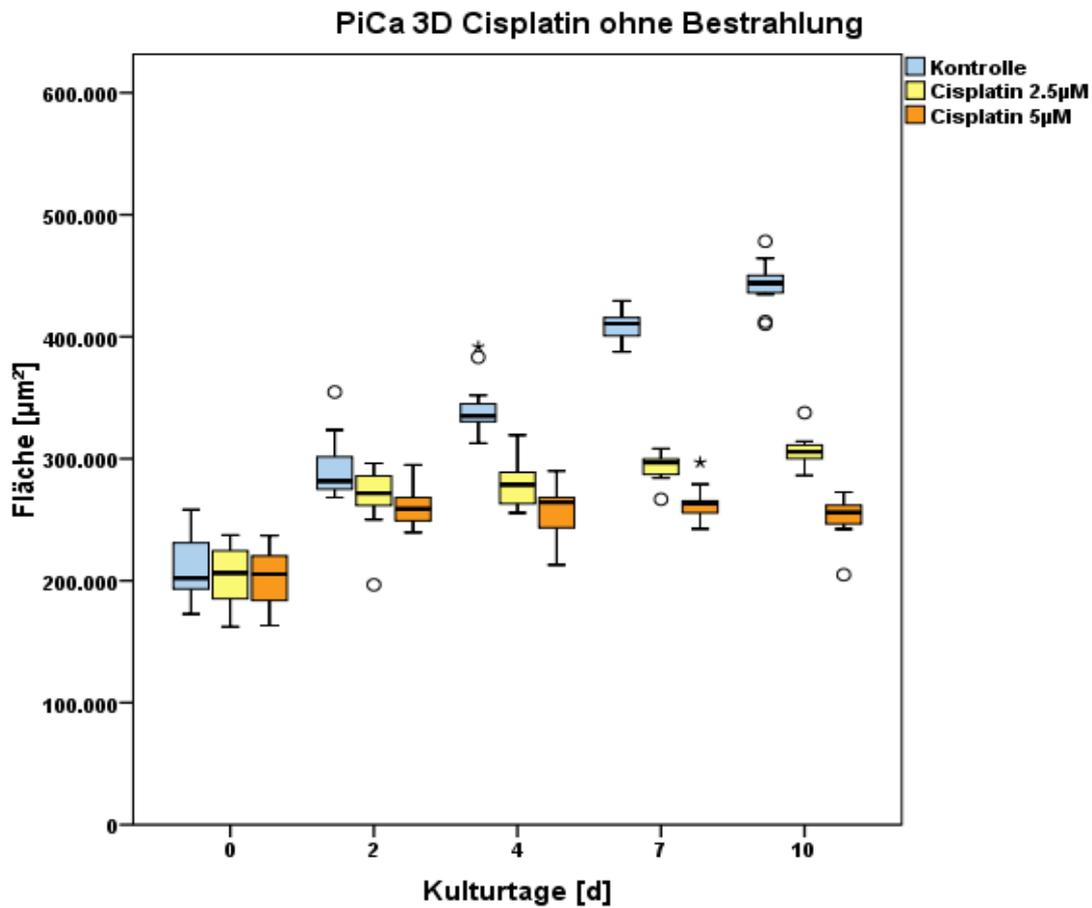


Abbildung 26: Zelllinie PiCa: Cisplatin-Konzentrationen (2,5 / 5µM) im Vergleich (ohne Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 29: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 2,5µM bzw. 5µM Cisplatin (24h) behandelten PiCa-Zellen (ohne Bestrahlung). Und Vergleich der Konzentrationen, n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
Kontrolle ohne Bestrahlung	208443	289682	340026	408406	442543
Cis 2,5 µM ohne Bestrahlung	201604	262717	275878	293680	306907
Cis 5 µM ohne Bestrahlung	204415	261121	257195	263313	251773
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur *p≤0,025					
Ko vs. 2,5 µM Cis	0,515	0,041	0,002*	≤0,001*	≤0,001*
Ko vs. 5 µM Cis	0,743	0,008*	0,003*	0,003*	≤0,001*
*p≤0,05					
Cis 2,5µM vs. 5 µM	0,749	0,538	0,030*	0,006*	≤0,001*

Die unbestrahlten PiCa-Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle in beiden Cisplatin-Konzentrationen geringere Flächenwerte. Dabei ergaben sich Signifikanzen zwischen der Kontrolle und der 2,5 μM Cisplatin-Konzentration ab dem Tag 4 mit $p \leq 0,002$. Zwischen der Kontrolle und der 5 μM Cisplatin-Konzentration gab es ab dem Tag 2 an allen Tagen signifikant kleinere Flächenwerte durch Cisplatin mit $p \leq 0,008$. Im Vergleich der beiden Cisplatin-Konzentrationen untereinander, war eine signifikante Abnahme der Flächen ab dem Tag 4 von $p \leq 0,030$ zu erkennen.

Wachstum PiCa 3D: Cisplatin-Konzentrationen (2,5 / 5µM) im Vergleich (mit Bestrahlung)

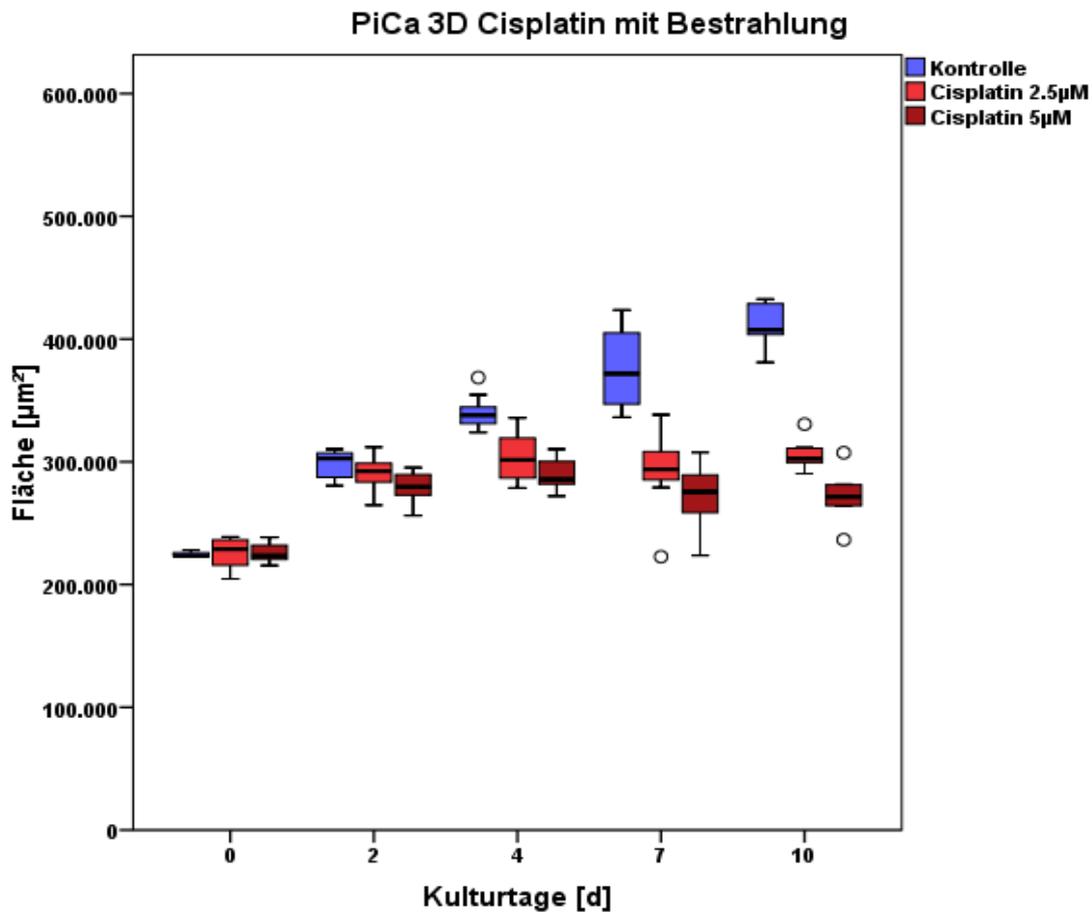


Abbildung 27: Zelllinie PiCa: Cisplatin-Konzentrationen (2,5 / 5µM) im Vergleich (mit Bestrahlung); für den folgenden Versuch entsprechen die bestrahlten PiCa der Kontrollgruppe

Tabelle 30: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 2,5µM bzw. 5µM Cisplatin (24h) behandelten PiCa-Zellen (mit Bestrahlung) und Vergleich der Konzentrationen, n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
PiCa mit Bestrahlung	223761	298170	339993	376113	407944
Cis 2,5 µM mit Bestrahlung	225166	290262	302030	295118	313971
Cis 5 µM mit Bestrahlung	225726	278828	288078	271413	273732
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur *p≤0,025					
Ko vs. 2,5 µM Cis	0,751	0,035	≤0,001*	≤0,001*	0,008*
Ko vs. 5 µM Cis	0,682	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*	≤0,001*
*p≤0,05					
Cis 2,5µM vs. 5 µM	0,992	0,024*	0,004*	0,022*	0,028*

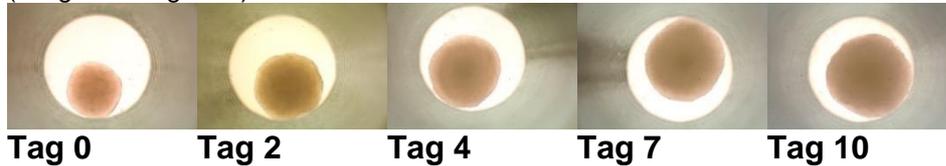
Die bestrahlten PiCa-Zellen zeigten tendenziell kleinere Flächenwerte beim Vergleich der Cisplatin-Konzentrationen (2,5µM und 5µM) mit der Kontrolle. In der niedrigen

Cisplatin-Konzentration von 2,5 μ M gab es im Vergleich zur Kontrolle ab Tag 4 Signifikanzen von $p \leq 0,008$ und in der 5 μ M Cisplatin-Konzentration ab Tag 2 mit $p \leq 0,001$. Beim Vergleich der beiden Cisplatin-Konzentrationen untereinander gab es ab dem Tag 2 an allen Tagen Signifikanzen mit $p \leq 0,028$.

3.1.3.3. PiCa 3D: 5-FU (10 / 30 μ M) ohne und mit Bestrahlung

PiCa 10 μ M 5-FU ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 23: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 10 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



PiCa 10 μ M 5-FU mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 24: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 3 x 2Gy bestrahlt, mit 10 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



PiCa 30 μ M 5-FU ohne Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 25: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 30 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



PiCa 30 μ M 5-FU mit Bestrahlung

Mikroskopische Bilder 26: Mikroskopische Bilder der PiCa-Sphäroide, die mit 3 x 2Gy bestrahlt, mit 30 μ M 5-FU behandelt und im hängenden Tropfen angezüchtet wurden, fotografiert an Tag 0, 2, 4, 7, 10 auf der Trap-Platte (Vergrößerung 1:40).



Wachstum PiCa 3D: 10µM 5-FU ohne und mit Bestrahlung

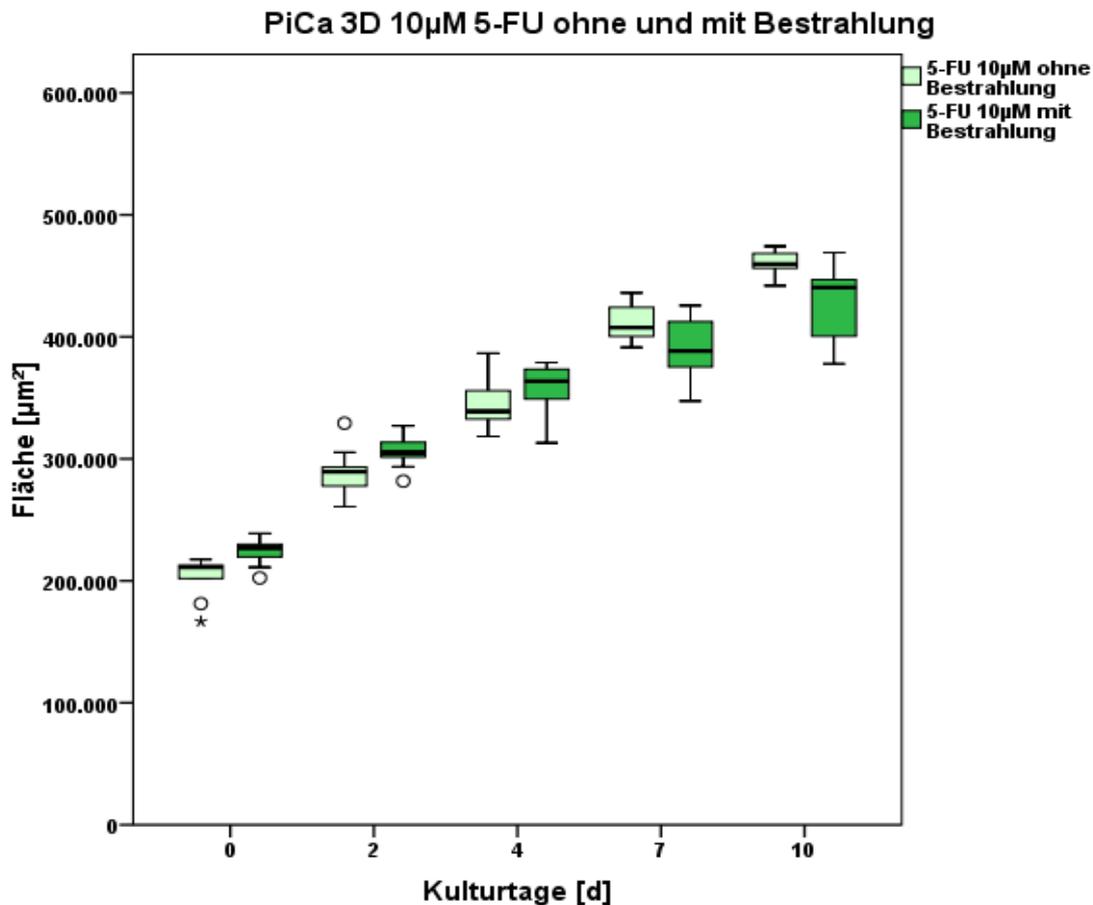


Abbildung 28: Zelllinie PiCa: mit 10 µM 5-FU behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 31: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten PiCa-Zellen, die gleichzeitig mit 10µM 5-FU (72h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. *p≤0,05

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
5-FU 10µM ohne Bestrahlung	202415	283672	336995	411743	455837
5-FU 10µM mit Bestrahlung	224030	306828	357693	391779	429667
p-Werte	0,019*	0,022*	0,125	0,107	0,024*

Die PiCa-Zellen, die mit 10µM 5-FU behandelt wurden, zeigten im Vergleich der nicht bestrahlten und bestrahlten Zellen bis zu Tag 4 eine tendenzielle Größenzunahme durch die Bestrahlung mit p≤0,022. Ab dem Tag 7 waren die Flächenwerte der bestrahlten PiCa im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen kleiner, was durch eine Signifikanz an Tag 10 von p ≤0,024 erkennbar wurde.

Wachstum PiCa 3D: 30 μ M 5-FU ohne und mit Bestrahlung

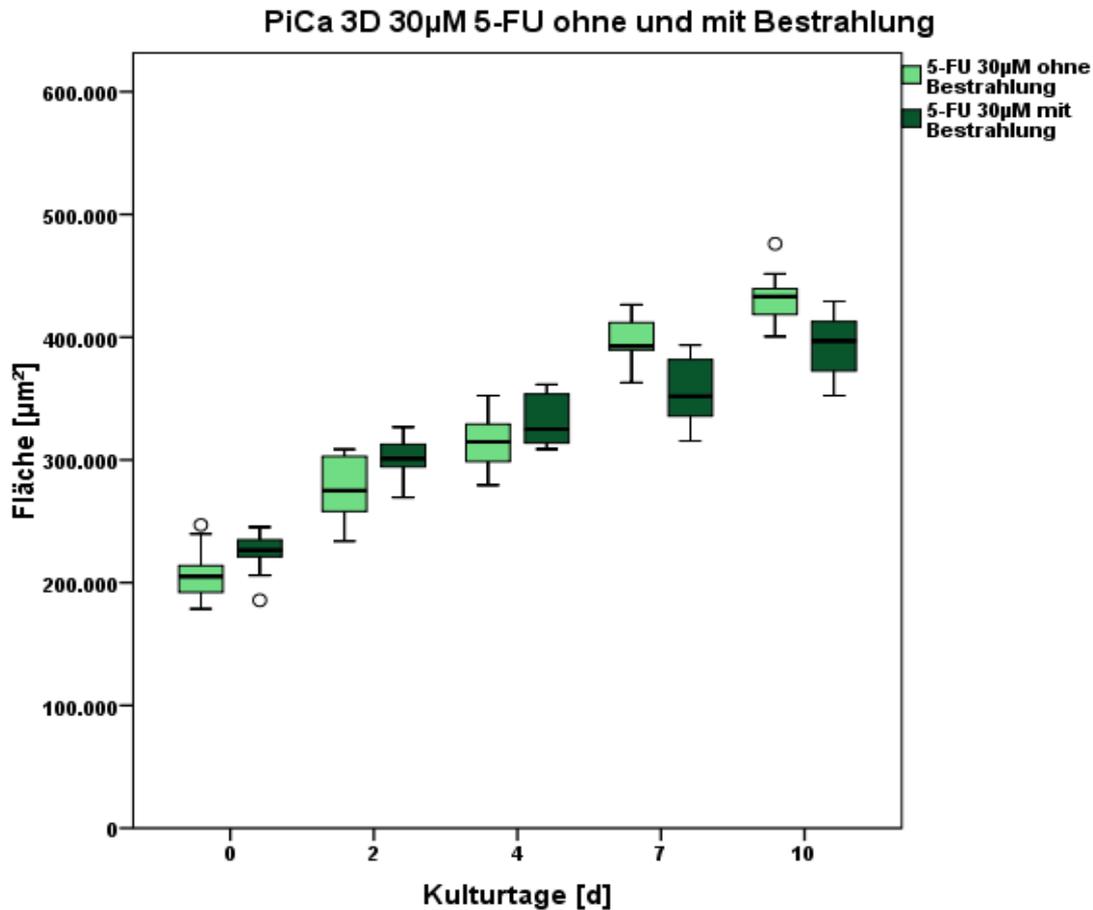


Abbildung 29: Zelllinie PiCa: mit 30 μ M 5-FU behandelte Zellen ohne und mit Bestrahlung

Tabelle 32: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in μm^2 und p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten PiCa-Zellen, die gleichzeitig mit 30 μ M 5-FU (72h) behandelt wurden, n=12 pro Gruppe. * $p \leq 0,05$

Flächenwerte in μm^2	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
5-FU 30 μ M ohne Bestrahlung	206921	275142	313489	397469	433227
5-FU 30 μ M mit Bestrahlung	224862	301650	332370	356359	392109
p-Werte	0,092	0,003*	0,013*	0,002*	0,006*

Die mit 30 μ M 5-FU behandelten PiCa-Zellen zeigten durch die Bestrahlung eine Flächenzunahme bis zu Tag 4, mit einem signifikanten Wert von $p \leq 0,013$. Ab dem Tag 7 nahmen die Flächenwerte der bestrahlten im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen signifikant ab mit $p \leq 0,006$.

**Wachstum PiCa 3D: 5-FU-Konzentrationen (10 / 30µM) im Vergleich
(ohne Bestrahlung)**

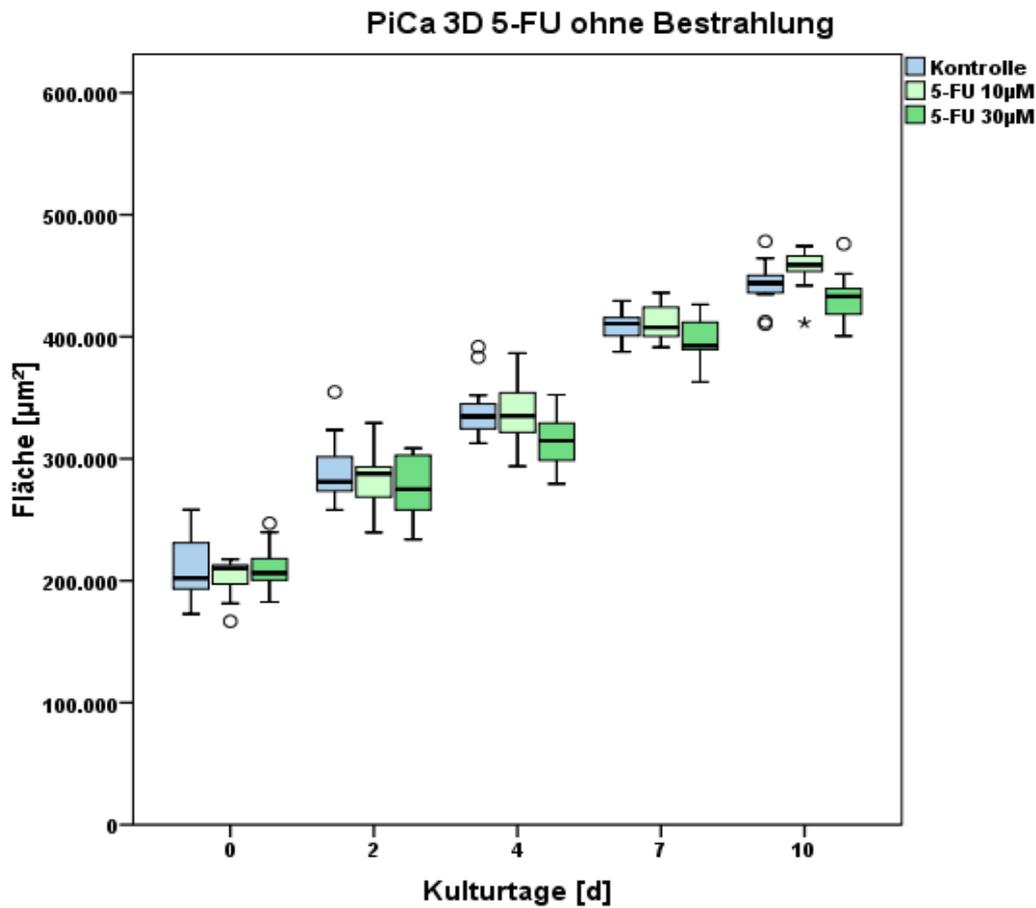


Abbildung 30: Zelllinie PiCa: 5-FU-Konzentrationen (10 / 30µM) im Vergleich (ohne Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet)

Tabelle 33: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 10µM bzw. 30µM 5-FU (72h) behandelten PiCa-Zellen (ohne Bestrahlung). Und Vergleich der Konzentrationen, n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
Kontrolle ohne Bestrahlung	208443	289682	340026	408406	442543
5-FU 10µM ohne Bestrahlung	202415	283672	336995	411743	455837
5-FU 30µM ohne Bestrahlung	206921	275142	313489	397469	433227
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur *p≤0,025					
Ko vs. 10µM 5-FU	0,453	0,540	0,769	0,617	0,051
Ko vs. 30µM 5-FU	0,905	0,208	0,015*	0,163	0,203
*p≤0,05					
10µM vs. 30µM 5-FU	0,212	0,185	0,005*	0,111	0,014*

Im Vergleich zwischen den 5-FU-Konzentrationen und der Kontrolle der unbestrahlten PiCa-Zellen, war nur in der 30µM 5-FU-Konzentration eine Signifikanz

von $p \leq 0,015$ vorhanden, ansonsten waren in beiden Konzentrationen (10 μ M und 30 μ M) keine signifikanten Unterschiede in der Fläche erkennbar. Beim Vergleich der beiden Konzentrationen untereinander, gab es nur an Tag 4 und Tag 10 Signifikanzen mit $p \leq 0,014$.

Wachstum PiCa 3D: 5-FU-Konzentrationen (10 / 30µM) im Vergleich (mit Bestrahlung)

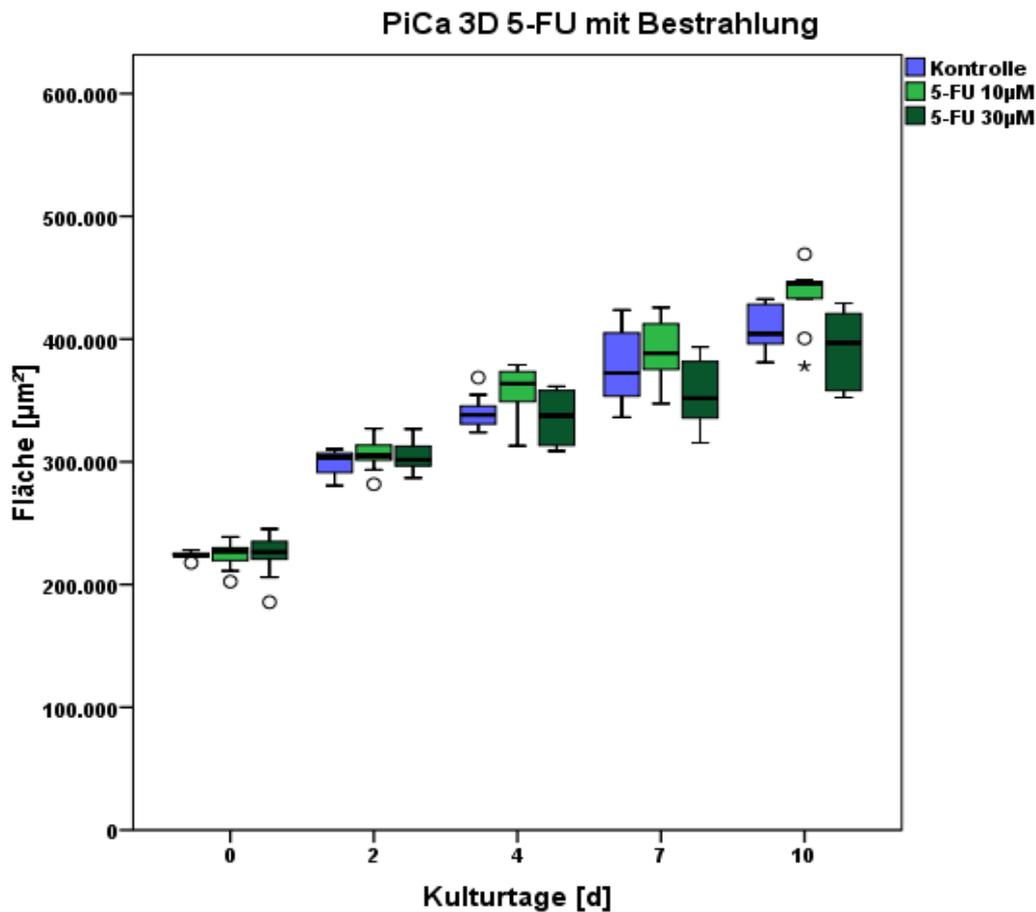


Abbildung 31: Zelllinie PiCa: 5-FU-Konzentrationen (10 / 30µM) im Vergleich (mit Bestrahlung) („extreme“ Ausreißer wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet) für den folgenden Versuch entsprachen die bestrahlten PiCa der Kontrollgruppe

Tabelle 34: Gemessene Flächenwerte der PiCa-Zellen in µm² und p-Werte für den Vergleich der Kontrollzellen mit den 10µM bzw. 30µM 5-FU (72h) behandelten PiCa-Zellen (mit Bestrahlung). Und Vergleich der Konzentrationen, n=12 pro Gruppe.

Flächenwerte in µm ²	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10
PiCa mit Bestrahlung	223761	298170	339993	376113	407944
5-FU 10 µM mit Bestrahlung	224030	306828	357693	391779	429667
5-FU 30 µM mit Bestrahlung	224862	301650	332370	356359	392109
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur *p≤0,025					
Ko vs. 10 µM 5-FU	0,939	0,040	0,013*	0,299	0,005*
Ko vs. 30 µM 5-FU	0,948	0,563	0,507	0,158	0,173
*p≤0,05					
10 µM vs.30 µM 5-FU	0,981	0,706	0,037*	0,021*	0,033*

In der 10µM 5-FU Konzentration gab es im Vergleich zur Kontrolle eine tendenzielle Flächenzunahme mit Signifikanzen an Tag 4 und 10 (p≤0,013). Während es in der

hohen Konzentration (30 μ M), im Vergleich zur Kontrolle, keine signifikanten Unterschiede gab. Beim Vergleich der beiden 5-FU-Konzentrationen untereinander gab es Signifikanzen ab Tag 4 ($p \leq 0,037$).

3.2. Vitalitäten der Zellen

Die Vitalitäten wurden mit dem WST-8-Test nach Beendigung der Beobachtung des Wachstums bestimmt (siehe 2.3.8. WST-8). Dies war bei den FaDu und Cal27 an Tag 14 und bei den PiCa-Zellen an Tag 10. Da die Größenzunahme bzw. der Umfang der Sphäroide nicht unmittelbar etwas über die Zellvitalität aussagt, wurde am Ende des Versuchs eine Vitalitätsbestimmung der Zellen nach Trypsinierung der Selbigen durchgeführt. Damit wurde die sogenannte Zellviabilität bestimmt. (n=5)



Abbildung 32: Beispielbild FaDu (mit Bestrahlung) + 5 μ M Cisplatin an Tag 14

Auf diesem Bild ist ein FaDu-Sphäroid zu erkennen, wobei die Vitalitäten unbekannt sind und somit anhand des Vitalitätstests festgestellt werden musste, wie viele Zellen noch vital waren. Zudem wird anhand dieses Sphäroids die Wirkung des Chemotherapeutikums deutlich, da es kein dichtes Sphäroid mehr ist, sondern die Auflösung bzw. Absonderung der einzelnen Zellen erkennbar ist (Vergrößerung 1:40).

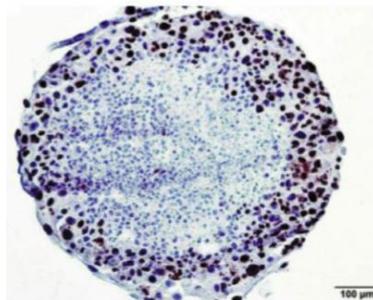


Abbildung 33: Ki67 Immunhistochemische-Färbung von einem PiCa-Sphäroid (PiCa Zellen auf ULA Platten) (Hagemann et al. 2017). Die peripheren Zellen des Sphäroids zeigt eine wesentlich höhere Proliferationsrate als die zentralen Zellen. Dies lässt sich durch die deutlich bessere nutritive Versorgung der äußeren Zellen erklären, die zum Zentrum hin deutlich abnimmt. Bei weiterem Wachstum ist die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff in den zentralen Anteilen so schlecht das die Zellen nekrotisch werden (Hagemann et al. 2017).

Anhand des WST-8 wurde ein Enzymtest durchgeführt und mittels photometrischer Bestimmung quantitativ ausgewertet.

Anschließend wurde die unbehandelte Kontrolle gleich 100% gesetzt und die restlichen Ansätze damit prozentual verglichen.

3.2.1. Vitalitäten der FaDu-Zellen

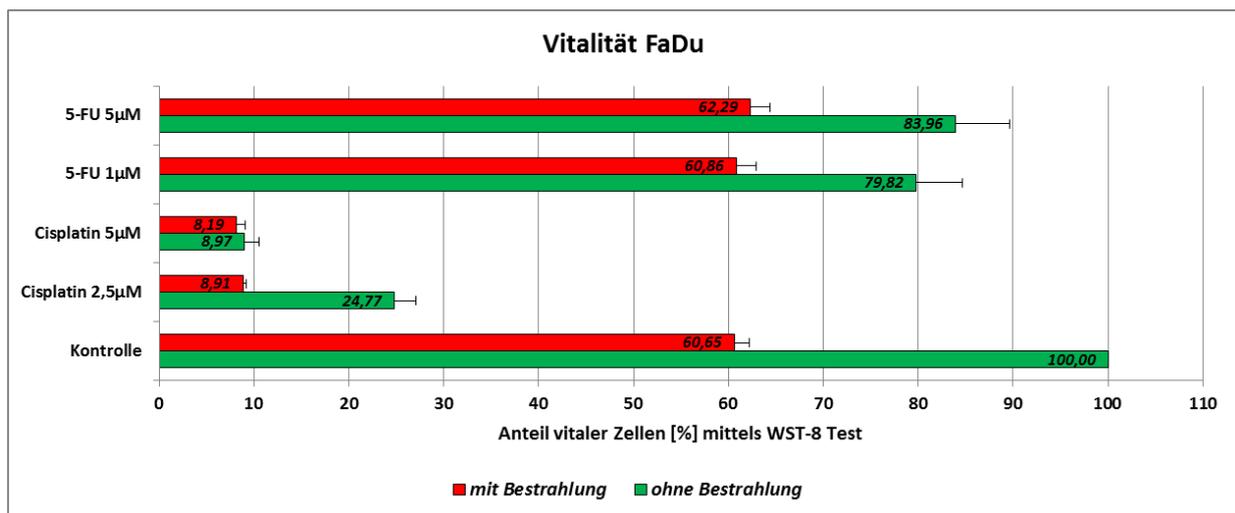


Abbildung 34: Vitalitäten des WST-8 der FaDu-Zellen

Tabelle 35: p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten vitalen FaDu-Zellen. Lokales Signifikanzniveau *p≤ 0,05

	Kontrolle mit Bestrahlung		
Kontrolle ohne Bestrahlung	≤ 0,001*		
	Cis 2,5 µM mit Bestrahlung		Cis 5 µM mit Bestrahlung
Cis 2,5 µM ohne Bestrahlung	≤ 0,001*	Cis 5 µM ohne Bestrahlung	0,146
	5-FU 1 µM mit Bestrahlung		5-FU 5 µM mit Bestrahlung
5-FU 1 µM ohne Bestrahlung	≤ 0,001*	5-FU 5 µM ohne Bestrahlung	0,001*

Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle hatten die bestrahlten FaDu einen signifikant niedrigeren Anteil an vitalen Zellen (100,00% vs 60,65%, p≤0,001). Bei den mit Cisplatin behandelten FaDu-Zellen war im Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen in der niedrigen Konzentration von 2,5µM Cisplatin ein signifikanter zytotoxischer Effekt erkennbar (24,77% vs. 8,91%, p≤0,001). In der höheren Cisplatin-Konzentration waren bei 5µM ohne Bestrahlung versus mit zusätzlicher Bestrahlung keine große Veränderung zu erkennen und somit keine Signifikanz vorhanden (8,97% vs. 8,19%, p≤0,146). Im Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen die mit 1µM 5-FU behandelt wurden war ein signifikanter Unterschied erkennbar (79,82% vs. 60,86%, p≤0,001). In der

höheren Konzentration von 5µM 5-FU gab es ebenso eine Signifikanz zwischen den unbestrahlten und bestrahlten FaDu-Zellen (83,96% vs 62,29%, $p \leq 0,001$).

Tabelle 36: p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten vitalen FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 2,5 µM / 5 µM Cisplatin behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau * $p \leq 0,05$

	Cis 2,5 µM ohne Bestrahlung	Cis 5 µM ohne Bestrahlung
Kontrolle ohne Bestrahlung	$\leq 0,001^*$	$\leq 0,001^*$

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,025$

	Cis 5 µM ohne Bestrahlung
Cis 2,5 µM ohne Bestrahlung	$\leq 0,001^*$

Vergleicht man die unbestrahlten FaDu-Zellen die mit 2,5µM bzw. mit 5µM Cisplatin behandelt wurden mit der unbestrahlten Kontrolle, sind in beiden Konzentrationen signifikante Unterschiede zu erkennen (100% vs. 24,77% vs. 8,97%, $p \leq 0,001$). Beim Vergleich der beiden Cisplatinkonzentrationen untereinander, war ein signifikant größerer toxischer Effekt in der hohen Konzentration von 5µM Cisplatin festzustellen (24,77% vs. 8,97%, $p \leq 0,001$).

Tabelle 37: p-Werte für den Vergleich der bestrahlten vitalen FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 2,5/5µM Cisplatin behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau * $p \leq 0,05$

	Cis 2,5µM mit Bestrahlung	Cis 5µM mit Bestrahlung
Kontrolle mit Bestrahlung	$\leq 0,001^*$	$\leq 0,001^*$

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: * $p \leq 0,025$

	Cis 5µM mit Bestrahlung
Cis 2,5µM mit Bestrahlung	0,112

Die bestrahlten FaDu-Zellen hatten im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Konzentrationen signifikante Werte (60,65% vs. 8,91% vs. 8,19%, $p \leq 0,001$). Beim Vergleich der Cisplatinkonzentrationen untereinander mit Bestrahlung, gab es in der niedrigeren 2,5µM Cisplatinkonzentration nur 0,72% mehr vitale FaDu-Zellen als in der höheren 5µM Cisplatinkonzentration und somit keinen signifikanten zusätzlichen Effekt durch die Dosiserhöhung (8,91% vs. 8,19%, $p \geq 0,112$).

Tabelle 38: p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten vitalen FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 1/5µM 5-FU behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: *p ≤ 0,025

	5-FU 1µM ohne Bestrahlung	5-FU 5µM ohne Bestrahlung
Kontrolle ohne Bestrahlung	≤ 0,001*	0,003*

Lokales Signifikanzniveau *p ≤ 0,05

	5-FU 5µM ohne Bestrahlung
5-FU 1µM ohne Bestrahlung	0,036*

Beim Vergleich der Kontrolle mit den beiden unbestrahlten 5-FU-Konzentrationen waren in beiden Fällen Signifikanzen nachweisbar (100% vs. 79,82% vs. 83,96%, p ≤ 0,003). In der 1µM 5-FU-Konzentration waren weniger vitale Zellen nachweisbar als in der 5µM 5-FU-Konzentration. Die beiden Konzentrationen untereinander waren auch signifikant (79,82% vs. 83,96%, p ≤ 0,036).

Tabelle 39: p-Werte für den Vergleich der bestrahlten vitalen FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 1/5µM 5-FU behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: *p ≤ 0,025

	5-FU 1µM mit Bestrahlung	5-FU 5µM mit Bestrahlung
Kontrolle mit Bestrahlung	0,792	0,218

Lokales Signifikanzniveau *p ≤ 0,05

	5-FU 5µM mit Bestrahlung
5-FU 1µM mit Bestrahlung	0,349

Zur bestrahlten Kontrolle waren die bestrahlten FaDu-Zellen die mit 5-FU behandelt wurden in beiden Konzentrationen nicht signifikant (60,65% vs. 60,86% vs. 62,29%, p ≥ 0,218). Beide Konzentrationen im Vergleich waren auch nicht signifikant zueinander (60,86% vs. 62,29%, p ≥ 0,349).

3.2.2. Vitalitäten der Cal27-Zellen

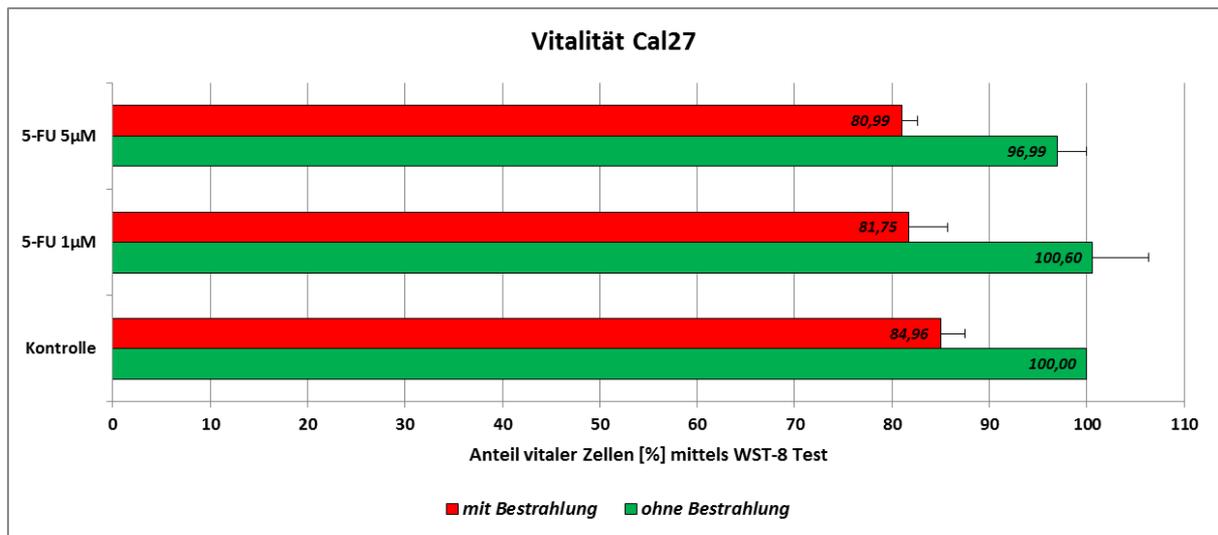


Abbildung 35: Vitalitäten des WST-8 der Cal27-Zellen

Tabelle 40: p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten vitalen Cal27-Zellen. Lokales Signifikanzniveau * $p \leq 0,05$

	Kontrolle mit Bestrahlung
Kontrolle ohne Bestrahlung	$\leq 0,001^*$

	5-FU 1µM mit Bestrahlung		5-FU 5µM mit Bestrahlung
5-FU 1µM ohne Bestrahlung	0,031*	5-FU 5µM ohne Bestrahlung	0,031*

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle waren die bestrahlten Cal27-Zellen signifikant (100% vs. 84,96%, $p \leq 0,001$). Die unbestrahlten Cal27-Zellen zeigten gegenüber den bestrahlten mit 1µM 5-FU behandelten Cal27 einen signifikanten Unterschied (100,60% vs. 81,75%, $p \leq 0,031$). Die höhere Konzentration von 5µM 5-FU wies ebenso eine Signifikanz zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Cal27-Zellen auf (96,99% vs. 80,99%, $p \leq 0,031$).

Tabelle 41: p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten vitalen Cal27-Zellen die gleichzeitig mit 1µM/5µM 5-FU behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: *p ≤ 0,025

	5-FU 1µM ohne Bestrahlung	5-FU 5µM ohne Bestrahlung
Kontrolle ohne Bestrahlung	0,313	0,089

Lokales Signifikanzniveau *p≤ 0,05

	5-FU 5µM ohne Bestrahlung
5-FU 1µM ohne Bestrahlung	0,313

Durch den Vergleich der beiden unbestrahlten 5-FU-Konzentrationen mit der unbestrahlten Kontrolle konnten in beiden Fällen keine Signifikanzen nachgewiesen werden (100% vs. 100,60% vs. 96,99%, p≥0,089). Die beiden Konzentrationen untereinander waren auch nicht signifikant (100,60% vs. 96,99%, p≥0,313).

Tabelle 42: p-Werte für den Vergleich der bestrahlten vitalen Cal27-Zellen die gleichzeitig mit 1/5µM 5-FU behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: *p ≤ 0,025

	5-FU 1µM mit Bestrahlung	5-FU 5µM mit Bestrahlung
Kontrolle mit Bestrahlung	0,150	0,063

Lokales Signifikanzniveau *p≤ 0,05

	5-FU 5µM mit Bestrahlung
5-FU 1µM mit Bestrahlung	1,000

Die Bestrahlung bewirkte bei den mit 5-FU behandelten Cal27, im Vergleich zur Kontrolle in beiden Konzentrationen keinen zytotoxischen Effekt und somit keine Signifikanzen (84,96% vs. 81,75% vs. 80,99%, p≥0,063). Beim Vergleich der beiden Konzentrationen untereinander lag auch kein signifikanter Effekt vor (81,75% vs. 80,99%, p≥1,000).

3.2.3. Vitalitäten der PiCa-Zellen

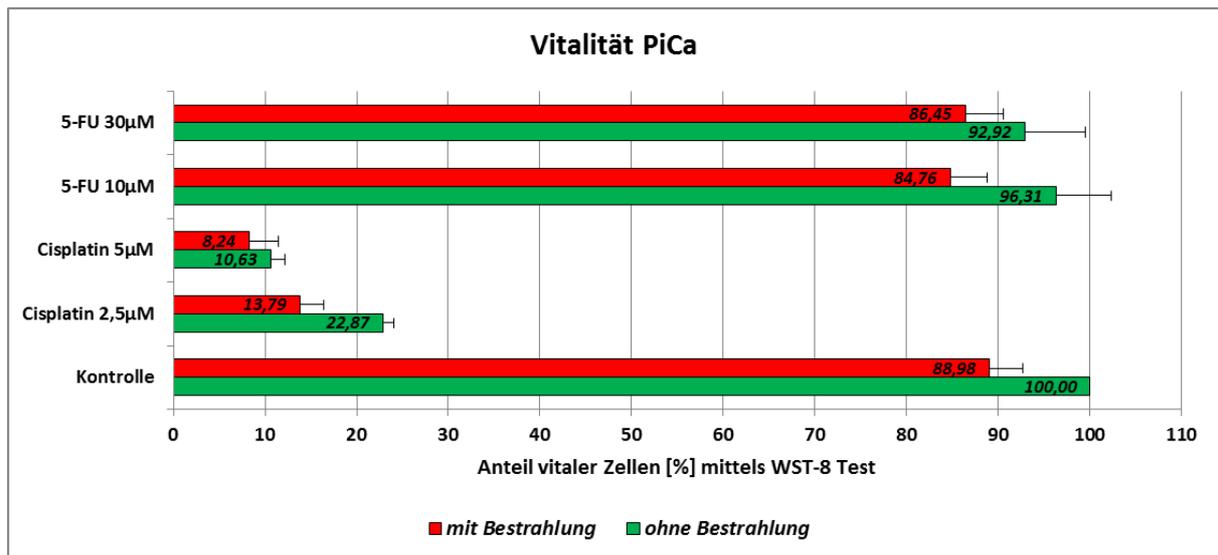


Abbildung 36: Vitalitäten des WST-8 der PiCa-Zellen

Tabelle 43: p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten vitalen PiCa-Zellen.
Lokales Signifikanzniveau * $p \leq 0,05$

	Kontrolle mit Bestrahlung		
Kontrolle ohne Bestrahlung	0,002*		
	Cis 2,5µM mit Bestrahlung		Cis 5µM mit Bestrahlung
Cis 2,5µM ohne Bestrahlung	$\leq 0,001^*$	Cis 5µM ohne Bestrahlung	0,058
	5-FU 10µM mit Bestrahlung		5-FU 30µM mit Bestrahlung
5-FU 10µM ohne Bestrahlung	$\leq 0,001^*$	5-FU 30µM ohne Bestrahlung	0,028*

Vergleicht man die unbehandelte Kontrolle mit den bestrahlten PiCa gab es einen signifikanten Effekt (100% vs. 88,98%, $p \leq 0,002$). Die PiCa-Zellen die mit 2,5µM Cisplatin behandelt wurden, zeigten im Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen einen signifikanten Unterschied (22,87% vs. 13,79%, $p \leq 0,001$). In der höheren Cisplatinkonzentration von 5µM waren ohne Bestrahlung versus mit zusätzlicher Bestrahlung kein signifikanter Effekt sichtbar (10,63% vs. 8,24%, $p \geq 0,058$). Im Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten PiCa-Zellen, die mit 10µM 5-FU behandelt wurden, war ein signifikanter Unterschied erkennbar (96,31% vs. 84,76%, $p \leq 0,001$). In der höheren Konzentration von 30µM 5-FU gab es ebenso

eine Signifikanz zwischen den unbestrahlten und bestrahlten PiCa-Zellen (92,92% vs. 86,45%, $p \leq 0,028$).

Tabelle 44: p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten vitalen PiCa-Zellen die gleichzeitig mit 2,5µM/5µM Cisplatin behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $*p \leq 0,025$

	Cis 2,5µM ohne Bestrahlung	Cis 5µM ohne Bestrahlung
Kontrolle ohne Bestrahlung	$\leq 0,001^*$	$\leq 0,001^*$

Lokales Signifikanzniveau $*p \leq 0,05$

	Cis 5µM ohne Bestrahlung
Cis 2,5µM ohne Bestrahlung	$\leq 0,001^*$

Die mit 2,5µM bzw. mit 5µM Cisplatin behandelten PiCa wurden mit der unbestrahlten Kontrolle verglichen und waren in beiden Konzentrationen signifikant weniger vital (100% vs. 22,87% vs. 10,63%, $p \leq 0,001$). Die Cisplatinkonzentrationen untereinander zeigten ebenso einen signifikanten Effekt (22,87% vs. 10,63%, $p \leq 0,001$).

Tabelle 45: p-Werte für den Vergleich der bestrahlten vitalen FaDu-Zellen die gleichzeitig mit 2,5/5µM Cisplatin behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $*p \leq 0,025$

	Cis 2,5µM mit Bestrahlung	Cis 5µM mit Bestrahlung
Kontrolle mit Bestrahlung	$\leq 0,001^*$	$\leq 0,001^*$

Lokales Signifikanzniveau $*p \leq 0,05$

	Cis 5µM mit Bestrahlung
Cis 2,5µM mit Bestrahlung	0,006*

Im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle hatten die bestrahlten PiCa-Zellen mit Cisplatin in beiden Cisplatin-Konzentrationen signifikante Werte (88,98% vs. 13,79% vs. 8,24%, $p \leq 0,001$). Die beiden Cisplatin-Konzentrationen untereinander mit Bestrahlung zeigten auch einen signifikanten Unterschied (13,79% vs. 8,24%, $p \leq 0,006$).

Tabelle 46: p-Werte für den Vergleich der unbestrahlten vitalen PiCa-Zellen die gleichzeitig mit 10µM/30µM 5-FU behandelt wurden.

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: *p ≤ 0,025

	5-FU 10µM ohne Bestrahlung	5-FU 30µM ohne Bestrahlung
Kontrolle ohne Bestrahlung	0,239	0,073
Lokales Signifikanzniveau *p≤ 0,05		
	5-FU 30µM ohne Bestrahlung	
5-FU 10µM ohne Bestrahlung	0,072	

Bei dem Chemotherapeutikum 5-FU ohne Bestrahlung lagen in beiden Konzentrationen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, keine Signifikanzen vor (100% vs. 96,31% vs. 92,92%, p≥0,073). Die beiden Konzentration untereinander waren auch nicht signifikant (96,31% vs. 92,92%, p≥0,072).

Tabelle 47: p-Werte für den Vergleich der bestrahlten vitalen PiCa-Zellen die gleichzeitig mit 10/30µM 5-FU behandelt wurden

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: *p ≤ 0,025

	5-FU 10µM mit Bestrahlung	5-FU 30µM mit Bestrahlung
Kontrolle mit Bestrahlung	0,049	0,269
Lokales Signifikanzniveau *p≤ 0,05		
	5-FU 30µM mit Bestrahlung	
5-FU 10µM mit Bestrahlung	0,037*	

Die bestrahlten PiCa-Zellen waren mit den gleichzeitig bestrahlten und 5-FU behandelten PiCa-Zellen nicht signifikant (88,98% vs. 84,76% vs. 86,45%, p≥0,049). Beide bestrahlten 5-FU-Konzentrationen im Vergleich waren signifikant zueinander (84,76% vs. 86,45%, p≤0,037).

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Methodik

Durch die hohe Inzidenz der Kopf- und Halstumoren ist die Forschung an neuen Therapiemethoden aber auch die Suche nach neuen Methoden zur Personalisierung der Therapie unerlässlich. Die Etablierung neuer Modelle, wie das in dieser Arbeit untersuchte 3D-Model, welches deutliche Vorteile gegenüber einfacheren 2D-Modellen bietet, können dazu entscheidend beitragen (Shin et al. 2013). Die speziell entwickelten „Hanging-drop“-Kulturplatten GravityPlus™ erleichtern den Prozess der Tumorsphäroidbildung für spätere Hochdurchsatzuntersuchungen.

Laut der deutschen Krebsgesellschaft haben sich zur Behandlung von Kopf- und Halstumoren neben der chirurgischen Entfernung des Tumors, die Radiochemotherapie mit Cisplatin und 5-FU bewährt (Wendt et al. 1998; Bettag 2006; Dietz und Keilholz 2016). Diese wurde an 3D-Tumorsphäroiden aus drei verschiedenen Kopf-Hals-Tumorzelllinien, welche mittels Hanging-Drop-Methode generiert wurden, als Kombinationstherapie mit Bestrahlung und einzeln zur Anwendung gebracht. Eine Schlüsselkomponente des Tumormodells waren HNSCC-Zelllinien, die gut anzuzüchten waren. Diese werden häufig benutzt um die molekularen Mechanismen der Tumorzellbiologie zu erforschen. Das molekulare Profil von den meisten humanen Zelllinien ist in der Enzyklopädie der Krebszelllinien verfügbar (Barretina et al. 2012). Viele vorhergehende Studien wurden mit Krebszelllinien durchgeführt, die schon vor Jahrzehnten entweder in-vitro oder in Tiermodellen entstanden sind. Dagegen zeigten Ertel et al. dass sich Zelllinien nur bedingt für einen Vergleich mit der in-vivo-Realität eignen, da sie oft einen erhöhten Stoffwechsel (einschließlich des Zellnukleotidstoffwechsels) und eine verstärkte oxidative Phosphorylierung besitzen. Außerdem waren die Signalisierungswege, die an der Adhäsion und Kommunikation von in-vitro-Krebszellen beteiligt sind, herunterreguliert (Ertel et al. 2006). Tumorzelllinien werden als in-vitro-Modelle verwendet, wobei ihre Fähigkeit den elterlichen Geno- und Phänotyp zu reflektieren als fragwürdig erachtet wurde. Daher wird angenommen, dass während der zahlreichen Passagen mehrere genetische Veränderungen in der Zelle stattfanden und das Verhalten z.B. auf Chemotherapie oder Bestrahlung der aktuellen Zelllinie im Vergleich zur ursprünglichen abweicht. In-vitro wachsende Zelllinien

unterscheiden sich genetisch von den ursprünglichen Krebszellen (Lorsch et al. 2014). Die Ergebnisse von Greshock et al. zeigten dass die Zelllinien in-vitro die genetischen Aberrationen der parentalen Zellen bewahren, aber diese zusätzliche Locus-Spezifische Veränderungen enthielten. Das heißt, dass mehrere wiederkehrende Zelllinien-spezifische Mutationen auftraten. Dazu gehören die dokumentierten Deletionen von 13q und 9p und Amplifikationen von 20q sowie weitere unbeschriebene Zelllinien-spezifische Amplifikationen von 5p, 7p und 17q sowie Deletionen von 18q und 4q (Greshock et al. 2007). Obwohl Zelllinien sich von Tumorgeweben unterscheiden, machen die geringe Verfügbarkeit von Gewebeproben und die begrenzte Möglichkeit von Tierversuchen, Zelllinien notwendig. Sie sind von großem Interesse für die molekularbiologische Forschung sowie die Arzneimittelentwicklung (Sandberg und Ernberg 2005).

Wir konnten erfolgreich ein standardisiertes 3D-Modell etablieren, um zunächst mehrzellige Sphäroide aus verschiedenen Hals- und Kopftumorzelllinien zu generieren und eine zuverlässige Messung der Sphäroidgrößen und deren Vitalität zu erstellen. Dies ist ein erster Schritt für einen klinischen Test, der Zellen aus einem heterogenen Tumor oder aus einer Metastase verwenden kann um ein individuelles Ansprechen auf Chemo- und/oder Bestrahlungstherapie präklinisch zu prognostizieren. Es müssen aber noch weitere Studien durchgeführt werden, bevor diese Methode als klinischer Test etabliert werden kann. In dieser Arbeit sollte eine Adaption von Kulturbedingungen und Analytik von Chemotherapeutika und Bestrahlung im 3D-Tumormodell anhand von 3 Zelllinien gezeigt werden und die unterschiedlichen Reaktionen der Zellen auf die Chemo- und Radiotherapie nachgewiesen werden. Da das 3D-Modell physiologisch und in Aufbau und Struktur den Bedingungen eines in-vivo-Tumors näher kommt wie das 2D-Modell, kann es für die Testung von herkömmlichen und neuen Therapienformen gut sinnvoll eingesetzt werden (Cukierman et al. 2002; Beningo et al. 2004). Um 3D-Tumorsphäroide zu generieren stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellkultivierungsmodell im hängenden Tropfen der Firma InSphero verwendet (siehe 2.3.5. Hanging-Drop-Methode).

Auswahl der Zelllinien

Die FaDu-Zellen sind eine etablierte Zelllinie, die aus einem Hypopharynx tumor isoliert wurden und gut anzüchtbar sind. Sie stellt eine der am häufigsten verwendeten Kopf-Hals-Tumorzelllinien dar, weshalb sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In dieser Arbeit wurde eine mittlere Doubling Time von 28h bei den FaDu-Zellen ermittelt. Bei der Entdeckung der Zelllinie stellten Rangan et al. eine Doubling Time von 50 Stunden fest. Diese Unterschiede in der Doubling Time können mit den häufigen Passagen der Zelllinien begründet werden. Durch das tausendfache Passagieren der Zelllinien verändern sich die Eigenschaften der Zellen und dies kann zu Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit der Studien führen. Somit können sich gleiche Zelllinien in verschiedenen Laboratorien in ganz unterschiedliche Richtungen entwickeln. Weiterhin entdeckten Rangan et al. dass die Zellen durch die vielen Tonofilamente im Zytoplasma eher als Zellklumpen wachsen und nicht als einzeln isolierte Zellen (Rangan 1972). Die FaDu-Zellen, die aus einer Tumorbiose aus dem Jahre 1968 stammen, haben aufgrund langfristiger in-vitro Bedingungen und daraus resultierender unphysiologischer Selektion eine veränderte Therapiesensibilität. Daher sind sie möglicherweise nicht für die Vorhersage des Behandlungsansprechens geeignet. Auch in Tierstudien zeigten van der Worp et al. bei der Austestung von Medikamenten in präklinischen Studien keine reproduzierbaren Ergebnisse (van der Worp et al. 2010). Dies könnte dadurch begründet sein, dass die meisten Studien mit Tiermodellen immuninkompetente Mäuse verwenden, wobei das Immunsystem ein wichtiger Faktor von Therapien ist, und es sollte daher nicht generell ausgeschlossen werden (Bobbs et al. 2015).

Die Cal27-Zellen sind aus einem Plattenepithelkarzinom der Zunge entnommen und eine häufig verwendete Zelllinie aus dem Bereich der oralen Plattenepithelkarzinome. Jiang et al. hat in seinen Studien das histopathologische Wachstumsmuster der Cal27 untersucht und festgestellt, dass diese nicht wie typische orale Plattenepithelkarzinome aussahen. Er kam zu dem Ergebnis, dass Cal27-Xenotransplantate in-vivo als adenosquamöse Karzinome wachsen (Jiang et al. 2009). In einem Vorversuch (Daten nicht gezeigt) wurde das Wachstum im Vorfeld ausgetestet, um die Zellzahl zu bestimmen, die ein bestmögliches Tumorsphäroidwachstum ermöglicht. Dabei zeigte sich, dass bei den Cal27 das beste Tumorsphäroidwachstum, bei der doppelten Zellzahl, im Vergleich zu den

anderen beiden Zelllinien, erzielt wurde (siehe 2.3.5. Hanging-Drop-Methode). Durch den Vergleich von 2D und 3D-Experimenten war bereits bekannt, dass die Cal-27-Zellen ein anderes Wachstumsverhalten zeigten im Vergleich zu anderen HNSCC-Zelllinien. Außerdem haben sie eine insuffizientere Stabilität und auch eine erhöhte Mutationsempfindlichkeit, wodurch es häufig zu Genalterationen der Cal-27 kommt und Resistenzen gegenüber Cisplatin entstehen (Kadletz et al. 2015; Gosepath et al. 2008; Li et al. 2015; Kumar et al. 2012). Dies bestätigte sich auch in einem unserer Vorversuche, weshalb in dieser Arbeit für die Cal27 Cisplatin nicht verwendet wurde.

Als dritte Zelllinie wurde eine eigene intermediäre Zelllinie (PiCa) verwendet, die vom HNO-Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Klinikums der Universität München aus einem Biopsat eines Larynxkarzinoms generiert wurde (Mack et al. 2013). Durch die niedrigere Anzahl an Passagen (1-20) waren diese Tumorzellen dem Ursprungstumor ähnlicher, als die seit Jahren oft passagierten Zelllinien FaDu und Cal27. Laut Borrell unterliegen häufig passagierte Zelllinien einer höheren Mutationsrate. Somit haben kultivierte Krebszellen unterschiedliche genetische Eigenschaften im Vergleich zum primären Tumorgewebe (Borrell 2010). Die PiCa-Zellen stellen daher eine optimale Ergänzung zu den beiden bereits beschrieben etablierten Zelllinien dar und repräsentieren wahrscheinlich deutlich besser die Eigenschaften des primären Tumorgewebes. Allerdings waren diese Zellen auch am empfindlichsten gegenüber Milieuveränderungen und in ihrer Morphologie am vielfältigsten.

Hanging-Drop-Methode (HDM)

Die in-vitro Tests von Chemotherapeutika an humanen Zelllinien wird für die Pharmaindustrie und die Klinik immer bedeutsamer. Dabei findet meist die zweidimensionale Zellzüchtung in Kulturplatten Anwendung. Allerdings wird die neue Dreidimensionale-Hanging-Drop-Methode(HDM) immer beliebter, da die Struktur und Komplexität dem echten Tumor näher kommt und die in-vivo Bedingungen besser wiedergespiegelt werden (Alföldi et al. 2015; Bhadriraju und Chen 2002). In 2D-Modellen gezüchteten Tumorzellen fehlen wichtige Gewebestrukturen, um eine in-vivo Umgebung nachzuempfinden. Des Weiteren haben sie andere Abwehrmechanismen (Minna Allinen et al. 2004; Place et al. 2011). Durch die sphäroide Form des Zellverbundes entstehen in der Hanging-Drop-Methode enge

Zell-Zell-Kontakte, ein Genexpressionsprofil (das der in-vivo Situation sehr ähnlich ist) und eine intakte endogene extrazelluläre Matrix mit physiologischen Nährstoff- und Sauerstoffgradienten (Toyli et al. 2010; Ravi et al. 2017; Ho et al. 2010). Die Sphäroide zeigen einen dem Tumor sehr ähnlichen dreischichtigen Aufbau mit zentraler Nekrose-Zone, Intermediärer- und äußerer Proliferationszone. Dem gegenüber steht das 2D-Modell, das dem in-vivo Tumor morphologisch nicht gleicht und damit auch ein anderes Mikromileu darstellt (Xu et al. 2013; Mueller-Klieser 1987; Sutherland 1988; Dini et al. 2016). Tung et al. stellten fest, dass die Geometrie der hängenden Tropfen während der Kulturphase konstant gehalten wird, was zu stabilen Wachstumsbedingungen führt. Dies wäre bei einer Monolayerkultur nicht möglich (Tung et al. 2011). Die Anzucht von Zellen die phänotypisch der in-vivo Situation eines soliden Tumors gleichen, stellt die Wissenschaft vor immense Probleme. Viele wichtige Entdeckungen zur Zellproliferation, Differenzierung und Funktion stammen aus 2D-Modellen. Jedoch ist das 2D-Tumormikromileu von 3D-Gewebe im Körper weit entfernt. In Gewebe schließen Zellen miteinander eine extrazelluläre Matrix (ECM). Durch Rezeptor-Komplexe auf der Oberfläche von Zellen können sie mit den Nachbarzellen über die ECM und andere exogene Faktoren kommunizieren und somit auf biochemische und physikalische Signale aus der Umgebung reagieren. Aufgrund dieses komplizierten mechanischen und biochemischen Zusammenspiels, können wichtige biologische Eigenschaften verpasst werden, wenn die Zellen in einem 2D-Kultursystem untersucht werden (Bokhari et al. 2007). Trotzdem haben die 2D-Modelle auch Vorteile wie zum Beispiel die weite Verfügbarkeit, einfache Anwendung und die niedrigen Kosten. Sun et al. haben sich mit der Frage beschäftigt, ob Zellen in 3D-Kultur effektiver mit Zytostatika zu Recht kommen können als Zellen in 2D-Kultur. Es wurde die Empfindlichkeit von menschlichen Hautzellen gegenüber oxidativem Stress und einem potentiell toxischen Schwermetall untersucht. Dafür wurden sie unter 2D- und 3D-Bedingungen kultiviert. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Resistenz von Zellen die in 2D gezüchtet wurden, gegenüber einer bestimmten Dosis von oxidativen Stress und toxischem Schwermetall (Sun et al. 2006). Die Messung der 3D-Kulturen beruht auf der kugelförmigen Eigenschaft der Sphäroide, von der aufgrund der Fläche Rückschlüsse auf die Zellzahl getroffen werden können (siehe 2.3.7 Auswertung). Die Reproduzierbarkeit einheitlicher Sphäroide ist eine elementare Voraussetzung für das Hochdurchsatzscreening, da die Größe und Heterogenität die Gültigkeit vom

WST-8 beeinflussen können (Nath und Devi 2016). Über die zu Beginn der Austestung leichten Differenzen der Sphäroidgrößen und der Zelllinienspezifischen Idealen Sphäroidgrößen ist wenig bekannt und Bedarf daher weiterer Studien, ob dies einen Unterschied bei der individuellen Therapieaustestung macht. In unseren Studien hat sich gezeigt, dass die Inkubation der Zellen nur begonnen werden sollte, wenn morphologisch schöne Sphäroide vorhanden sind. Dabei durfte das Sphäroid jedoch bei Beginn der Austestung nicht zu groß sein, da sonst die Wirkung der Behandlung schlechter beurteilt und somit die Umfangmessung nicht mehr korrekt vorgenommen werden konnte. In dieser Arbeit wurden daher 1000-2000 Zellen verwendet, um schöne Sphäroide zu generieren und um diese am Ende der Versuchsreihe noch gut ausmessen zu können. Die typischen Sphäroide bestehen aus einer inneren Schicht mit ruhenden Zellen und einer äußeren Schicht mit sich ausbreitenden Zellen. Diese unterschiedlichen Schichten sind für die Zellheterogenität verantwortlich, die von der Ernährung der Sphäroide, dem Sauerstoffgehalt und dem Proliferationsgradienten der Zellen abhängt (Weiswald et al. 2015; Kunz-Schughart et al. 2004; Santini und Rainaldi 1999). Die 15-tägige Kultivierungszeit wurde aus unserer Erfahrung als Maximum betrachtet, da es danach tendenziell eher zu Infektionen der Zellen kam und kaum noch Wachstum stattfand.

WST-8

Der WST-8 stellt eine etablierte Methode zur Quantifizierung lebender Zellen dar (Kanemura et al. 2002). Da in dieser Dissertation über die Flächenwerte der Sphäroide auf das Wachstum geschlossen wurde, musste am Ende festgestellt werden, ob diese Zellen noch vital sind oder ob sich diese nur vom dichten Zellkern lösten und dadurch eine scheinbare Vergrößerung der Zelle stattfand. Deshalb wurde der WST-8 gewählt. Das wasserlösliche 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium(CCVK-I Lösung) wurde bei vitalen stoffwechselaktiven Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu orangem Formazan reduziert (siehe 2.3.8. WST-8). Über die Farbtiefe konnte anhand des Photometers bei 450 nm Wellenlänge indirekt der Anteil noch lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle bestimmt werden. Die Farbtiefe korrelierte mit der Anzahl der noch stoffwechselaktiven Zellen (Ishiyama et al. 1997; Promokine 2014).

Als alternative Zytotoxizitätstests wäre auch der MTT oder XTT möglich gewesen (Tamar et al. 2003; Florento et al. 2012; Carmichael et al. 1987). Eine Weiterentwicklung des bekannten XTT-Tests von Scudiero et al sind die WST-1 und WST-8 Zytotoxizitätstests, wobei der WST-8 eine höhere Sensitivität hat und schneller ausgewertet werden kann (Scudiero et al. 1988). Auch gegenüber dem MTT hat der WST-8 den Vorteil deutlich sensitiver zu sein (Tominaga et al. 1999). Außerdem ist das Formazan bei dem WST-8 wasserlöslich und stabil, es kann quantitativ die Extinktion gemessen werden, sowie qualitativ anhand der Farbe mit bloßem Auge die Zytotoxizität ermittelt werden. Der WST-8 hat auch den Vorteil, dass die Zellen aufgrund der wasserlöslichkeit des Formazans nach dem Test nicht zerstört wurden und somit weiterverwendet werden konnten. Deshalb konnte der Test nach 24h nochmal an denselben Zellen wiederholt werden. Ein wesentlicher Nachteil im Vergleich zum MTT ist der Kostenfaktor, der bei dem WST-8 um ein vielfaches höher ist (Tantular und Kawamoto 2003; Hirono et al. 1997).

Therapie

In Deutschland sind nach Herz-Kreislaufkrankungen laut statistischem Bundesamt (Stand 2014) Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Somit wird es immer wichtiger geeignete Therapiemaßnahmen dagegen zu entwickeln (Statistisches Bundesamt 2015). Die etablierten Methoden, Chirurgie ggf. mit adjuvanter Behandlung oder die kombinierte primäre Radiochemotherapie weist bei Hals- und Kopftumoren bei rechtzeitig diagnostiziertem Karzinom eine gute Wirksamkeit auf, wobei die Nebenwirkungen ganz beträchtlich sein können. Da vor allem die Chemotherapie auf den gesamten Organismus einwirkt und nicht lokal verabreicht wird, findet eine Zellschädigung am ganzen Körper statt. Gewebe mit großem Zellwachstum wie z.B. die Blutzellen sind dabei besonders betroffen, was lebensbedrohliche Folgen für das Knochenmark nach sich ziehen kann (Aapro et al. 2011; Schwenger und Ehrenfeld 2010). Daher sollte die Dosierung so niedrig wie möglich und so hoch wie nötig eingestellt werden. Da jeder Körper und Stoffwechsel unterschiedlich reagiert, wäre eine personalisierte Therapie die bestmögliche Variante für jedes Individuum.

Bestrahlung:

Nach der Chirurgie ist die Bestrahlung die wichtigste Therapie in der Behandlung von HNSCC-Tumoren. Dabei wird zwischen primärer Bestrahlung, meist in Verbindung mit Chemotherapie und einer postoperativen adjuvanten Bestrahlung unterschieden. Durch die adjuvante Radiotherapie stellten Fletcher et al. weniger lokoregionäre Rezidive fest und auch Jesse und Lindberg bestätigten den positiven Effekt einer postoperativen Bestrahlung (Jesse und Lindberg 1975; Fletcher und Evers 1970). Die Bestrahlungsdosis beträgt im Regelfall 60-66Gy, bei fortgeschrittenen Tumoren kann die Dosis auf 66-68Gy erhöht werden, was jedoch zu vermehrten Osteonekrosen führen kann (Zeleftsky et al. 1992; Pfreundner et al. 2000).

Das Ziel dieser Dissertation ist die systematische Untersuchung der Radio- und / oder Chemosensitivität dreidimensionaler Tumorsphäroide von drei verschiedenen Kopf-Halstumorzelllinien mit Hilfe der Hanging-Drop-Methode. Dabei sollte das individuelle Ansprechen der Tumorsphäroide auf die Bestrahlung getestet werden. Essentiell dafür ist es die Strahlentherapie und deren Wirkung zu verstehen. Durch die Bestrahlung entstehen DNA-Schäden, welche vermittelt durch den p53-Tumorsuppressor, in der G1-Phase des Zellzyklus behoben werden können. Es kommt zu einer Reparatur der DNA noch vor der Replikation des genetischen Materials. Sind die Schäden zu ausgeprägt um repariert zu werden, wird der programmierte Zelltod, die Apoptose eingeleitet (Lane 1992). Durch diese Auswirkung der Strahlentherapie wird durch Absterben der Tumorzellen die Tumormasse reduziert oder ein langsames Wachstum induziert. In verschiedenen Studien wurde dies durch irreparable DNA-Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche erklärt, die kumulativ mit der Strahlendosis einhergehen (Dikomey und Dahm-Daphi 1994; Sverker und Leif 1981). Entscheidend für die Strahlensensibilität der Zellen ist aber auch der Gehalt an Sauerstoff, den die jeweilige Zelle hat. Die Oxygenierung der Zelle hat Einfluß auf die Empfindlichkeit gegenüber der Bestrahlung, weil durch den Sauerstoff unter Bestrahlung mehr freie Radikale entstehen die die DNA schädigen können (Höckel und Vaupel 2001).

Chemotherapeutika:

Die häufigsten kombinierte Chemotherapeutika, die zur Behandlung von Kopf- und Halsplattenepithelkarzinomen eingesetzt werden, sind Cisplatin und 5-FU (Yoon und Kim 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von Cisplatin und 5-

FU einzeln und jeweils in Kombination mit Bestrahlung auf die 3D-Tumorsphäroide untersucht werden.

Cisplatin: Cisplatin ist ein DNA-Alkylanz und kann als neutrales Molekül durch passive Diffusion die Zellmembran passieren. Dieses Chemotherapeutikum ist in seiner Wirkung nicht streng Zellzyklusabhängig. Cisplatin hat eine über 90% Plasmaproteinbindung und diffundiert deshalb sehr schnell ins Gewebe. Daher ist die Anreicherung in Leber, Nieren und Gonaden sehr hoch und die Elimination erfolgt ausschließlich renal (Seeber 1998; Guada et al. 2017; Dasari und Tchounwou 2014; Bellon et al. 1991).

5-Fluoruracil (5-FU): 5-FU ist ein chemotherapeutisches Medikament zur Behandlung von verschiedenen Krebsarten. Als Antimetabolit hemmt es die Zellproliferation indem es primär das Enzym Thymidylatsynthase inaktiviert und dadurch die DNA-Synthese blockiert. Es hat eine relativ kurze Halbwertszeit von unter 30 min, tritt aber schnell durch passive Diffusion ins Gehirn, wo es starke kognitive Beeinträchtigungen bewirken kann. Die Symptome wie Verwirrtheit und Gedächtnisstörungen können Monate bis Jahre danach noch anhalten. Klinisch wird es entweder als Einzelsubstanz oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verwendet (Wigmore et al. 2010). Durch verschiedene Studien wurden signifikante Assoziationen zwischen schweren Toxizitäten durch Fluorpyrimidinen und Keimbahnpolymorphysmen des Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Gens(DPD) gezeigt. Die DPD ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Inaktivierung von 5-FU und dessen Prodrugs. In den DPD's wurden mehr als 30 Single Nucleotide Polymorphism(SNPs) und Deletionen identifiziert, wobei dies nur in wenigen Fällen funktionelle Konsequenzen für die enzymatische Aktivität nach sich zieht. Trotzdem kann eine DPD-Genotypisierung dazu beitragen die Gefahr durch lebensbedrohliche Toxizitäten nach Standarddosen von 5-FU zu verringern (Del Re et al. 2010).

Radiochemotherapie:

Die Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie bringt häufig einen zusätzlichen Effekt im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung, da durch das Chemotherapeutikum eine erhöhte Empfindlichkeit der Bestrahlung erreicht wird. In der klinischen Praxis wird Cisplatin der ionisierenden Strahlung aufgrund seiner beobachteten radiosensibilisierenden Wirkung zugesetzt. Dies spiegelt sich in höheren Überlebens- und Ansprechraten von Kopf-und Halstumor-Patienten wieder,

die mit kombinierter Radiochemotherapie im Vergleich zur Bestrahlung allein behandelt wurden (Pignon et al. 2009; Blanchard et al. 2011). Die Kombination von Bestrahlung und dem Chemotherapeutikum 5-FU ergab sehr gute Effekte und keine überlappenden Toxizitäten. Somit ist 5-FU zu einem häufig angewandten Radiosensibilisator geworden (Wasif Saif und Diasio 2003). Als dosislimitierend sind vor allem akute Schleimhautreaktionen und die hämatologische Toxizität anzuführen aber auch neurologische/kognitive Beeinträchtigungen, was die Gesamttoleranz der kombinierten Behandlung beeinflusst (Suwinski et al. 2016; Schwenzer und Ehrenfeld 2010; Wigmore et al. 2010).

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei seit vielen Jahren etablierte, gut charakterisierte Zelllinien FaDu und Cal27 sowie eine neue intermediäre Zelllinie PiCa aus dem eigenen Forschungslabor verwendet. Alle Zelllinien zeigten anfangs ein gutes Wachstum im hängenden Tropfen. Die drei Zelllinien wurden jeweils auf zwei „Hanging-Drop“-Kulturplatten angezüchtet, wovon jeweils nur eine mit 3 x 2Gy bestrahlt wurde. Alle Mikrotumoren zeigten ein gutes Wachstum. Zusätzlich wurden einige der Sphäroide mit verschiedenen Konzentrationen Cisplatin oder 5-FU behandelt (siehe 3.3.6. Therapie)

4.2.1. Radiosensitivität/Chemosensitivität der Zelllinien

Radiosensitivität: Zur Einschätzung der Radiosensitivität wurden die Zellen unbestrahlt und bestrahlt gegenübergestellt und dabei in allen drei Zelllinien eine signifikante Wachstumshemmung durch die Bestrahlung festgestellt.

FaDu: Kossatz et al. zeigten in clonogenen Assays, dass HNSCC-Zelllinien (FaDu und Cal27) an klonogenem Potential mit zunehmenden Bestrahlungsdosen stark beeinträchtigt wurden, was durch eine verringerte Koloniezahl nachgewiesen wurde. Sie zeigten auf, dass bei 2, 4 und 6 Gy die Cal27-Zellen empfindlicher als die FaDu reagierten. Der stärkste Unterschied wurde bei 4 Gy beobachtet, wobei $37 \pm 5\%$ der FaDu-Zellen, aber nur $10 \pm 2\%$ der Cal27-Zellen ihre Clonogenität beibehielten. Bei 10 Gy, war die überlebende Fraktion der FaDu- und Cal27-Zellen nahezu gleich (Kossatz et al. 2016). In unserer Arbeit fand durch die Bestrahlung mit 3 x 2Gy ab Tag 7 eine signifikante Wachstumshemmung der FaDu-Sphäroide im Vergleich zur

Kontrollgruppe statt. Somit war erst durch die dritte Bestrahlungseinheit (an Tag 4) eine nachweisende signifikante Wachstumshemmung zu erkennen. Der Anteil der vitalen Zellen nahm im WST-8 stark ab und zeigte insgesamt somit ein gutes Ansprechen auf die Bestrahlung.

Cal27: Die Cal27 zeigten an allen Tagen eine signifikante Wachstumshemmung durch die Bestrahlung. Dabei war festzustellen, dass die Cal27 am empfindlichsten gegenüber Bestrahlung reagierten, da schon nach der 1. Bestrahlung das Zellwachstum signifikant gehemmt wurde, wohingegen die beiden anderen Zelllinien FaDu und PiCa erst nach der 3. Bestrahlung ein vermindertes Wachstum gegenüber den unbestrahlten Zellen zeigten. Dies bestätigt wiederum die Studie von Kossatz et al., der ebenfalls Cal27 und FaDu-Zellen bestrahlte und bei 2–6 Gy eine höhere Sensibilität der Cal27 gegenüber Bestrahlung feststellte (Kossatz et al. 2016). Im WST-8-Test zeigte sich durch die Bestrahlung ein signifikant niedrigerer Anteil an vitalen Zellen. Somit war ein gutes Ansprechen auf Bestrahlung der Cal27-Zellen festzustellen.

PiCa: Die Literatur besagt, dass umso länger die Generationszeit der Zellen ist, desto länger verzögert sich der Zellzyklus nach Bestrahlung. Dabei können die Zellen in der Mitte der G2-Phase arretieren und dosisabhängig dort verweilen bis zum nachlassen des toxischen Einflusses. Danach kann die Zelle weiter in die Mitosephase übergehen und die Zellteilung fortsetzen. Das heißt, es gibt die Möglichkeit dass die Zellen, bei zu niedriger Dosisleistung, auch nach längerandauernder Bestrahlungstherapie sich wieder vollständig erholen (Hug 2013). Somit ist Doubling time von Bedeutung bei der Dosis-Wirkungskurve. Denn bei langer Doubling time, wie bei den PiCa-Zellen (PiCa:24-53h/MW: 42h), verbleiben die Zellen nach Bestrahlung länger in der G2-Phase und können nach der Strahlungsexposition weiter in die Mitose übergehen und repopulieren. PiCa wurden durch die Bestrahlung ab dem 7.Tag, also nach der 3. Bestrahlung, signifikant gehemmt. Dabei bewirkte die Bestrahlung im WST-8, bei den PiCa-Zellen eine signifikante Abnahme der lebenden Zellen. Trotzdem sprach die PiCa-Zelllinie insgesamt am schlechtesten auf die Bestrahlung an. Da diese Zelllinie noch nicht häufig passagiert wurde, ist sie dem Ursprungstumor ähnlicher. Schon 1988 hatten Gussack et al. an einer Studie gearbeitet und festgestellt, dass wenig passagierte Zelllinien charakteristische Merkmale der primären Tumorzellen behalten wie z.B. Mikrodesmosomen, zahlreiche Tonofilamente, reichlich rauhes Endoplasmatisches

Retikulum, osmophile keratohyaline Granulate und andere Merkmale (Gussack et al. 1988). Die PiCa-Zellen unterstützen somit unsere Theorie, dass sie das Tumorverhalten besser reflektieren als andere gealterte Zelllinien die schon zahlreiche Passagen durchlaufen haben.

Chemosensitivität: Cisplatin hatte generell eine sehr gute zytotoxische Wirkung besonders auf die FaDu-Zellen. Das Chemotherapeutikum 5-FU hingegen hatte einen schlechteren zytotoxischen Effekt als das Cisplatin.

FaDu: Durch Cisplatin war ein deutlicher Effekt erkennbar. Die FaDu-Sphäroidgrößen waren in der niedrigen (2,5µM) Konzentration im Vergleich zur Kontrolle an allen Tagen signifikant kleiner. Durch die 5µM Cisplatin Konzentration war eine noch stärkere Wachstumshemmung der Sphäroide vorhanden. Dies bekräftigte die stark toxische Wirkung des Cisplatins. Je höher die Dosierung gewählt wurde, desto mehr Tumorzellen wurden im Wachstum gehemmt und umso weniger stark beeinflusste die zusätzliche Radiotherapie das Wachstum. Laut Reiss et al. weisen FaDu-Zellen häufig eine Mutation des p53 Tumorsuppressorgens auf und auch andere Studien stellten eine erhöhte Mutationsrate dieses Proteins fest (Reiss et al. 1992; Kim et al. 1993). Diese Mutation führt zu einem schlechteren Ansprechen der Zellen gegenüber einer Bestrahlung, aber auch einer Chemotherapie (Zhou et al. 2016). Und wird daher bei unseren FaDu-Zellen nicht vermutet. Ein weiteres Resultat bei den FaDu war, dass durch die Behandlung mit 5-FU scheinbar größere Sphäroide eruiert wurden. Im WST-8 waren aber Signifikanzen zwischen den Konzentrationen und der Kontrolle und aber auch im Vergleich der beiden Konzentrationen nachweisbar. Somit ist dies ein Indiz für die zytotoxische Wirkung von 5-FU als Monotherapie, wobei die erhöhte Konzentration einen schlechteren Effekt zeigte als die Niedrigere. Die größeren Sphäroide machen daher nachweislich die Wirkung des Chemotherapeutikums deutlich, da es keine dichten Sphäroide mehr sind sondern die Auflösung bzw. Absonderung der einzelnen Zellen erkennbar wurden. Die peripheren Zellen des Sphäroids zeigt eine wesentlich höhere Proliferationsrate als die zentralen Zellen. Dies lässt sich durch die deutlich bessere nutritive Versorgung der äußeren Zellen erklären, die zum Zentrum hin deutlich abnimmt. Bei weiterem Wachstum ist die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff in den zentralen Anteilen so schlecht, dass die Zellen nekrotisch werden. Das bestätigt den Vorteil der kombinierten planimetrischen Analyse mit den

anschließenden kolorimetrischen-WST-8 Messungen, um nicht nur die Fläche sondern auch die Vitalitäten zu ermitteln.

Cal27: Aus diversen klinischen Untersuchungen geht hervor, dass orale Karzinome aggressiver sind und schlechter auf diverse Behandlungsmaßnahmen ansprechen als das Hypopharynx-Karzinom (Leemans et al. 2011). Dies bestätigte sich auch in dieser Arbeit, dass die Cal27 schlechter auf die Behandlungsmaßnahmen ansprachen. Die Cal27-Zellen zeigten nur an Tag 4 eine signifikante Wachstumshemmung durch 5-FU in beiden Konzentrationen. Danach waren keine toxischen Effekte mehr vorhanden. Im Vergleich der beiden Konzentrationen gibt es keinen signifikanten Nachweis über die Wirkung des 5-FU. Das Ergebnis wurde durch die Vitalitäten im WST-8 bestätigt und zeigte, dass 5-FU keine große Wirkung bei den Cal-27 erzielte. Dies könnte auch ein Effekt der Resistenzbildung sein. Typische Resistenzen gegenüber 5-FU ist der Gendefekt der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD), der beim Patienten zusätzliche schädliche bis tödliche Nebenwirkungen auslöst. Dies ist bei 3-5% der Bevölkerung der Fall. Daher sollte bei beginnender Chemotherapie mit 5-FU immer ein vorheriges Screening auf DPD-Mutation (Exon-14-Skipping-Mutation) vorgenommen werden (Höffken et al. 2002).

PiCa: Wie bei den FaDu-Zellen zeigte Cisplatin auch bei den PiCa-Zellen Cisplatin einen guten Effekt. Dabei gibt es signifikante zytotoxische Wirkung in der 2,5µM Konzentration ab Tag 4 und in der höheren Konzentration von 5µM ab Tag 2, im Vergleich zur Kontrolle. Die beiden Konzentrationen untereinander zeigten Signifikanzen ab Tag 4 und dies wiederum führt zu einer steigenden Toxizität bei zunehmender Konzentration. Durch den WST-8 Assay wurde dies auch bestätigt. Bei der Verdopplung der Konzentration auf 5µM Cisplatin, sank der Anteil der vitalen PiCa. 5-FU hingegen scheint kaum Wirkung auf die PiCa-Zellen zu haben, da hier nur an Tag 4 in der hohen Konzentration signifikante Unterschiede zur Kontrolle festzustellen waren. Bei dem Chemotherapeutikum 5-FU ist festzustellen, dass es eine hohe Konzentration braucht, um eine Toxizität der Tumorzellen zu erreichen. In der Studie von Guo et al. wurde entdeckt, dass es in menschlichen Krebszelllinien Zellzyklus-herunterregulierende Gene gibt, wodurch eine Resistenz gegenüber 5-FU entstehen kann. Die resistenten Zelllinien zeigten deutliche Zellzyklusverzögerungen in der G1- und G1/S-Phase des Zellzyklus. Zusätzlich haben sie eine verlängerte DNA-Synthese Zeit. Beide resistente Zelllinien, in der Studie von Guo (H630R10 / T47DFU2.5), demonstrierten eine deutlich verlängerte Doubling Time. Das ist darauf

zurückzuführen, dass es möglicherweise zu einer Verlangsamung im Zellzyklus kommt und dadurch zu einem verzögerten Einbau der 5-FU-Metaboliten in die DNA der Krebszellen kommt. Die Tumorzellen haben deshalb ausreichend Zeit, um die falsch-integrierten Nukleotide zu korrigieren oder zu reparieren (Guo et al. 2008).

4.2.2. Wirkung der Radiochemotherapie auf die Zelllinien

Durch die kombinierte Radiochemotherapie erhöhte sich die Überlebenschance für Patienten mit Kopf- und Halstumoren (Komatsu et al. 2014). Wendt et al. machten eine Studie bei Patienten mit Oropharynxkarzinom Stadium III/IV. Sie verglichen eine Patientengruppe die nur bestrahlt wurde mit einer Patientengruppe die eine kombinierte Radiochemotherapie mit Cisplatin, 5-FU und Leukoverin erhielt. Das Ergebnis zeigte eine gesteigerte Rezidivfreiheit und eine bessere Überlebensrate bei der kombinierten Radiochemotherapie (Wendt et al. 1998).

FaDu: Schneider et al. führten eine Studie durch in der sie die drei Zelllinien FaDu, Cal27 und SCC25 untersuchten. Hierbei fanden sie heraus, dass in allen Zelllinien eine Wachstumsinhibierung erreicht wurde, wohingegen die Kombination von Cisplatin und Neratinib (Tyrosinkinase Inhibitor) eine stärkere Hemmung als jedes Mittel alleine zeigte. In allen Zelllinien wurde Apoptose induziert. Die Kombination von Neratinib mit Bestrahlung oder Cisplatin zeigte eine signifikant erhöhte Apoptose. In klonogenen Assays wurde eine signifikante Wachstumshemmung in allen untersuchten Zelllinien beobachtet (Schneider et al. 2016). In dieser Arbeit hemmte die 2,5µM Cisplatin-Konzentration das Zellwachstum der FaDu und in Kombination mit der Bestrahlung war ein zusätzlicher Effekt ersichtlich. In der 5µM Cisplatin Konzentration war eine noch stärkere Hemmung durch die Chemotherapie vorhanden, wobei ein synergistischer Effekt durch die gleichzeitige Bestrahlung ausblieb. Am Ende der Versuchsreihe war im WST-8 Test hingegen ein deutlicher Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen in der niedrigen 2,5µM Cisplatin-Konzentration vorhanden. In der hohen 5µM Cisplatin-Konzentration gab es keinen signifikanten Unterschied. Die Kombination von Bestrahlung und 5-FU zeigt bei den FaDu keinen deutlich besseren Effekt als die Mono-Therapie mit 5-FU. Dies spiegelt nicht den radiosensitivierenden Effekt von 5-FU wieder, wodurch laut Byfield in 90% der Fälle eine radikale Chirurgie vermieden werden könnte (Byfield 1989). Diese Erkenntnis konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auch

Meregalli et al. erforschten in ihrer Studie die Dosis von 5-FU und individualisierten den Wochenplan. Dabei wurde die maximal verträgliche Dosis von 5-FU verabreicht und die Auswirkungen der Dosen auf das Überleben bewertet. In den Ergebnissen wurde eine Dosis von 720mg/m^2 KOF pro Woche als kritisch erachtet. Durch eine Erhöhung der Dosis gab es keine zusätzlichen Erfolge aber vermehrt schwere Nebenwirkungen (Meregalli et al. 1998).

Cal27: In den Studien von Budach et al. verbesserte eine zusätzliche Induktions-Chemotherapie mit 5-FU vor Radiochemotherapie das Gesamtüberleben der Patienten die an der Studie teilnahmen und die Rezidivfreiheit in lokal fortgeschrittenem HNSCC, im Vergleich zur definitiven Radiochemotherapie, nicht (Budach et al. 2016). Weiter bekräftigte sich in dieser Arbeit, dass 5-FU keinen großen zytotoxischen Effekt erzielte. Bei den Cal-27 führte das 5-FU in Kombination mit der Radiotherapie in beiden Konzentrationen zu keinen Signifikanzen. Auch im Vitalitätstest bestätigte sich, dass 5-FU in Kombination mit der Radiotherapie keinen zusätzlichen Erfolg erzielte.

PiCa: Forschungsergebnisse von Joschko et al. zeigten, dass Cisplatin die Radioresponse eines menschlichen Tumor-Xenotransplantats erhöht, wenn es in verschiedenen Zeitplänen kombiniert mit beschleunigter fraktionierter Strahlentherapie verabreicht wurde. Die einzelne Gabe von Cisplatin plus Strahlung zeigte nur eine additive Wirkung auf die Tumorstillstandsverzögerung. Wohingegen Cisplatin mit täglicher Bolusgabe und kontinuierlicher Infusion einen besseren additiven Effekt zeigte, wenn es in diesem humanen Tumormodell mit fraktionierter Bestrahlung kombiniert wurde. Somit scheint Cisplatin als Strahlungsverstärker besonders nützlich zu sein, wenn es im Verlauf der Bestrahlungsfractionen verabreicht wird (Joschko et al. 1997). In unserer Studie erzielte man durch die Kombination von Radiochemotherapie auf die Zelllinie PiCa in der hohen Konzentration mit Cisplatin ab Tag 2 eine Wachstumshemmung und in der niedrigen ab Tag 4. Somit ist auch hier eine Dosiserhöhung für eine zusätzliche Wachstumshemmung verantwortlich. Der WST-8-Assay hat auch gezeigt, dass die additive Radiochemotherapie mit Cisplatin Signifikanzen im Vergleich zu den in Monotherapie bestrahlten PiCa-Zellen aufwies. Wobei die hohe Konzentration von $5\mu\text{M}$ Cisplatin zwischen bestrahlten und unbestrahlten mit $5\mu\text{M}$ Cisplatin behandelten PiCa-Zellen keinen Vorteil verschaffte und somit bei hoher Cisplatinkonzentration eine Bestrahlung keinen synergistischen Effekt mehr erzielte. 5-FU zeigte bei den PiCa-

Zellen in Kombination mit Bestrahlung keinen Erfolg. Dies bestätigte sich auch im WST-8. Die Gründe für die individuellen Unterschiede in der Strahlensensibilität können auch durch methodische Differenzen hervorgerufen werden.

Es wurde festgestellt, dass in 3-D-Zellkulturmodellen auch Resistenzen auf Arzneimittel entstehen können und somit eine realistischere Wirksamkeit der Chemotherapie auf die klinische Anwendung prognostizieren können (Wilding und Bodmer 2014). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Medikamentendiffusion von der äußeren zur inneren Zellschicht in einem Sphäroid in ähnlicher Weise eine verminderte Durchlässigkeit imitiert, wie in einem in-vivo wachsenden Tumor bzw. Metastase (Ham et al. 2016; Perche und Torchilin 2012). Auch eine Resistenz auf Bestrahlung konnte in vorangegangenen Studien schon an Sphäroiden festgestellt werden (Sminia et al. 2003). Die individuellen Zellsensibilitäten und die Resistenzen auf Chemotherapie und Bestrahlung sind hauptsächlich durch Apoptose, Metabolismus, Sauerstoffgradienten, Zell-Zellkontakte und durch die Wirksamkeit der DNA-Reparaturmechanismen zurückzuführen. Dies sind alle Merkmale die ein Sphäroid ebenso aufweist und damit einem in-vivo Tumor ähnlich ist (Weiswald et al. 2015; Kimlin et al. 2013; Friedrich et al. 2007; Härmä et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieses 3D-Modell eine ähnliche Zellstruktur und ähnliche Zellfunktionen aufweist wie ein in-vivo Tumor. Somit könnten in Zukunft präklinisch die jeweiligen Sphäroide auf Chemo- und / oder Bestrahlungsresistenzen ausgetestet werden, um die komplexen Mechanismen der Resistenzen besser zu verstehen und um eine individuelle Therapie für den Patienten zu ermitteln. Durch dieses 3D-Modell lassen sich durch die Weiterentwicklung große Fortschritte zum Wohle des Patienten erzielen und eine für ihn bestmögliche Therapie gewährleisten. Um dann im Endeffekt eine Reduktion der Strahlendosis oder der Chemotherapeutika vorzunehmen ohne Einbußen in Bezug auf die Wirksamkeit zu bewirken, muss in Zukunft eine Weiterentwicklung stattfinden. Anstatt der Zelllinien sollte direkt aus einem Tumor, ein Biopsat entnommen und dieses anhand des 3D-Tumormodells zu kleinen Mikrotumoren angezüchtet werden. Diese werden mit verschiedenen Chemotherapeutika oder Strahlungsdosen in unterschiedlichen Konzentrationen oder in kombinierter Radiochemotherapie behandelt. Die Methode ist sinnvoll, um die Therapie in einer zeiter sparenden Weise auszutesten ohne den

Patienten zu schaden. Die personalisierte Therapie ist für Patient und Klinik wertvoll, da sie mehr Effizienz hat, Kosten einspart und mit einer höheren Wahrscheinlichkeit das gewünschte Ergebnis erzielt. Dies alles mit reduzierten Nebenwirkungen (Ginsburg und McCarthy 2001).

Eine Schwierigkeit liegt noch darin, den Tumor im Ganzen anzuzüchten, da es in dieser Arbeit nur mit einzelnen Zelllinien getestet wurde. Es Bedarf noch zukünftiger Weiterentwicklungen um den Tumor letztendlich als Biopsat verwenden zu können.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

Durch die hohe Inzidenz der Kopf- und Halstumoren, ist die Forschung an neuen Therapiemethoden aber auch die Suche nach neuen Methoden zur Personalisierung der Therapie unerlässlich. Trotz wissenschaftlicher Anstrengung, gab es in den letzten Jahrzehnten kaum Veränderungen in der Mortalität. Die Etablierung neuer Modelle, wie das in dieser Arbeit untersuchte 3D-Modell, welches deutliche Vorteile gegenüber einfacheren 2D-Modellen bietet, können dazu entscheidend beitragen (Shin et al. 2013). Die speziell entwickelten „Hanging-drop“-Kulturplatten GravityPlus™ (InSphero) erleichtern den Prozess der Tumorsphäroidbildung für spätere Hochdurchsatzuntersuchungen. Die Evaluation der Sphäroide im Wachstum und der Zellvitalität unter Bestrahlung ergab folgende Ergebnisse:

- Signifikante Wachstumshemmung nach Abschluß der dreimaligen Bestrahlung bei den FaDu-Zellen und bei den PiCa-Zellen gegenüber der Kontrolle
- Signifikante Wachstumshemmung bereits nach der 1. Bestrahlung bei den Cal27-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe

Um durch die Ergebnisse, die mittels Flächenmessung erhoben wurden, auf die Vitalität der Zellen schließen zu können, wurden die WST-8 Tests durchgeführt und ergaben, dass alle Zelllinien signifikant niedrigere Vitalitäten nach Bestrahlung zeigten, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Die wesentlichen Veränderungen im Wachstum und der Zellvitalität der Sphäroide auf die Behandlung mit den Chemotherapeutika Cisplatin bzw. 5-FU ergaben folgende Ergebnisse:

- Cisplatin hatte bei allen Sphäroiden in beiden Konzentrationen eine signifikante Wachstumshemmung erzeugt, einschließlich der WST-8 Tests
- 5-FU hatte eine schlechtere Wirkung und ergab bei den Flächenmessungen der Sphäroide nur vereinzelt eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums, im WST-8 Test gab es nur bei der FaDu Zelllinie eine signifikante Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Veränderungen des Sphäroidwachstums und der Vitalitäten aufgrund von kombinierter Radiochemotherapie ergaben:

- Bei den FaDu ist die kombinierte Radiochemotherapie nur zusammen mit der niedrigen Cisplatinkonzentration sinnvoll
- Die Cal27 reagieren nicht zusätzlich auf 5-FU

- Bei den PiCa sind Signifikanzen bei der Kombination von Bestrahlung mit Cisplatin in der niedrigen Konzentration und keine Signifikanzen bei der Kombination mit 5-FU zu verzeichnen

Die drei Zelllinien reagieren unterschiedlich in ihrer Sensibilität und Vitalität auf die Chemotherapeutika und die Bestrahlung. Während die FaDu-Zelllinie sehr gut auf das Chemotherapeutikum Cisplatin ansprach, wirkte das Chemotherapeutikum 5-FU in beiden Konzentrationen gravierend schlechter. Die Bestrahlung bringt bei den FaDu-Zellen zusätzliche Erfolge vor allem bei der Kombination von Bestrahlung und der 2,5µM Cisplatinkonzentration. Bei der Cal27-Zelllinie wurde nur das Chemotherapeutikum 5-FU getestet und erzielte kaum eine Wachstumshemmung. Die Bestrahlung hatte bei den Cal27 eine gute Wirkung. Die PiCa-Zelllinie reagierte auch gut auf das Chemotherapeutika Cisplatin, aber weniger auf 5-FU. Die Bestrahlung ergab auch einen zytotoxischen Effekt, der aber nicht so gravierend ausfiel wie bei den FaDu-Zellen. Die kombinierte Radiochemotherapie brachte auch nur in der 2,5µM Cisplatinkonzentration einen deutlichen additiven Effekt. Bei dem Chemotherapeutikum 5-FU erzielte die Kombination keinen weiteren Erfolg. Somit war zusammenfassend eine gute Wirkung des Cisplatins festzustellen. In hoher Cisplatin-Konzentration hingegen hatte die Bestrahlung keinen synergistischen Effekt. Anhand dieser Werte war festzustellen, dass jede Tumorzelllinie unterschiedlich auf Chemotherapie und Bestrahlung reagiert und auch die kombinierte Radiochemotherapie nicht immer die gleichen Erfolge erzielte. Langfristiges Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, dass Sphäroide aus Patientenbiopsien es ermöglichen vor Beginn der Therapie ein Ansprechen auf bestimmte Therapieschemata auszutesten und somit einen Beitrag zur personalisierten Tumortherapie leisten. Die daraus gewonnenen Ergebnisse könnten wirkungsvoll zur Verbesserung des Therapieerfolgs und einer Reduktion der Nebenwirkungen beitragen. In dieser Dissertation wurde daher ein Tumormodell etabliert, das zukünftig so weiterentwickelt werden soll, dass aus den Tumorbiopsaten des Patienten Mikrosphäroide gezüchtet und diverse Chemotherapeutika mit verschiedenen Konzentrationen und Radiotherapie in verschiedenen Dosierungen dagegen getestet werden können. Gleichzeitig kann evaluiert werden, ob durch die kombinierte Radiochemotherapie weitere Erfolge und bessere Ergebnisse erzielt werden können. Auch die Austestung von neuen Chemotherapeutika kann gezielt analysiert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aapro M S; Bohlius J; Cameron D A; Dal Lago L; Donnelly J P; Kearney N; Lyman G H; Pettengell R; Tjan-Heijnen V C; Walewski J; Weber D C; Zielinski C: 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990) 47 (1):8–32 (2011).

Adelstein D; Gillison M L; Pfister D G; Spencer S; Adkins D; Brizel D M; Burtress B; Busse P M; Caudell J J; Cmelak A J; Colevas A D; Eisele D W; Fenton M; Foote R L; Gilbert J; Haddad R I; Hicks W L; Hitchcock Y J; Jimeno A; Leizman D; Lydiatt W M; Maghami E; Mell L K; Mittal B B; Pinto H A; Ridge J A; Rocco J; Rodriguez C P; Shah J P; Weber R S; Witek M; Worden F; Yom S S; Zhen W; Burns J L; Darlow S D: NCCN Guidelines Insights. Head and Neck Cancers, Version 2.2017. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 15 (6):761–770 (2017).

Alföldi R; Szebeni J G; Puskás G L: The potential of three-dimensional tumor models and cell culturing in cancer research and diagnostics. *Magyar onkologia* 59 (4):303–309 (2015).

Ang K K; Harris J; Wheeler R; Weber R; Rosenthal D I; Nguyen-Tân P F; Westra W H; Chung C H; Jordan R C; Lu C; Kim H; Axelrod R; Silverman C C; Redmond K P; Gillison M L: Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 363 (1):24–35 (2010).

Ansell S M: Sintilimab. Another effective immune checkpoint inhibitor in classical Hodgkin lymphoma. *The Lancet. Haematology* 6 (1):e2-e3 (2019).

Apps M G; Choi E H Y; Wheate N J: The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocrine-related cancer* 22 (4):R219-33 (2015).

Argiris A; Karamouzis M V; Raben D; Ferris R L: Head and neck cancer. *Lancet* (London, England) 371 (9625):1695–1709 (2008).

Awwad H K; Lotayef M; Shouman T; Begg A C; Wilson G; Bentzen S M; Abd El-Moneim H; Eissa S: Accelerated hyperfractionation (AHF) compared to conventional fractionation (CF) in the postoperative radiotherapy of locally advanced head and neck cancer. Influence of proliferation. *British journal of cancer* 86 (4):517–523 (2002).

Barretina J; Caponigro G; Stransky N; Venkatesan K; Margolin A A; Kim S; Wilson C J; Lehar J; Kryukov G V; Sonkin D; Reddy A; Liu M; Murray L; Berger M F; Monahan J E; Morais P; Meltzer J; Korejwa A; Jane-Valbuena J; Mapa F A; Thibault J; Bric-Furlong E; Raman P; Shipway A; Engels I H; Cheng J; Yu G K; Yu J; Aspesi P, JR; Silva M de; Jagtap K; Jones M D; Wang L; Hatton C; Palesscandolo E; Gupta S; Mahan S; Sougnez C; Onofrio R C; Liefeld T; MacConaill L; Winckler W; Reich M; Li N; Mesirov J P; Gabriel S B; Getz G; Ardlie K; Chan V; Myer V E; Weber B L; Porter J; Warmuth M; Finan P; Harris J L; Meyerson M; Golub T R; Morrissey M P; Sellers W R; Schlegel R; Garraway L A: The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483 (7391):603–607 (2012).

Begg A C; van der Kolk P J; Dewit L; Bartelink H: Radiosensitization by cisplatin of RIF1 tumour cells in vitro. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 50 (5):871–884 (1986).

Bellon S F; Coleman J H; Lippard S J: DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 30 (32):8026–8035 (1991).

Beningo K A; Dembo M; Wang Y-I: Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (52):18024–18029 (2004).

Bernier J; Domenge C; Ozsahin M; Matuszewska K; Lefèbvre J-L; Greiner R H; Giralt J; Maingon P; Rolland F; Bolla M; Cognetti F; Bourhis J; Kirkpatrick A; van Glabbeke M: Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 350 (19):1945–1952 (2004).

Bettag M: Taschenbuch Onkologie 2006/07. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie. München, Bern, Wien [u.a.]: Zuckschwerdt:127–130 (2006).

Bhadriraju K; Chen C S: Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug discovery today* 7 (11):612–620 (2002).

Blanchard P; Baujat B; Holostenco V; Bourredjem A; Baey C; Bourhis J; Pignon J-P: Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC). A comprehensive analysis by tumour site. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 100 (1):33–40 (2011).

Blot W J; McLaughlin J K; Winn D M; Austin D F; Greenberg R S; Preston-Martin S; Bernstein L; Schoenberg J B; Stemhagen A; Fraumeni J F: Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Research* 48 (11):3282–3287 (1988).

Bobbs A S; Cole J M; Cowden Dahl K D: Emerging and Evolving Ovarian Cancer Animal Models. *Cancer growth and metastasis* 8 (Suppl 1):29–36 (2015).

Bobik T V; Popov R Y; Aliev T K; Mokrushina Y A; Shamborant O G; Khurs E N; Knorre V D; Smirnov I V; Gabibov A G: Production of Recombinant Human Transferrin in Eukaryotic *Pichia pastoris* Expression System. *Bulletin of experimental biology and medicine* 167 (3):335–338 (2019).

Boehm A; Wichmann G; Mozet C; Dietz A: Aktuelle Therapieoptionen bei rezidivierenden Kopf-Hals-Tumoren. *HNO* 58 (8):762–769 (2010).

Bokhari M; Carnachan R J; Cameron N R; Przyborski S A: Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *Journal of anatomy* 211 (4):567–576 (2007).

Bonner J A; Harari P M; Giralt J; Azarnia N; Shin D M; Cohen R B; Jones C U; Sur R; Raben D; Jassem J; Ove R; Kies M S; Baselga J; Youssoufian H; Amellal N; Rowinsky E K; Ang K K: Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine* 354 (6):567–578 (2006).

Borrell B: How accurate are cancer cell lines? *Nature* 463 (7283):858 (2010).

Bossi P; Alfieri S: Investigational drugs for head and neck cancer. *Expert opinion on investigational drugs*:1–14 (2016).

Braakhuis B; René Leemans C; H. Brakenhoff R: A genetic progression model of oral cancer. Current evidence and clinical implications. *Journal of oral pathology & medicine* 33 (6):317–322 (2004).

Braakhuis B J M; Tabor M P; Kummer J A; Leemans C R; Brakenhoff R H: A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization. Evidence and clinical implications. *Cancer Research* 63 (8):1727–1730 (2003).

Brehehy D; Oke O; Faux S P: The use of in vitro systems to assess cancer mechanisms and the carcinogenic potential of chemicals. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 39 (3):233–255 (2011).

Brierley J D; Gospodarowicz M; Wittekind C: UICC International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumors. 8th edn. Wiley-Blackwell:17–36 (2017).

Browman G P; Cronin L: Standard chemotherapy in squamous cell head and neck cancer. What we have learned from randomized trials. *Seminars in Oncology* 21 (3):311–319 (1994).

Budach W; Bölke E; Kammers K; Gerber P A; Orth K; Gripp S; Matuschek C: Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). A meta-analysis of randomized trials. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 118 (2):238–243 (2016).

Byfield J E: 5-Fluorouracil radiation sensitization--a brief review. *Investigational new drugs* 7 (1):111–116 (1989).

Byfield J E: Theoretical basis and clinical applications of 5-fluorouracil as a radiosensitizer—an overview:115–127 (1991).

Califano J; van der Riet P; Westra W; Nawroz H; Clayman G; Piantadosi S; Corio R; Lee D; Greenberg B; Koch W: Genetic progression model for head and neck cancer. Implications for field cancerization. *Cancer Research* 56 (11):2488–2492 (1996).

Cantley R L; Gabrielli E; Montebelli F: Ancillary studies in determining human papillomavirus status of squamous cell carcinoma of the oropharynx. A review. *Patholog Res Int* 2011:138469 (2011).

Carlos de Vicente J; Junquera Gutiérrez L M; Zapatero A H; Fresno Forcelledo M F; Hernández-Vallejo G; López Arranz J S: Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head & neck* 26 (1):22–30 (2004).

Carmichael J; DeGraff W G; Gazdar A F; Minna J D; Mitchell J B: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay. Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47 (4):936–942 (1987).

Castet F; Brenes J; Taberna M; Mesía R: The emergence of long-term survivors in recurrent and metastatic squamous cell head and neck cancer. *Current opinion in oncology* 31 (3):160–168 (2019).

Chamchoy K; Pakotiprapha D; Pumirat P; Leartsakulpanich U; Boonyuen U: Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC biochemistry* 20 (1):4 (2019).

Chu K C; Miller B A; Springfield S A: Measures of racial/ethnic health disparities in cancer mortality rates and the influence of socioeconomic status. *Journal of the National Medical Association* 99 (10):1092-100, 1102-4 (2007).

Cooper J S; Pajak T F; Forastiere A A; Jacobs J; Campbell B H; Saxman S B; Kish J A; Kim H E; Cmelak A J; Rotman M; Machtay M; Ensley J F; Chao K S C; Schultz C J; Lee N; Fu K K: Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* 350 (19):1937–1944 (2004).

Cukierman E; Pankov R; Yamada K M: Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current opinion in cell biology* 14 (5):633–639 (2002).

Dasari S; Tchounwou P B: Cisplatin in cancer therapy. Molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* 740:364–378 (2014).

Deisenroth C; Soldatow V Y; Ford J; Stewart W; Brinkman C; LeCluyse E L; MacMillan D K; Thomas R S: Development of an In Vitro Human Thyroid Microtissue Model for Chemical Screening. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* (2019).

Del Re M; Di Paolo A; van Schaik R H; Bocci G; Simi P; Falcone A; Danesi R: Dihydropyrimidine dehydrogenase polymorphisms and fluoropyrimidine toxicity. Ready for routine clinical application within personalized medicine? *The EPMA journal* 1 (3):495–502 (2010).

Dewit L: Combined treatment of radiation and cisdiamminedichloroplatinum (II). A review of experimental and clinical data. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 13 (3):403–426 (1987).

Dietz, A.; Keilholz, U. Deutsche Krebsgesellschaft: Kopf-Hals-Tumoren - Therapie. Online verfügbar unter <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/kopf-hals-tumoren/therap>, zuletzt aktualisiert am 08.04.2016 (2016).

Dikomey E; Dahm-Daphi J: Workshop report: Techniques to Detect DNA Strand Breaks. Erlangen, Germany, 29-31 March 1993. *Radiation and environmental biophysics* 33 (1):85–88 (1994).

Dini S; Binder B J; Fischer S C; Mattheyer C; Schmitz A; Stelzer E H K; Bean N G; Green J E F: Identifying the necrotic zone boundary in tumour spheroids with pair-correlation functions. *Journal of the Royal Society, Interface* 13 (123) (2016).

Divaris K; Olshan A F; Smith J; Bell M E; Weissler M C; Funkhouser W K; Bradshaw P T: Oral health and risk for head and neck squamous cell carcinoma: the Carolina Head and Neck Cancer Study. *Cancer Causes & Control* 21 (4):567–575 (2010).

Douple E B: Interactions between platinum coordination complexes and radiation. *Antitumor drug-radiation interactions*:171–184 (1990).

Drewitz M; Helbling M; Fried N; Bieri M; Moritz W; Lichtenberg J; Kelm J M: Towards automated production and drug sensitivity testing using scaffold-free spherical tumor microtissues. *Biotechnology journal* 6 (12):1488–1496 (2011).

D'Souza G; Kreimer A R; Viscidi R; Pawlita M; Fakhry C; Koch W M; Westra W H; Gillison M L: Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 356 (19):1944–1956 (2007).

Duvvuri U; Myers J N: Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide. *Current problems in surgery* 46 (2):114–117 (2009).

Ertel A; Verghese A; Byers S W; Ochs M; Tozeren A: Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Molecular cancer* 5 (1):55 (2006).

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

Feinmesser R; Freeman J L; Noyek A M; Birt D; Gullane P; Mullen J B: MRI and neck metastases: a clinical, radiological, pathological correlative study. *The Journal of otolaryngology* 19 (2):136–140 (1990).

Ferlito A; Robbins K T; Shah J P; Medina J E; Silver C E; Al-Tamimi S; Fagan J J; Paleri V; Takes R P; Bradford C R; Devaney K O; Stoeckli S J; Weber R S; Bradley P J; Suárez C; Leemans C R; Coskun H H; Pitman K T; Shaha A R; Bree R de; Hartl D M; Haigentz M; Rodrigo J P; Hamoir M; Khafif A; Langendijk J A; Owen R P; Sanabria A; Strojan P; Vander Poorten V; Werner J A; Bień S; Woolgar J A; Zbären P; Betka J; Folz B J; Genden E M; Talmi Y P; Strome M; González Botas J H; Olofsson J; Kowalski L P; Holmes J D; Hisa Y; Rinaldo A: Proposal for a rational classification of neck dissections. *Head & neck* 33 (3):445–450 (2011).

Fletcher G H; Evers W T: Radiotherapeutic management of surgical recurrences and postoperative residuals in tumors of the head and neck. *Radiology* 95 (1):185–188 (1970).

Florento L; Matias R; Tũaño E; Santiago K; dela Cruz F; Tuazon A: Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using In Vitro Cell-Based Approach. *International Journal of Biomedical Science : IJBS* 8 (1):76–80 (2012).

Foty R: A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp* (51) (2011).

Friedrich J; Ebner R; Kunz-Schughart L A: Experimental anti-tumor therapy in 3-D. Spheroids--old hat or new challenge? *International journal of radiation biology* 83 (11-12):849–871 (2007).

Fujishima H; Nakano S; Masumoto N; Esaki T; Tatsumoto T; Kondo T; Niho Y: Inhibition by 5-fluorouracil of ERCC1 and gamma-glutamylcysteine synthetase messenger RNA expression in a cisplatin-resistant HST-1 human squamous carcinoma cell line. *Oncology research* 9 (4):167–172 (1997).

Garattini S; Grignaschi G: Animal testing is still the best way to find new treatments for patients. *European journal of internal medicine* 39:32–35 (2017).

Gerok W: Die innere Medizin. Referenzwerk für den Facharzt. Stuttgart, New York: Schattauer:391 (2007).

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland: e.V. Atlas der Krebsinzidenz und -mortalität in Deutschland (GEKID Atlas). Datenlieferung Dezember 2014. Lübeck. Online verfügbar unter <http://www.gekid.de> (2015).

Gill S; Gill R; Wicks D; Liang D: A cell-based Rb(+)-flux assay of the Kv1.3 potassium channel. *Assay and drug development technologies* 5 (3):373–380 (2007).

Gillison M L; Chaturvedi A K; Anderson W F; Fakhry C: Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of*

clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 33 (29):3235–3242 (2015).

Gillison M L; D'Souza G; Westra W; Sugar E; Xiao W; Begum S; Viscidi R: Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 100 (6):407–420 (2008).

Gingerich M A; Smith J D; Michmerhuizen N L; Ludwig M; Devenport S; Matovina C; Brenner C; Chinn S B: Comprehensive review of genetic factors contributing to head and neck squamous cell carcinoma development in low-risk, nontraditional patients. *Head & neck* 40 (5):943–954 (2018).

Ginsburg G S; McCarthy J J: Personalized medicine: Revolutionizing drug discovery and patient care. *Trends in Biotechnology* 19 (12):491–496 (2001).

Gioanni J; Fischel J L; Lambert J C; Demard F; Mazeau C; Zanghellini E; Ettore F; Formento P; Chauvel P; Lalanne C M: Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *European journal of cancer & clinical oncology* 24 (9):1445–1455 (1988).

Goldenberg D; Lee J; Koch W M; Kim M M; Trink B; Sidransky D; Moon C-S: Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 131 (6):986–993 (2004).

Gosepath E M; Eckstein N; Hamacher A; Servan K; Jonquieres G von; Lage H; Györfy B; Royer H D; Kassack M U: Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. *Int. J. Cancer* 123 (9):2013–2019 (2008).

Grégoire V; Lefebvre J-L; Licitra L; Felip E: Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21 Suppl 5:v184-6 (2010).

Greshock J; Nathanson K; Martin A-M; Zhang L; Coukos G; Weber B L; Zaks T Z: Cancer cell lines as genetic models of their parent histology: analyses based on array comparative genomic hybridization. *Cancer Research* 67 (8):3594–3600 (2007).

Guada M; Ganugula R; Vadhanam M; Ravi Kumar M N V: Urolithin A Mitigates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Inhibiting Renal Inflammation and Apoptosis in an Experimental Rat Model. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 363 (1):58–65 (2017).

Guo X; Goessl E; Jin G; Collie-Duguid E S R; Cassidy J; Wang W; O'Brien V: Cell cycle perturbation and acquired 5-fluorouracil chemoresistance. *Anticancer research* 28 (1A):9–14 (2008).

Gussack G S; Liu P I; Rohrer S D; Hester R B; Coggin J H: Human squamous cell carcinoma lines express oncofetal 44-kd polypeptide defined by monoclonal antibody to mouse fetus. *Cancer* 62 (2):283–290 (1988).

Hagemann J; Jacobi C; Hahn M; Gstoettner S; Welz C; Schwenk-Zieger S; Stauber R; Baumeister P; Becker S: Spheroid-based 3D Cell Cultures Enable Personalized

Therapy Testing and Drug Discovery in Head and Neck Cancer. *Anticancer research* 37 (5):2201–2210 (2017).

Ham S L; Joshi R; Thakuri P S; Tavana H: Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 241 (9):939–954 (2016).

Hanahan D; Weinberg R A: The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1):57–70 (2000).

Hanck-Silva G; Fatori Trevizan L N; Petrilli R; Lima F T de; Eloy J O; Chorilli M: A Critical Review of Properties and Analytical/Bioanalytical Methods for Characterization of Cetuximab. *Critical reviews in analytical chemistry*:1–11 (2019).

Hardisson D: Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 260 (9):502–508 (2003).

Härmä V; Virtanen J; Mäkelä R; Happonen A; Mpindi J-P; Knuutila M; Kohonen P; Lötjönen J; Kallioniemi O; Nees M: A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS one* 5 (5):e10431 (2010).

He J; Ji X; Li Y; Xue X; Feng G; Zhang H; Wang H; Gao M: Subchronic exposure of benzo(a)pyrene interferes with the expression of Bcl-2, Ki-67, C-myc and p53, Bax, Caspase-3 in sub-regions of cerebral cortex and hippocampus. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 68 (2-3):149–156 (2016).

Heery C R; O'Sullivan-Coyne G; Madan R A; Cordes L; Rajan A; Rauckhorst M; Lamping E; Oyelakin I; Marté J L; Lepone L M; Donahue R N; Grenga I; Cuillerot J-M; Neuteboom B; Heydebreck A v; Chin K; Schlom J; Gulley J L: Avelumab for metastatic or locally advanced previously treated solid tumours (JAVELIN Solid Tumor). A phase 1a, multicohort, dose-escalation trial. *The Lancet. Oncology* 18 (5):587–598 (2017).

Hennessey P T; Westra W H; Califano J A: Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *Journal of dental research* 88 (4):300–306 (2009).

Henry A; McCaul J A: Osseocutaneous radial forearm flap with beavertail modification; a case report of a novel, single, reconstructive free flap for the tongue, floor of mouth and mandible. *International journal of surgery case reports* 28:270–273 (2016).

Herdegen T: *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart, New York, NY: Thieme:535 (2014).

Hill B T: *Overview of experimental laboratory investigations of antitumor drug-radiation interactions: Antitumor drug-radiation interactions*: CRC Press, Boca Raton:225–246 (1990).

Hinni M L; Ferlito A; Brandwein-Gensler M S; Takes R P; Silver C E; Westra W H; Seethala R R; Rodrigo J P; Corry J; Bradford C R; Hunt J L; Stojan P; Devaney K O; Gnepp D R; Hartl D M; Kowalski L P; Rinaldo A; Barnes L: Surgical margins in head and neck cancer. A contemporary review. *Head & neck* 35 (9):1362–1370 (2013).

Hirono A; Fujii H; Takano T; Chiba Y; Azuno Y; Miwa S: Molecular analysis of eight biochemically unique glucose-6-phosphate dehydrogenase variants found in Japan. *Blood* 89 (12):4624–4627 (1997).

Ho W J; Pham E A; Kim J W; Ng C W; Kim J H; Kamei D T; Wu B M: Incorporation of multicellular spheroids into 3-D polymeric scaffolds provides an improved tumor model for screening anticancer drugs. *Cancer science* 101 (12):2637–2643 (2010).

Höckel M; Vaupel P: Biological consequences of tumor hypoxia. *Seminars in Oncology* 28:36–41 (2001).

Höffken K; Köhne C-H; Vanhoefer U; Hossfeld K-D; Seeber S: Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms mit 5-FU/ Folinsäure und Irinotecan. *Dtsch Arztebl International* 99 (5). Online verfügbar unter <http://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=30290:A1770-A1771> (2002).

Hug O: *Medizinische Strahlenkunde. Biophysikalische Einführung für Studierende und Ärzte*: Springer Berlin Heidelberg:104 (2013).

Hung S-H; Lin C-Y; Lee J-Y; Tseng H: Computed tomography image characteristics of metastatic lymph nodes in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Auris, nasus, larynx* 39 (6):606–610 (2012).

Ishihara H; Takagi T; Kondo T; Tachibana H; Fukuda H; Yoshida K; Iizuka J; Kobayashi H; Okumi M; Ishida H; Tanabe K: Correlation between the magnitude of best tumor response and patient survival in nivolumab therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 36 (4):35 (2019).

Ishiyama M; Miyazono Y; Sasamoto K; Ohkura Y; Ueno K: A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44 (7):1299–1305 (1997).

Izumo T; Terada Y; Tone M; Inomata M; Kuse N; Awano N; Moriya A; Jo T; Yoshimura H; Furuhashi Y: Rapid effects of benralizumab on severe asthma during surgery for residual tumor after advanced lung squamous cell carcinoma treatment with pembrolizumab. *Respiratory medicine case reports* 26:292–295 (2019).

Izzo J G; Papadimitrakopoulou V A; Li X Q; Ibarra H; Lee J S; Ro J Y; El-Naggar A; Hong W K; Hittelman W N: Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis. In vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 17 (18):2313–2322 (1998).

Jesse R H; Lindberg R D: The efficacy of combining radiation therapy with a surgical procedure in patients with cervical metastasis from squamous cancer of the oropharynx and hypopharynx. *Cancer* 35 (4):1163–1166 (1975).

Jiang L; Ji N; Zhou Y; Li J; Liu X; Wang Z; Chen Q; Zeng X: CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral oncology* 45 (11):e204-7 (2009).

Jimenez L; Jayakar S K; Ow T J; Segall J E: Mechanisms of Invasion in Head and Neck Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine* 139 (11):1334–1348 (2015).

Jordan K; Feyer P; Höller U; Link H; Wörmann B; Jahn F: Supportive Treatments for Patients with Cancer. *Deutsches Arzteblatt international* 114 (27-28):481–487 (2017).

Jordan R C; Lingen M W; Perez-Ordóñez B; He X; Pickard R; Koluder M; Jiang B; Wakely P; Xiao W; Gillison M L: Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol* 36 (7):945–954 (2012).

Joschko M A; Webster L K; Bishop J F; Groves J; Yuen K; Olver I N; Narayan K N; Ball D L: Radioenhancement by cisplatin with accelerated fractionated radiotherapy

in a human tumour xenograft. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 40 (6):534–539 (1997).

Kadletz L; Heiduschka G; Domayer J; Schmid R; Enzenhofer E; Thurnher D: Evaluation of spheroid head and neck squamous cell carcinoma cell models in comparison to monolayer cultures. *Oncology letters* 10 (3):1281–1286 (2015).

Kagawa T; Yuasa K; Fukunari F; Shiraishi T; Miwa K: Quantitative evaluation of vascularity within cervical lymph nodes using Doppler ultrasound in patients with oral cancer: relation to lymph node size. *Dento maxillo facial radiology* 40 (7):415–421 (2011).

Kanemura Y; Mori H; Kobayashi S; Islam O; Kodama E; Yamamoto A; Nakanishi Y; Arita N; Yamasaki M; Okano H; Hara M; Miyake J: Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *Journal of Neuroscience Research* 69 (6):869–879 (2002).

Katt M E; Placone A L; Wong A D; Xu Z S; Searson P C: In Vitro Tumor Models. Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 4:12 (2016).

Kim K-H; Jahan S A; Kabir E; Brown R J C: A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international* 60:71–80 (2013).

Kim M S; Li S L; Bertolami C N; Cherrick H M; Park N H: State of p53, Rb and DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines. *Anticancer research* 13 (5A):1405–1413 (1993).

Kimlin L C; Casagrande G; Virador V M: In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research. An update. *Molecular carcinogenesis* 52 (3):167–182 (2013).

Kobayashi K; Hisamatsu K; Suzui N; Hara A; Tomita H; Miyazaki T: A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *Journal of clinical medicine* 7 (9) (2018).

Komatsu M; Shiono O; Taguchi T; Sakuma Y; Nishimura G; Sano D; Sakuma N; Yabuki K; Arai Y; Takahashi M; Isitoya J; Oridate N: Concurrent chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil (TPF) in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Japanese journal of clinical oncology* 44 (5):416–421 (2014).

Kossatz S; Weber W A; Reiner T: Optical Imaging of PARP1 in Response to Radiation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS one* 11 (1) (2016).

Kreienberg R: Management des Ovarialkarzinoms. Interdisziplinäres Vorgehen. Heidelberg: Springer (Onkologie aktuell):11 (2009).

Kumar B; Yadav A; Lang J C; Cipolla M J; Schmitt A C; Arradaza N; Teknos T N; Kumar P: YM155 reverses cisplatin resistance in head and neck cancer by decreasing cytoplasmic survivin levels. *Mol. Cancer Ther.* 11 (9):1988–1998 (2012).

Kunz-Schughart L A; Freyer J P; Hofstaedter F; Ebner R: The use of 3-D cultures for high-throughput screening. The multicellular spheroid model. *Journal of biomolecular screening* 9 (4):273–285 (2004).

Kwok G; Yau T C C; Chiu J W; Tse E; Kwong Y-L: Pembrolizumab (Keytruda). *Human vaccines & immunotherapeutics* 12 (11):2777–2789 (2016).

Lane D P: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358 (6381):15–16 (1992).

Lee H T; Lee J Y; Lim H; Lee S H; Moon Y J; Pyo H J; Ryu S E; Shin W; Heo Y-S: Molecular mechanism of PD-1/PD-L1 blockade via anti-PD-L1 antibodies atezolizumab and durvalumab. *Scientific reports* 7 (1):5532 (2017).

Leemans C R; Braakhuis B J M; Brakenhoff R H: The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer* 11 (1):9–22 (2011).

Leischner H: *Basics Onkologie*. München: Elsevier, Urban et Fischer (Basics):6 (2014).

Li F; Vijayasankaran N; Shen A Y; Kiss R; Amanullah A: Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs* 2 (5):466–479 (2010).

Li S-J; Yang X-N; Qian H-Y: Antitumor effects of WNT2B silencing in GLUT1 overexpressing cisplatin resistant head and neck squamous cell carcinoma. *American journal of cancer research* 5 (1):300–308 (2015).

Licitra L; Perrone F; Bossi P; Suardi S; Mariani L; Artusi R; Oggionni M; Rossini C; Cantù G; Squadrelli M; Quattrone P; Locati L D; Bergamini C; Olmi P; Pierotti M A; Pilotti S: High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (36):5630–5636 (2006).

Lorsch J R; Collins F S; Lippincott-Schwartz J: *Cell Biology. Fixing problems with cell lines*. *Science (New York, N.Y.)* 346 (6216):1452–1453 (2014).

Mack B; Eggert C; Eder K; Imrich S; Baumeister P; Harreus U; Gires O: Rapid and non-enzymatic in vitro retrieval of tumour cells from surgical specimens. *PloS one* 8 (1):e55540 (2013).

Maier H; Zöller J; Herrmann A; Kreiss M; Heller W-D: Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* 108 (6):655–661 (1993).

Marur S; Forastiere A A: Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic proceedings* 83 (4):489–501 (2008).

Meregalli M; Martignoni G; Frontini L; Zonato S; Pavia G; Beretta G: Increasing doses of 5-fluorouracil and high-dose folinic acid in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Tumori* 84 (6):662–665 (1998).

Messner S; Agarkova I; Moritz W; Kelm J M: Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Archives of toxicology* 87 (1):209–213 (2013).

Minna Allinen; Rameen Beroukhim; Li Cai; Cameron Brennan; Jaana Lahti-Domenici; Haiyan Huang; Dale Porter; Min Hu; Lynda Chin; Andrea Richardson; Stuart Schnitt; William R Sellers; Kornelia Polyak: Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6 (1):17–32 (2004).

Mishra A; Verma V: Oral Sex and HPV: Population Based Indications. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India* 67 (Suppl 1):1–7 (2015).

Morabito J A; Holman M R; Ding Y S; Yan X; Chan M; Chafin D; Perez J; Mendez M I; Cardenas R B; Watson C: The use of charcoal in modified cigarette filters for mainstream smoke carbonyl reduction. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 86:117–127 (2017).

Morton R P; Rugman F; Dorman E B; Stoney P J; Wilson J A; McCormick M; Veevers A; Stell P M: Cisplatin and bleomycin for advanced or recurrent

squamous cell carcinoma of the head and neck. A randomised factorial phase III controlled trial. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 15 (3):283–289 (1985).

Mourad M; Jetmore T; Jategaonkar A A; Moubayed S; Moshier E; Urken M L: Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer in the United States. A SEER Population Study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 75 (12):2562–2572 (2017).

Mroz E A; Tward A D; Tward A M; Hammon R J; Ren Y; Rocco J W: Intra-tumor genetic heterogeneity and mortality in head and neck cancer. Analysis of data from the Cancer Genome Atlas. *PLoS medicine* 12 (2):e1001786 (2015).

Mueller-Klieser W: Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *Journal of cancer research and clinical oncology* 113 (2):101–122 (1987).

Nath S; Devi G R: Three-dimensional culture systems in cancer research. Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & Therapeutics* 163:94–108 (2016).

Nennstiel S: Basics allgemeine Pathologie. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer (Basics):82–83 (2009).

Perche F; Torchilin V P: Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols. *Cancer biology & therapy* 13 (12):1205–1213 (2012).

Pereira D A; Williams J A: Origin and evolution of high throughput screening. *British journal of pharmacology* 152 (1):53–61 (2007).

Pfreundner L; Willner J; Marx A; Hoppe F; Beckmann G; Flentje M: The influence of the radicality of resection and dose of postoperative radiation therapy on local control and survival in carcinomas of the upper aerodigestive tract. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 47 (5):1287–1297 (2000).

Pignon J-P; Le Maître A; Maillard E; Bourhis J: Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC). An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 92 (1):4–14 (2009).

Pistamaltzian N F; Georgoulas V; Kotsakis A: The role of immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Expert review of respiratory medicine* 13 (5):435–447 (2019).

Place A E; Jin Huh S; Polyak K: The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Research* 13 (6):1–11 (2011).

Pless M: Bedeutung der Chemotherapie in der kurativen Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. *HNO* 48 (12):873–878 (2000).

Promokine: Biochemischer Ablauf bei der Farbentstehung beim WST-8. Bildmaterial der Firma Promokine, Heidelberg. WST-8 Assay. Online verfügbar unter http://www.promokine.info/fileadmin/Image_Archive/Cell_Analysis/WST-8_Assay.JPG (2014).

Rajan A; Kim C; Heery C R; Guha U; Gulley J L: Nivolumab, anti-programmed death-1 (PD-1) monoclonal antibody immunotherapy. Role in advanced cancers. *Human vaccines & immunotherapeutics* 12 (9):2219–2231 (2016).

Rangan S R: A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 29 (1):117–121 (1972).

Rapidis A D; Scully C: Recent Advances in Oral Oncology. *European Oncology & Haematology* 05 (01):25 (2009).

Ravi M; Ramesh A; Pattabhi A: Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research. *Journal of cellular physiology* 232 (10):2679–2697 (2017).

Reiß M: *Facharztwissen HNO-Heilkunde. Differenzierte Diagnostik und Therapie.* Heidelberg: Springer:116–118 (2009).

Reiss M; Brash D E; Munoz-Antonia T; Simon J A; Ziegler A; Vellucci V F; Zhou Z L: Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Oncology research* 4 (8-9):349–357 (1992).

Remmert C; Mansour N; Hofauer B; Scherer E Q; Bas M; Bier H; Knopf A: Pharyngotomy in head and neck squamous cell carcinoma. Functional and oncological aspects. *Acta oto-laryngologica*:1–7 (2017).

Reuter C W M; Morgan M A; Eckardt A: Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *British journal of cancer* 96 (3):408–416 (2007).

Rodriguez-Frias E A; Lee W M: Cancer chemotherapy I: hepatocellular injury. *Clinics in liver disease* 11 (3):641-62, viii (2007).

Rogers S N; Devine J; Lowe D; Shokar P; Brown J S; Vaugman E D: Longitudinal health-related quality of life after mandibular resection for oral cancer. A comparison between rim and segment. *Head & neck* 26 (1):54–62 (2004).

Romagosa C; Simonetti S; López-Vicente L; Mazo A; Lleonart M E; Castellvi J; Ramon y Cajal S: p16(Ink4a) overexpression in cancer. A tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* 30 (18):2087–2097 (2011).

Rosenberg B; van Camp L; Krigas T: Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode 205 (4972):698–699 (1965).

Sandberg R; Ernberg I: Assessment of tumor characteristic gene expression in cell lines using a tissue similarity index (TSI). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (6):2052–2057 (2005).

Santini M T; Rainaldi G: Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 67 (3):148–157 (1999).

Savoia P; Astrua C; Fava P: Ipilimumab (Anti-Ctla-4 Mab) in the treatment of metastatic melanoma. Effectiveness and toxicity management. *Human vaccines & immunotherapeutics* 12 (5):1092–1101 (2016).

Schneider S; Thurnher D; Kadletz L; Seemann R; Brunner M; Kotowski U; Schmid R; Lill C; Heiduschka G: Effects of neratinib and combination with irradiation and chemotherapy in head and neck cancer cells. *Oral diseases* 22 (8):797–804 (2016).

Schwenzer N; Ehrenfeld M: *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: Georg Thieme Verlag*:77–80 (2010).

Scudiero D A; Shoemaker R H; Paull K D; Monks A; Tierney S; Nofziger T H; Currens M J; Seniff D; Boyd M R: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48 (17):4827–4833 (1988).

- Seeber S: *Therapiekonzepte Onkologie*. Berlin, New York: Springer:72 (1998).
- Seiwert T Y; Cohen E E W: State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *British journal of cancer* 92 (8):1341–1348 (2005).
- Seiwert T Y; Zuo Z; Keck M K; Khattri A; Pedamallu C S; Stricker T; Brown C; Pugh T J; Stojanov P; Cho J; Lawrence M S; Getz G; Brägelmann J; DeBoer R; Weichselbaum R R; Langerman A; Portugal L; Blair E; Stenson K; Lingen M W; Cohen E E W; Vokes E E; White K P; Hammerman P S: Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (3):632–641 (2015).
- Sessions D G; Spector G J; Lenox J; Parriott S; Haughey B; Chao C; Marks J; Perez C: Analysis of treatment results for floor-of-mouth cancer. *Laryngoscope* 110 (10 Pt 1):1764–1772 (2000).
- Shin C S; Kwak B; Han B; Park K: Development of an in vitro 3D tumor model to study therapeutic efficiency of an anticancer drug. *Molecular pharmaceutics* 10 (6):2167–2175 (2013).
- Skiba-Tatarska M; Kusa-Podkańska M; Surtel A; Wysokińska-Miszczuk J: The side-effects of head and neck tumors radiotherapy. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 41 (241):47–49 (2016).
- Sminia P; Acker H; Eikesdal H P; Kaaijk P; Enger P; Slotman B; Bjerkvig R: Oxygenation and response to irradiation of organotypic multicellular spheroids of human glioma. *Anticancer research* 23 (2B):1461–1466 (2003).
- Spitzbart H; Schmidt F: Eigene Ergebnisse über die Züchtung von Ovarialkarzinomen in vitro und Testung gegenüber Zytostatika. *Zentralblatt für Gynäkologie* 92 (7):201–205 (1970).
- Statistisches Bundesamt: *Jahrbuch 2015*. Wiesbaden. Online verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/Publikationen/StatistischesJahrbuch/Gesundheit.pdf?__blob=publicationFile (2015).
- Sturgis E M; Wei Q; Spitz M R: Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Seminars in Oncology* 31 (6):726–733 (2004).
- Sun T; Jackson S; Haycock J W; MacNeil S: Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *Journal of biotechnology* 122 (3):372–381 (2006).
- Sutherland R M: Cell and environment interactions in tumor microregions. The multicell spheroid model. *Science (New York, N.Y.)* 240 (4849):177–184 (1988).
- Suwinski R; Wozniak G; Misiolek M; Jaworska M; Kozaczka M; Bal W; Nowara E; Miszczyk L: Randomized clinical trial on 7-days-a-week post-operative radiotherapy vs concurrent post-operative radiochemotherapy in locally advanced cancer of the oral cavity/oropharynx. A report on acute normal tissue reactions. *The British journal of radiology* 89 (1061):20150805 (2016).
- Sverker N; Leif J: Induction and Repair of DNA Strand Breaks in Human Cell-lines with Different Radiosensitivity. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 39 (1):107–112 (1981).

Tamar H; Alexander Dvilansky; Ofer Shpilberg; Ilana Nathan: Appraisal of the MTT-based Assay as a Useful Tool for Predicting Drug Chemosensitivity in Leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 44 (11):1957–1962 (2003).

Tantular I S; Kawamoto F: An improved, simple screening method for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Tropical Medicine & International Health* 8 (6):569–574 (2003).

Toker C: Some observations on the deposition of metastatic carcinoma within cervical lymph nodes. *Cancer* 16 (3):364–374 (1963).

Tominaga H; Ishiyama M; Ohseto F; Sasamoto K; Hamamoto T; Suzuki K; Watanabe M: A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* 36 (2):47–50 (1999).

Toyli M; Rosberg-Kulha L; Capra J; Vuoristo J; Eskelinen S: Different responses in transformation of MDCK cells in 2D and 3D culture by v-Src as revealed by microarray techniques, RT-PCR and functional assays. *Lab Invest* 90 (6). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2010.63>:915–928 (2010).

Trivedi S; Dekermendjian K; Julien R; Huang J; Lund P-E; Krupp J; Kronqvist R; Larsson O; Bostwick R: Cellular HTS assays for pharmacological characterization of Na(V)1.7 modulators. *Assay and drug development technologies* 6 (2):167–179 (2008).

Tung Y-C; Hsiao A Y; Allen S G; Torisawa Y-s; Ho M; Takayama S: High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *The Analyst* 136 (3):473–478 (2011).

van der Worp H B; Howells D W; Sena E S; Porritt M J; Rewell S; O'Collins V; Macleod M R: Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS medicine* 7 (3):e1000245 (2010).

van Montfort R L M; Workman P: Structure-based drug design. Aiming for a perfect fit. *Essays in biochemistry* 61 (5):431–437 (2017).

Wang D; Lippard S J: Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery* 4 (4):307–320 (2005).

Wang M B; Liu I Y; Gornbein J A; Nguyen C T: HPV-Positive Oropharyngeal Carcinoma. A Systematic Review of Treatment and Prognosis. *Otolaryngology-head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 153 (5):758–769 (2015).

Wasif Saif M; Diasio R B: Fluoropyrimidines as Radiation Sensitizers. *Chemoradiation in Cancer Therapy* (Humana Press Inc., Totowa, NJ). Online verfügbar unter <http://www.springer.com/978-1-58829-028-1>:23–24 (2003).

Weber J; Mandala M; Del Vecchio M; Gogas H J; Arance A M; Cowey C L; Dalle S; Schenker M; Chiarion-Sileni V; Marquez-Rodas I; Grob J-J; Butler M O; Middleton M R; Maio M; Atkinson V; Queirolo P; Gonzalez R; Kudchadkar R R; Smylie M; Meyer N; Mortier L; Atkins M B; Long G V; Bhatia S; Lebbé C; Rutkowski P; Yokota K; Yamazaki N; Kim T M; Pril V de; Sabater J; Qureshi A; Larkin J; Ascierto P A: Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *The New England journal of medicine* 377 (19):1824–1835 (2017).

Weinberger P M; Yu Z; Haffty B G: Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24:736–747 (2006).

Weiswald L-B; Bellet D; Dangles-Marie V: Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* (New York, N.Y.) 17 (1):1–15 (2015).

Wendt T G; Grabenbauer G G; Rödel C M; Thiel H-J; Aydin H; Rohloff R; Wustrow T P; Iro H; Popella C; Schalhorn A: Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized multicenter study. *Journal of Clinical Oncology* 16 (4):1318–1324 (1998).

Wigmore P M; Mustafa S; El-Beltagy M; Lyons L; Umka J; Bennett G: Effects of 5-FU. *Advances in experimental medicine and biology* 678:157–164 (2010).

Wilding J L; Bodmer W F: Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Research* 74 (9):2377–2384 (2014).

Wittekind C: TNM. Klassifikation maligner Tumoren. 8. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH:1–49 (2017).

Wittes R E; Cvitkovic E; Shah J; Gerold F P; Strong E W: CIS-Dichlorodiammineplatinum(II) in the treatment of epidermoid carcinoma of the head and neck. *Cancer treatment reports* 61 (3):359–366 (1977).

Wolff K D; Beck J; Bikowski K; Böhme P; Budach W; Burkhardt A; Danker H; Eberhardt W; Engers K; Fietkau R; Frerich B; Gauler T; Germann G; Gittler-Hebestreit N; Grötz K; Horch R; Ihrler S; Keilholz U; Lell M; Lübke A; Mantey W; Nusser-Müller-Busch R; Pistner H; Paradies K; Reichert T; Reinert S; Schliephake H; Schmitter M; Singer S; Westhofen M; Wirz S; Wittlinger M: Mundhöhlenkarzinom "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms". München (AWMF(007-100OL)). Online verfügbar unter <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/007-100OL.html> (2012).

Würdemann N; Wagner S; Sharma S J; Prigge E-S; Reuschenbach M; Gattenlöhner S; Klussmann J P; Wittekindt C: Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in oncology* 7:129 (2017).

Xu Z; Gao Y; Hao Y; Li E; Wang Y; Zhang J; Wang W; Gao Z; Wang Q: Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials* 34 (16):4109–4117 (2013).

Yoon D H; Kim S-B: S-1 plus cisplatin: another option in the treatment of advanced head and neck cancer? *Expert review of anticancer therapy* 10 (5):659–662 (2010).

Zeleftsky M J; Harrison L B; Armstrong J G: Long-term treatment results of postoperative radiation therapy for advanced stage oropharyngeal carcinoma. *Cancer* 70 (10):2388–2395 (1992).

Zhou G; Liu Z; Myers J N: TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *Journal of cellular biochemistry* 117 (12):2682–2692 (2016).

Zimmermann S; Zarse K; Schulz T J; Siems K; Müller-Kuhrt L; Birringer M; Ristow M: A cell-based high-throughput assay system reveals modulation of oxidative and nonoxidative glucose metabolism due to commonly used organic solvents. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 40 (1):29–37 (2008).

7. ANHANG

7.1. Danksagungen

Ich bedanke mich bei allen die mich während der langen Zeit des Studiums und bei der Doktorarbeit unterstützt haben.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich aussprechen für **Dr. med. Philipp Baumeister** der mir es mir ermöglichte im Labor für klinisch experimentelle HNO zu promovieren. Er war stets am Fortgang dieser Arbeit interessiert und stand mir mit seinem Fachwissen zur Seite.

Vielen Dank an **Dr. med. Sven Becker**, der mich und meine Arbeit betreute und stets ein offenes Ohr für alle Fragen hatte. Für seine Hilfe und Unterstützung bin ich ihm sehr dankbar.

Mein spezieller Dank gilt **Sabina Schwenk-Zieger**. Sie führte mich in die Methodik im Labor ein. Ohne ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank vor allem meinem Ehemann Harald, der immer hinter mir steht, sowie meinen Eltern, Geschwistern und Schwiegereltern. Ohne ihre Unterstützung und konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Auch einen Dank an meinen kleinen Sohn Maximilian Ludwig, der mich zu seinen Schlafenszeiten an der Dissertation arbeiten ließ.

7.2. Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Originalia:

Hagemann J, Jacobi C, **Gstöttner S**, Welz C, Schwenk-Zieger S, Stauber R, Strieth S, Künzel J, Baumeister P, Becker S (2018). Therapy Testing in a Spheroid-based 3D Cell Culture Model for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Visualized Experiments*. 2018; 20;(134). doi: 10.3791/57012.

Hagemann J, Jacobi C, Hahn M, **Gstöttner S**, Welz C, Schwenk-Zieger S, Stauber R, Baumeister P, Becker S (2017). Spheroid-based 3D Cell Cultures Enable Personalized Therapy Testing and Drug Discovery in Head and Neck Cancer. *Anticancer Res*. 2017; 37(5):2201-2210.

Abstracts:

Sven Becker, Moritz Hahn, Christian Welz, Christoph Matthias, Philipp Baumeister (2015). Die 96-well hanging drop Methode zur Untersuchung von Kopf-Hals-Karzinomen. *Geran Medical Sciences GMS Publishing House*; 2015. Doc15hnod171.

Sven Becker, Ulrich Harréus, Sabina Schwenk-Zieger, Moritz Hahn, Donata Gellrich, Philipp Baumeister, Christian Welz (2014). The Hanging Drop Method – A new 3D-model to study Head and Neck Cancer Cell lines. *Poster P1168, 5th IFHNOS World Congress, New York, NY 2014*



Eidesstattliche Versicherung

Gstöttner Sabine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Etablierung eines 3D-Tumormodells für Kopf-Hals-Tumorzelllinien

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 8.12.19

Ort, Datum

Sabine Gstöttner

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand