

Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik – Plastische Operationen
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Einfluss des Swell-1-Kanal-konstituierenden-Proteins (LRRC8A) auf die Wirkung
Cisplatins bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen in dreidimensionaler Zellkultur**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Yara Al-Zamel
aus Damaskus

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

31.08.2023

Wissenschaftler sollten niemals behaupten, dass etwas absolut wahr ist. Du solltest niemals Perfektion oder 100 Prozent beanspruchen, weil du nie dorthin gelangst.

Jocelyn Bell Burnell (Radioastronomin)

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Oktober 2018 und Juni 2022 im Labor von Prof. Dr. Roland Stauber, AG Molekulare und zelluläre Onkologie, aus der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erstellt.

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:

Poster:

Yara Al Zamel, Svenja Siemer, Jan Hagemann, Sven Becker, Torsten_Ertongur-Fauth, Roland H. Stauber, „Three-dimensional spheroids allow for chemo-therapy testing“, UCT Mainz Science Day 2019, 18.-19.09.2019, Mainz.

Originalarbeiten:

Siemer, S.; Fauth, T.; Scholz, P.; Al-Zamel, Y.; Khamis, A.; Gül, D.; Freudelsperger, L.; Wollenberg, B.; Becker, S.; Stauber, R.H.; Hagemann, J. Profiling Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer: A Critical Role of the VRAC Ion Channel for Chemoresistance. *Cancers* 2021, 13, 4831. <https://doi.org/10.3390/cancers13194831>

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 8 |
| 1.1 | <i>Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs.....</i> | 8 |
| 1.1.1 | Epidemiologie und Ätiologie | 9 |
| 1.1.2 | Klassifikationssysteme..... | 11 |
| 1.1.3 | Diagnostik und Therapie..... | 14 |
| 1.1.4 | Klinischer Verlauf und Prognose..... | 19 |
| 1.2 | <i>Physiologie der volumen-regulierten Anionen-Kanäle (VRAC).....</i> | 20 |
| 1.3 | <i>Rolle der Untereinheit LRRC8A (SWELL1) bei der Resistenzentwicklung gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika.....</i> | 22 |
| 1.4 | <i>Die Pica-Zelllinie.....</i> | 24 |
| 1.5 | <i>Die dreidimensionale Zellkultur.....</i> | 25 |
| 1.6 | <i>Zielsetzung der Arbeit.....</i> | 28 |
| 2 | Material und Methoden | 30 |
| 2.1 | <i>Material.....</i> | 30 |
| 2.1.1 | Allgemeine Verbrauchsmaterialien..... | 30 |
| 2.1.2 | Geräte | 30 |
| 2.1.3 | Software..... | 32 |
| 2.1.4 | Chemikalien | 32 |
| 2.1.5 | Zellkultur..... | 34 |
| 2.1.6 | Verwendete Zelllinien | 34 |
| 2.1.7 | Verwendete Antikörper..... | 35 |
| 2.2 | <i>Methoden.....</i> | 36 |
| 2.2.1 | Zellkultur..... | 36 |
| 2.2.2 | Wound healing assay | 40 |
| 2.2.3 | Luminescent cell viability assay..... | 41 |
| 2.2.4 | Immunologische Methoden | 42 |
| 2.2.5 | Statistische Analyse..... | 44 |
| 3 | Ergebnisse | 45 |
| 3.1 | <i>Einsatz der dreidimensionalen Zellmodelle in der Therapietestung.....</i> | 45 |
| 3.2 | <i>Bestätigung des LRRC8A-Knockouts.....</i> | 47 |
| 3.2.1 | LRRC8A-Knockout steigert die Resistenz gegenüber Cisplatin in zweidimensionaler Zellkultur..... | 48 |
| 3.2.2 | Bestätigung der Bedeutung von LRRC8A-Knockout für die Cisplatinresistenz in Tumorsphäroiden | 50 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.3 | LRRC8A-Knockout steigert die Resistenz gegenüber Carboplatin in zweidimensionaler Zellkultur..... | 51 |
| 3.2.4 | Bestätigung der Bedeutung von LRRC8A-Knockout für die Carboplatinresistenz in Tumorsphäroiden | 53 |
| 3.3 | <i>LRRC8A-knockout stabilisiert die Morphologie der Sphäroide</i> | 54 |
| 3.4 | <i>LRRC8A-Knockout verlangsamt die Proliferation und Migration der Tumorzellen</i> | 55 |
| 3.5 | <i>Sphäroide sind gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika anfälliger als Monolayer-Zellen</i> | 58 |
| 4 | Diskussion | 60 |
| 4.1 | <i>Relevanz des LRRC8A-Knockouts für die Resistenzentwicklung gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika</i> | 60 |
| 4.2 | <i>Interpretation der Ergebnisse dreidimensionaler Zellkultur</i> | 63 |
| 4.3 | <i>Vor- und Nachteile der in vitro-Experimente</i> | 65 |
| 5 | Ausblick | 67 |
| 6 | Zusammenfassung | 69 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 70 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 72 |
| 9 | Tabellenverzeichnis | 74 |
| 10 | Literaturverzeichnis | 75 |
| 11 | Erklärung | 80 |

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs

Maligne Erkrankungen gehören heutzutage weltweit bei allen Altersgruppen zu den häufig vorkommenden Todesursachen. Infolge des rasanten demographischen Wandels in der deutschen Gesellschaft wird geschätzt, dass bis 2030 ungefähr 51 % der Männer und 43 % der Frauen in Deutschland an Krebs erkranken und rund 25 % aller Männer und 20 % der Frauen an der malignen Erkrankung bzw. an deren Folgen sterben werden [1].

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (eng.: *Head and neck squamous cell carcinoma*; HNSCC) sind maligne Erkrankungen, die an sechster Stelle unter den weltweit häufigsten Krebserkrankungen stehen [2]. Diese Tumore haben eine Inzidenz von jährlich mehr als 500,000 Fällen weltweit [3], und eine gemittelte fünf-Jahre-Überlebensrate von ungefähr 50 % [4]. Die Prognose dieser Tumore gilt als ungünstig und hat sich in den letzten zwei Dekaden kaum verändert [4].

HNSCCs entstehen aus der Schleimhaut, genauer dem Plattenepithel der betroffenen Organe und können an verschiedenen anatomischen Regionen im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert sein. Einige dieser Regionen sind die Mundhöhle (Lippen, Zungen und Mundboden), die Nase und Nasennebenhöhlen, Pharynx (Naso-, Oro- und Hypopharynx) und der Larynx. Zudem können Speicheldrüsen von HNSCCs betroffen sein (siehe Abbildung 1) [5].

In der Abbildung 1 ist neben den möglichen Entstehungsorten von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs außerdem im hervorgehobenen Teil das histologische Muster der HNSCCs dargestellt. Der histopathologische Befund ist die wichtigste diagnostische Methode zur Bestätigung der Diagnose und zum Ausschluss möglicher Differentialdiagnosen.

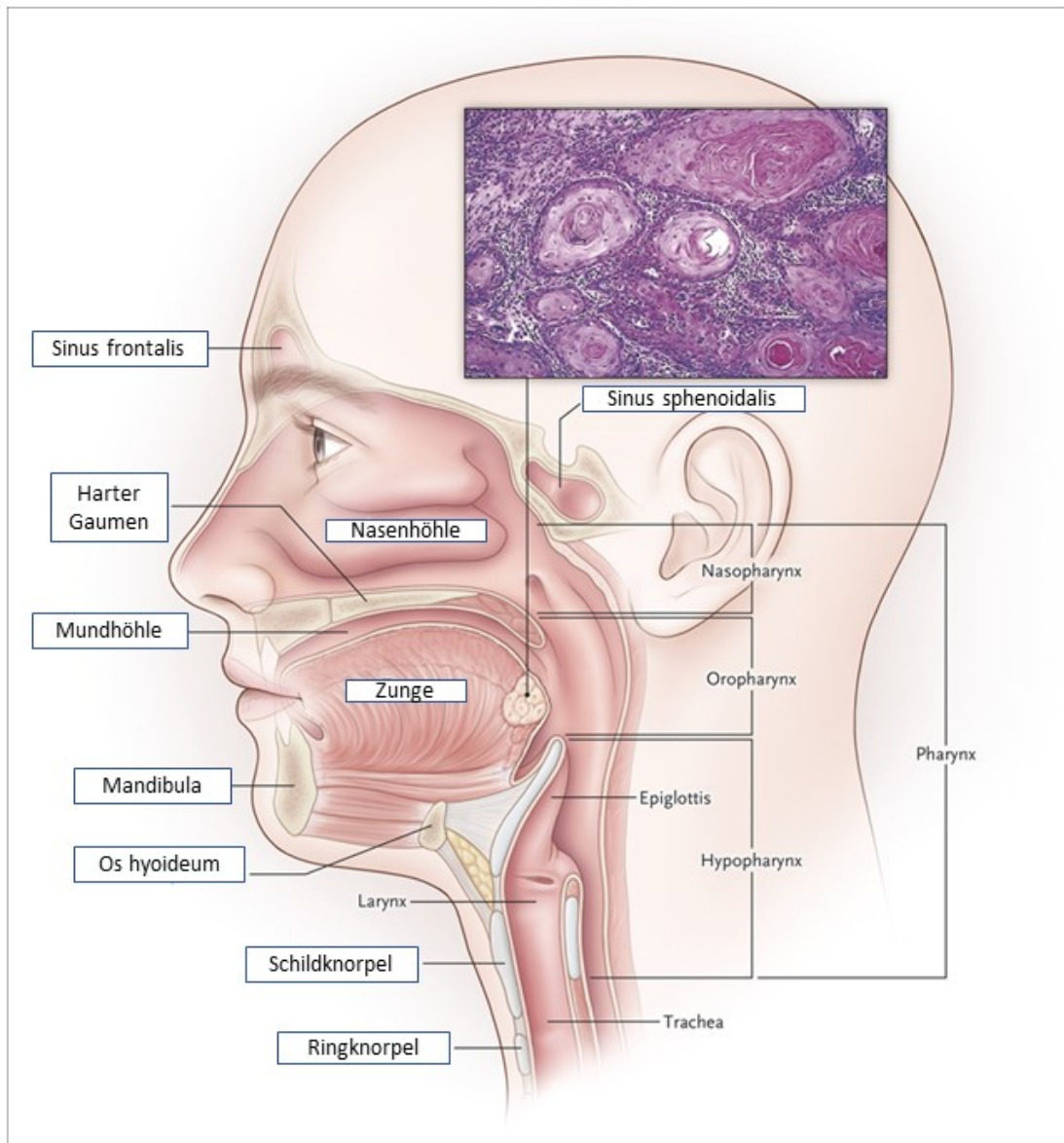


Abbildung 1: Entstehungsorte der Kopf-Hals-Tumore und das typische histologische Muster der HNSCCs [5].

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

HNSCCs sind hochprävalente Tumore und haben eine hohe Inzidenz von jährlich 500000 Neudiagnosen weltweit [3]. Die Entstehung der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs ist multifaktoriell [7]. Sowohl modifizierbare als auch nicht-modifizierbare Faktoren können die Genese dieser Karzinome beeinflussen. Zu den modifizierbaren Faktoren gehören beispielsweise das Rauchverhalten und der Alkoholkonsum [8]. Diese sind auch die relevantesten Risikofaktoren für HNSCCs und

werden bei ungefähr 70-80 % aller neu diagnostizierten Fälle beobachtet [9]. Die klassischen HNSCC-Patienten sind also häufig Menschen, die regelmäßig geraucht und Alkohol konsumiert haben [6]. Raucher haben ein fünf- bis 25-fach höheres Risiko, ein HNSCC zu entwickeln, im Vergleich zu Nichtrauchern [7, 10]. Auf der anderen Seite werden das hohe Lebensalter, das Geschlecht und die genetische Prädisposition als endogene, vom Patienten nicht beeinflussbare Faktoren angesehen.

Überdies können die Humanen Papillomaviren (HPV) bei der Kanzerogenese der HNSCCs und insbesondere der oropharyngealen Karzinome (OPSCCs) eine Rolle spielen. Die high-risk-HP-Viren der Typen 16 und 18 tragen zur Entstehung von ungefähr 60-70 % der OPSCC-Fälle in den USA und Westeuropa, aber weniger als 10 % der Fälle in den Ländern mit niedrigen bis mittleren Einkommen bei [11]. Es wurde außerdem in einer Studie gezeigt, dass Personen, die in ihrem Leben mehr als 5 Sexpartner hatten, ein höheres Infektionsrisiko mit high-risk-HP-Viren und damit ein höheres Risiko für Kopf-Hals-Tumore (HNC) aufweisen. Das HNC-Risiko bei Personen mit einem Sexpartner betrug bei Frauen 9,4 % und bei Männern 5,6 %. Dagegen waren die Zahlen bei Personen mit mehr als 4 Sexpartnern deutlich höher und betrugen bei Frauen 41,1 % und bei Männern 61,8 % [12]. Eine Selbstkontrolle der Anzahl der Sexpartner kann die HPV-Infektion zu einem modifizierbaren Faktor machen. Die neuen Studien diskutieren auch eine vertikale Transmission der HPV-Viren von der betroffenen Mutter zu ihrem Kind. Auf der einen Seite können die Viren während der Geburt vom Genitaltrakt der betroffenen Mutter in die Mundhöhle des Neugeborenen gelangen. Die Viren wurden in den Zellen der Mundschleimhaut von 32 % der neugeborenen Kinder, deren Mütter mit Genital-HPV infiziert sind, detektiert [13]. Einige Studien zeigten, dass 30 % der Kinder von Müttern mit Genital-HPV an rezidivierender respiratorischer Papillomatose oder an oralen Papillomen gelitten haben [13]. Auf der anderen Seite steht eine Transmission über die Muttermilch zur Debatte. Bei 4 % der betroffenen Mütter konnte die DNA der HP-Viren in der Muttermilch nachgewiesen werden [14]. Trotzdem scheint diese Art der vertikalen Transmission selten zu sein. In einer Studie wurde die DNA der high-risk HPV-16 in der Muttermilch von 2,5 % der mit HPV-infizierten Müttern detektiert. Allerdings konnten die Viren bei deren Kindern weder in der Mundhöhle noch in der Cervix gefunden werden [15].

Die HPV-Assoziation hat Einfluss auf die Epidemiologie, die Pathophysiologie und den Therapieerfolg der HNSCCs [7, 16]. Die HPV-assoziierten OPSCCs betreffen häufig jüngere, gesündere und nicht-rauchende Männer aus höheren sozioökonomischen Schichten [3, 7]. Es wird außerdem beobachtet, dass die Inzidenz der HNSCCs im Larynx oder Hypopharynx abnimmt, während die OPSCC-Inzidenz ständig zunimmt. Dahinter stehen die steigenden HPV-Infektions- bzw. Detektionsraten und das sich verändernde Rauchverhalten [3].

1.1.2 Klassifikationssysteme

Tumore werden nach Klassifikationssystemen klinisch eingestuft. Das erleichtert die Stadieneinteilung und die Therapieplanung [17]. Eine große Rolle spielt die Klassifikation der Tumore auch beim Re-Staging nach der Therapie, um den Therapieerfolg zu evaluieren und den klinischen Verlauf zu prognostizieren [17]. Internationaler Standard für die Klassifikation der HNSCC ist die klinische TNM-Klassifikation (Tabelle 1) [17]. Laut dieser Klassifikation werden Tumore nach der Größe des Primarius (T), dem Lymphknotenstatus (N) und der Fernmetastasierung (M) eingestuft. Bei Oropharynxkarzinomen wird zwischen HPV-negativen (beziehungsweise „Status unbekannt“) und denen mit HPV-Assoziation unterschieden.

Tabelle 1: Klinische TNM-Klassifikation [17]. Tumorausdehnung (T für Tumor) am Beispiel der Lippen- und Mundhöhlenkarzinome

| | |
|-----|---|
| Tx | Tumorstatus nicht beurteilbar |
| T0 | Kein Anhalt für einen Primarius |
| Tis | Carcinoma in situ |
| T1 | Tumorgröße bis maximal 2 cm mit einer maximalen Invasionstiefe bis 5 mm |
| T2 | Tumorgröße bis maximal 2 cm mit einer maximalen Invasionstiefe zwischen 5 und 10 mm ODER: Tumorgröße zwischen 2 und 4 cm mit einer maximalen Invasionstiefe bis 10 mm |
| T3 | Tumorgröße über 4 cm ODER: Maximale Invasionstiefe über 10 mm |

| | |
|-----|--|
| T4a | <p><u>Lippe:</u> Tumor infiltriert die Kortikalis, den Nervus alveolaris inferior, den Mundhöhlenboden oder die Haut des Kinns oder der Nase</p> <p><u>Mundhöhle:</u> Tumor infiltriert die Kortikalis der Maxilla oder Mandibula, die äußere Zungenmuskulatur (Muskulus hyoglossus, Muskulus genioglossus, Muskulus styloglossus und Muskulus palatoglossus), die Kieferhöhle oder die Gesichtshaut</p> |
| T4b | <p>Tumor infiltriert das Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder die Schädelbasis</p> <p>ODER: Tumor umschließt die Arteria carotis interna</p> |

Tabelle 2 : Klinische TNM-Klassifikation [12]. Regionärer Lymphknotenbefall (N für Nodus): am Beispiel des p16-negativen Oropharynxkarzinoms.

| | |
|-----|---|
| Nx | Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar |
| N0 | Kein regionärer Lymphknotenbefall |
| N1 | Befall eines solitären ipsilateralen Lymphknotens mit einer Größe bis 3 cm, ohne extranodale Ausbreitung |
| N2a | Befall eines solitären ipsilateralen Lymphknotens mit einer Größe zwischen 3 und 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung |
| N2b | Befall multipler ipsilateraler Lymphknoten mit einer Größe jeweils bis 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung |
| N2c | bilateraler oder Kontralateraler Lymphknotenbefall mit einer Größe jeweils bis 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung |
| N3a | Ausdehnung des Lymphknotenbefalls über 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung |
| N3b | <p>Solitärer Lymphknotenbefall mit einer Größe über 3 cm, mit extranodaler Ausbreitung (Befall der Haut, der Weichteile oder der Nerven)</p> <p>Oder: multipler ipsilateraler, kontralateraler oder bilateraler Lymphknotenbefall mit extranodaler Ausbreitung</p> |

Tabelle 3: Klinische TNM-Klassifikation [12]. Regionärer Lymphknotenbefall (N für Nodus): am Beispiel des p16-positiven Oropharynxkarzinoms

| | |
|----|---|
| NX | Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar |
| N0 | Kein regionärer Lymphknotenbefall |

| | |
|----|--|
| N1 | Befall der ipsilateralen Lymphknoten mit einer Größe bis 6 cm |
| N2 | Befall der kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten mit einer Größe bis 6 cm |
| N3 | Ausdehnung des Lymphknotenbefalls über 6 cm |

Tabelle 4: Fernmetastasierung

| | |
|----|--------------------------------------|
| MX | Fernmetastasierung nicht beurteilbar |
| M0 | Keine Fernmetastasen nachweisbar |
| M1 | Fernmetastasen vorhanden |

Außerdem wird mithilfe der TNM-Klassifikation durch die Kombination der T-, N- und M-Status das klinische Stadium des Tumors erhoben. Hierunter werden die Tumore nach der *Union for International Cancer Control (UICC)* klassifiziert. Auf Tabelle 2 ist die UICC-Klassifikation dargestellt. Nach dieser Klassifikation wird zwischen fünf Stadien der Tumore unterschieden.

Tabelle 5: Das UICC-Stadium der Tumore anhand der TNM-Klassifikation [18]

| Das klinische Stadium | T | N | M |
|------------------------------|-----------------|----------|----------|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1 | N0 | M0 |
| Stadium II | T2 | N0 | M0 |
| Stadium III | T3 | N0 | M0 |
| | T1, T2, T3 | N1 | M0 |
| Stadium IVa | T4a | N0, N1 | M0 |
| | T1, T2, T3, T4a | N2 | M0 |
| Stadium IVb | Jedes T | N3 | M0 |
| | T4b | Jedes N | M0 |
| Stadium IVc | Jedes T | Jedes N | M1 |

Es wird zwischen der klinischen (cTNM) und der histopathologischen TNM-Klassifikation (pTNM) unterschieden. Erstere bezieht sich auf die klinischen Befunde, während eine Biopsie oder die Resektion des Primarius für die Erstellung der letzteren

nötig sind [19]. Zur histopathologischen Klassifikation gehört auch der R-Status (R für Resektionsrand). Er kommt postoperativ zum Einsatz, um zu entscheiden, ob im Gesunden noch Tumorreste zu finden sind. In diesem Zusammenhang bedeutet R0 einen tumorfreien Resektionsrand. R1 steht für mikroskopische und R2 für makroskopische Tumorreste am Resektionsrand [17].

1.1.3 Diagnostik und Therapie

Bei einem Verdacht auf eine Neoplasie im Hals- und Kopfbereich kommen verschiedene diagnostische Methoden zum Einsatz. Am Beispiel des glottischen Larynxkarzinoms, das sich häufig mit Heiserkeit als Symptom äußert, soll der diagnostische Weg beschrieben werden. Wenn Heiserkeit länger als vier Wochen anhält, sollte ein Larynxkarzinom diagnostisch ausgeschlossen werden. Dafür ist eine 70°- oder 90°-Endoskopie des Kehlkopfbereichs geeignet [19]. Da die meisten anatomischen Regionen des Kopf-Hals-Bereichs schwer zugänglich sind, spielen in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde endoskopische Verfahren generell eine große Rolle in der Diagnostik. Die Primärdiagnostik eines HNSCCs beinhaltet nach einer ausführlichen Anamnese eine Untersuchung der Nase durch eine vordere Rhinoskopie und Nasenendoskopie, eine Pharyngoskopie und Laryngoskopie. Die Untersuchung findet erst am wachen Patienten statt. Unabhängig von den Befunden ist auf jeden Fall eine Spiegelung der oberen Atem- und Schluckwege in Vollnarkose empfohlen, um alle Regionen zu untersuchen und histologische Proben zu gewinnen. Mit einer Tastuntersuchung und mittels Ultraschall diagnostik des Halses wird der Lymphknotenstatus ermittelt.

Radiologisch sind CT und MRT mit Kontrastmittel die Standarduntersuchungen in der Primärdiagnostik, für den Ausschluss von Fernmetastasen und die Klassifizierung der Tumore nach Stadium, Lymphknotenbefall und Metastasierungsstatus. PET-CT kommt erst bei einer malignen Lymphadenopathie des Halses mit einem unbekanntem Primarius (CUP-Syndrom) oder posttherapeutisch zur Evaluation des Therapieerfolgs bzw. zur Detektion von möglichen Residuen zum Einsatz [20]. Bei einer geplanten Lymphknotenbiopsie wird die komplette Entfernung des betroffenen Lymphknotens empfohlen [19]. Es ist technisch einfacher durchführbar und kann möglicherweise eine Streuung von Tumorzellen verhindern.

Des Weiteren ist ein HPV-Status auch ein wesentlicher Faktor beim Staging der Tumore [5]. Eine Testung auf HPV-Assoziation ist ein wichtiger Bestandteil der HNSCC-Diagnostik. HPV-positive Patienten werden häufig mit einem kleineren, aber schon in die Lymphknoten metastasierten Primarius diagnostiziert [16]. Eine immunhistochemische Analyse einer HNSCC-Biopsie ist derzeit eine der wichtigsten Methoden bei der Identifikation von High-Risk-HP-Viren in den Tumorzellen [3]. Hierbei ist p16 der heute in der Routinediagnostik der OPSCCs am meisten benutzte Surrogatbiomarker für die HPV-Assoziation. Bei einer HPV-Infektion kann eine Überexpression des Proteins p16 in den Tumorzellen beobachtet werden. Außerhalb des Oropharynx ist p16 weniger aussagekräftig, da auch HPV-negative HNSCCs eine Überexpression des p16 zeigen können [21]. Ferner können für HP-Virusproteine codierende DNA- und RNA-Abschnitte mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) oder In-Situ-Hybridisierung (ISH) direkt nachgewiesen werden [3].

Über die Jahre hat sich die operative Therapie immer weiterentwickelt. Grundsätzlich wird versucht, für bessere kosmetische Ergebnisse und kürzere Genesungszeiten die Zugangswege so klein wie möglich zu halten. Dies gelingt unter anderem durch die minimal-invasive Chirurgie, die mit niedrigeren Morbiditätsraten verbunden sein kann [16]. Hiermit sind Verfahren gemeint, die natürliche Körperöffnungen wie den Mund oder die Nase als Zugangsweg nutzen. Daher kommen heute transorale robotische Chirurgie und transorale Laser-Mikrochirurgie so häufig wie möglich zum Einsatz und werden von Patienten gut toleriert [16]. Die oberste Zielsetzung ist immer die vollständige, in sano-Resektion des Tumors mit Sicherheitsabstand. Aufgrund der engen Lagebeziehungen zwischen dem Tumor und den wichtigen umliegenden Gefäßen, Muskeln und Nerven können funktionelle Einschränkungen die Folge sein. Neben der Entfernung des Primarius wird meist eine Neck Dissection mit unterschiedlicher Radikalität durchgeführt, je nachdem, ob Lymphknoten vermutlich befallen sind, oder nicht.

Auf die chirurgische Therapie folgt bei größeren Tumoren, metastasierten Tumoren und knappen Resektionen eine adjuvante Radio- oder Radiochemotherapie [22]. Platinbasierte Chemotherapeutika (Cisplatin, Carboplatin) gehören zu den wirksamsten und am häufigsten benutzten Therapien bei HNSCC-Patienten. Die Wirkung der platinhaltigen Medikamente basiert hauptsächlich auf der Hemmung der DNA-Replikation und -Synthese. Das erfolgt durch das Erzeugen von

Quervernetzungen zwischen den DNA-Strängen über die Querverknüpfung von zwei benachbarten Purinbasen eines DNA-Strangs. Dies hemmt wiederum den Zellzyklus, bremst dadurch die Zellteilung und führt zum Untergang der Zellen [24]. Diese Effekte betreffen natürlich nicht nur die Tumorzellen, sondern auch die gesunden Körperzellen. Dies begründet die verschiedenen Nebenwirkungen dieser Therapie.

Das bei HNSCC-Patienten am meisten benutzte Chemotherapeutikum Cisplatin hat trotz der positiven Effekte auch potentielle Nebenwirkungen, die die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigen. Übelkeit und Erbrechen sind zwei der berühmtesten Nebenwirkungen bei platinbasierten Therapeutika und werden trotz der prophylaktischen antiemetischen Medikamente bei fast allen Patienten beobachtet. Des Weiteren kommen noch andere gastrointestinale Nebenwirkungen von Cisplatin wie Durchfälle, ein metallischer Geschmack, Geschmacksverlust, Pankreatitis oder Mukositis verstärkt vor, wenn Cisplatin in Kombination mit anderen Zytostatika kombiniert wird. Hepatotoxizität gehört auch zu den gastrointestinalen Nebenwirkungen von Cisplatin, die zu erhöhten Transaminasen und Billirubinwerten führt. Ototoxizität ist eine der häufigsten Nebenwirkungen von Cisplatin und kann bis hin zum Hörverlust führen [25]. Da Cisplatin zu 90% über die Nieren eliminiert wird, kann es bei 28-36% der Patienten, die Cisplatin als Einzeltherapeutikum in einer Konzentration von 50 mg/m²/Tag erhalten, zu nephrotoxischen Effekten kommen. Eine Hydratation dieser Patienten mit ungefähr 3-6 L Flüssigkeit kann das Risiko einer Nephrotoxizität verringern. Weitere unerwünschte Nebenwirkungen von Cisplatin sind die Cardio- und Neurotoxizität, okuläre Toxizität, Myelosuppression und eine Störung der Elektrolytenkonzentrationen [26]. Andere Mitglieder dieser Familie sind Carboplatin und Oxaliplatin. Carboplatin ist zwar weniger potent, zeigt aber ein milderer Nebenwirkungsprofil als Cisplatin [22].

Ein anderes Problem der platinbasierten Chemotherapeutika neben den häufigen Nebenwirkungen ist die mögliche Resistenzentwicklung der Tumorzellen. Die Resistenz kann an einem erniedrigten Influx und gleichzeitig erhöhten Efflux liegen, welche zu einer geringen Akkumulation des Therapeutikums im Zellinneren führen. Ein anderer Möglicher Grund für die Resistenz ist eine Änderung in den DNA-Reparaturmechanismen der Zellen [24].

Das von Patient zu Patient unterschiedliche Therapieansprechen und das Nebenwirkungspotential erschweren die Therapie signifikant. Auf den Zellen von mehr

als 90% der HNSCC kommt EGFR in großer Dichte vor, was wiederum mit einer schlechteren Prognose verbunden ist [16, 27]. Allerdings bietet dies die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie. Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der als Anti-EGFR bei metastasierten oder rezidivierenden HNSCCs angewendet wird. Eine Kombination aus Cetuximab und Chemo- oder Radiotherapie verbessert das Ansprechen und erhöht sogar die rezidivfreie Überlebensrate im Vergleich zur alleinigen Chemo- bzw. Radiotherapie [16]. Das extreme Schema wird als Erstlinientherapie bei fortgeschrittenen und metastasierten HNSCC-Tumoren eingesetzt. Dieses Schema besteht aus einer Polytherapie mit Cetuximab, 5-Fluorouracil und einem platinbasierten Chemotherapeutikum. Allerdings werden andere Kombinationstherapien wie die Kombination eines platinbasierten Chemotherapeutikums mit Cetuximab und einem Taxan erprobt. Diese haben höhere Wirksamkeit und mildere Toxizität gezeigt [28, 29].

Vielversprechend für die Zukunft ist die Checkpoint-Immuntherapie. Sie beruht auf der Induktion und Förderung der Immunzellen des Patienten, so dass die Tumorzellen nicht mehr entweichen können. Das erfolgt durch die Hemmung der Checkpoints des Immunsystems. Diese bremsen die Aktivität des Immunsystems. Deren Hemmung führt also zu einer verstärkten Tumorbekämpfung [30, 31]. PD-L1 ist bei 50-60 % aller HNSCCs vor Tumorbehandlung zu finden. Daher wird die Anti-PD-L1-Therapie der rezidivierenden und sich metastasierenden Tumoren in den nächsten Jahren an Bedeutung gewinnen [16]. Beispiele für diese Therapeutika, die bei HNSCC-Patienten eingesetzt werden, sind Nivolumab und Pembrolizumab als Monotherapie oder kombiniert mit 5-FU und einem platinbasierten Chemotherapeutikum kann Pembrolizumab bei der Therapie von fortgeschrittenen und metastasierten HNSCCs eingesetzt werden [32]. Die Kombination von Chemotherapie und Checkpoint-Inhibitoren bei den HNSCC-Patienten zeigte eine bessere Prognose, aber auch eine erhöhte Toxizität [32, 33].

In der sogenannten Zweit- und Drittlinientherapie, also einer erneuten Therapie bei Rezidiv oder Progress des Tumorgeschehens, können auch Methotrexat, 5-Fluorouracil und Taxane Teil des Therapieschemas bei HNSCC sein [27].

Primär und adjuvant werden HNSCC-Patienten auch mit fraktionierter Radiotherapie behandelt. Eine Totaldosis von bis zu 70 Gy wird in Fraktionen von jeweils 2 Gy täglich eingesetzt [16]. Auch bei der Radiatio gilt es, wichtige Organe in der Umgebung so

weit wie möglich zu schonen. Aus diesem Grund wird die Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) für eine bessere Therapiepräzision bei HNSCC-Patienten eingesetzt. Mittels dieser Radiotherapietechnik kann eine hohe Dosis am Zielbereich appliziert werden, ohne viel gesundes Gewebe um den Tumor zu schädigen. Einige randomisierte Studien haben eine niedrigere Inzidenz der Xerostomie nach IMRT zeigen können, verglichen mit der konventionellen Radiotherapie [16].

Da der Verlauf und das Outcome der HPV-positiven OPSCCs sich von denen der HPV-negativen HNSCCs unterscheiden, können auch die Therapieschemata der beiden Tumortypen variieren. Beispielsweise haben kleine HPV-positive OPSCCs mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 82,4 % eine deutlich günstigere Prognose als HPV-negative OPSCCs mit 57,1 % [16]. Versuche, die Therapie bei HPV-assoziierten OPSCC zu deeskalieren, sind bislang gescheitert und haben zu einem schlechteren Outcome bei den Patienten geführt [34]. Ein HPV-positives OPSCC der Größe c/pT1 kann durch alleinige Resektion mit Sicherheitsabstand, und bei fehlenden Möglichkeiten für Sicherheitsabstand durch eine knappe Resektion mit adjuvanter Radiochemotherapie oder durch primäre Radiochemotherapie mit kurativer Intention behandelt werden. Wegen der guten Erfahrungen mit Cisplatin bei HPV-OPSCC würde das Medikament meistens zum Einsatz kommen. Die Datenlage zur Steigerung der Wirksamkeit der Radiotherapie durch zusätzliche Gabe von Cisplatin ist bei HPV-positiven und -negativen Tumoren gut, bei HPV-OPSCC etwas besser [16]. HPV-negative HNSCCs reagieren weniger sensitiv auf die Radiochemotherapie. Das liegt wahrscheinlich an Mutationen in den Tumor-Suppressor-Genen, die durch Nikotin- und Alkohol-Abusus auftreten [3].

Zur Optimierung der Ergebnisse und Erhöhung der Ansprechraten werden verschiedene Therapieoptionen, Zeitpunkte der Therapie und Kombinationen mit Radio-Chemotherapien erforscht [35]. Personalisierte Therapieschemata gehören zu diesen Therapieoptionen, allerdings noch als Zukunftsziel. Für die Optimierung personalisierter Therapieschemata wird heute versucht, beispielsweise die DNA der Tumorzellen zu sequenzieren oder auf ihrer Oberfläche die Dichte einiger Liganden für bestimmte histopathologische Marker, wie PD1-Ligand, zu identifizieren [36]. Dennoch macht die hohe Heterogenität der Mutationen in den HNSCC-Zellen diese Aufgabe schwer zu bewältigen.

1.1.4 Klinischer Verlauf und Prognose

HNSCC-Patienten haben eine fünf-Jahres-Überlebensrate von lediglich 50 % (für alle Tumorstadien kombiniert) als Ausdruck einer generell relativ schlechten Prognose [4], zumindest bei fortgeschrittenen Stadien. Rund 380,000 Patienten sterben jährlich an HNSCC [9]. Die großen Fortschritte in den Therapieprotokollen der HNSCCs haben mehrere positive Einflüsse auf die Patienten zur Folge. Beispielsweise haben die modernen Techniken in der chirurgischen Therapie zu einer verbesserten Verträglichkeit und zu erniedrigten Morbiditäts- und Mortalitätsraten geführt. Außerdem trägt die Immuntherapie bei den metastasierten oder fortgeschrittenen Tumoren zu längeren rezidivfreien Intervallen bei [16]. Trotz der modernen fortgeschrittenen multimodalen Therapien erleidet mehr als die Hälfte der HNSCC-Patienten einen Lokal- oder Fernrezidiv [37, 38].

HPV-positive OPSCCs tendieren dazu, besser auf die Radio- und Chemotherapie zu reagieren und haben generell ein besseres Outcome [5]. Die 3-Jahre-Überlebensrate bei HPV-Positiven Patienten liegt bei 82,4 %, während sie bei HPV-Negativität in den meisten Fällen die 60 % nicht überschreitet. Zudem ist die Lymphadenopathie bei HPV-positiven OPSCC im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren gleichen T-Stadiums mit einer besseren Prognose verbunden [16].

Im Laufe der Therapie können die HNSCC-Patienten neben ihrer Krankheit an anderen vielseitigen Problemen leiden. Dies kann die Gesamtprognose und den Verlauf beeinflussen. Die unerwünschten Wirkungen der verschiedenen Therapeutika können den Patienten den Krankheitserlauf erschweren und die Genesung langsamer machen. Außerdem können manche langfristige Folgen der Therapie zu eigenständigen Krankheiten werden, beispielsweise die Kardio- oder Ototoxizität bei den platinbasierten Chemotherapeutika. Des Weiteren können Fernmetastasen, die zu einem späteren Zeitpunkt auftretenden, die Prognose verschlechtern.

1.2 Physiologie der volumen-regulierten Anionen-Kanäle (VRAC)

Der osmotische Druck in den lebenden Zellen ändert sich regelmäßig aufgrund der physiologischen intrazellulären Prozesse [39]. Dabei muss im optimalen Fall ein konstantes Zellvolumen aufrechterhalten werden. Das ist für eine normale Zellfunktion essenziell. Diese Volumenregulation gelingt den Zellen dank der volumen-regulierten Anionen-Kanäle (VRAC) [40]. Diese Kanäle werden auch als Volumen-sensitive Kanäle für organische Osmolyte/Anionen (VSOAC) bezeichnet [41]. Die VRACs bestehen aus Untereinheiten der LRRC8-Proteinfamilie. Die Untereinheit A der LRRC8-Familie (LRRC8A, auch SWELL1) ist dabei unentbehrlich für die Funktion der VRACs. Sie allein kann einen funktionsfähigen Anionen-Kanal bilden [42]. Allerdings braucht sie mindestens eine andere Schwester-Untereinheit wie LRRC8B, C, D oder E zum Bilden eines Volumen-regulierten Anionen-Kanals [43]. Die Zusammensetzung aus den verschiedenen Untereinheiten ist zudem kritisch für die Bildung der VRAC-Poren und hat einen Einfluss auf die Substrat-Spezifität der gebildeten Kanäle [40, 44, 45].

Des Weiteren können die VRACs eine grundlegende Rolle bei der Zellproliferation und Zellmigration, der pH-Modulation, der Apoptose, beim Zentralnervensystem und bei anderen wichtigen physiologischen Prozessen spielen [39, 46-48]. Die VRACs vermitteln einen volumenabhängigen Efflux der Chloridionen, der als *regulatory volume decrease* (RVD) bezeichnet wird [49]. Dies ist essentiell für die Volumenregulation der Zellen. Wenn die Zellen sich im hypotonen Milieu befinden, strömt Wasser durch die wasserdurchlässige Membran in die Zellen und führt zum Anschwellen der Zellen. Darauf reagiert die Zelle mit der Öffnung der VRACs, über welche die Chloridionen und andere Osmolyte ausströmen. Das verursacht einen kontrollierten Abfall des Zellvolumens, der die Zelle vor dem Platzen schützt und die Homöostase der Zelle gewährleistet [46]. Neben den Chloridionen verlassen die Zelle auch Kaliumionen und andere osmotisch aktive Moleküle wie Taurine und Glutamat, welche wiederum einen Wasserausfluss hervorrufen [49]. Dadurch schwillt die Zelle wieder ab. In Zellen mit inhibierten VRACs wurde eine beeinträchtigte Volumenregulation, insbesondere eine Störung des RVDs, beobachtet [50]. Die Abbildung 2 erläutert schematisch die Physiologie der VRACs bei der Zellvolumenregulation und ihre Rolle beim RVD.

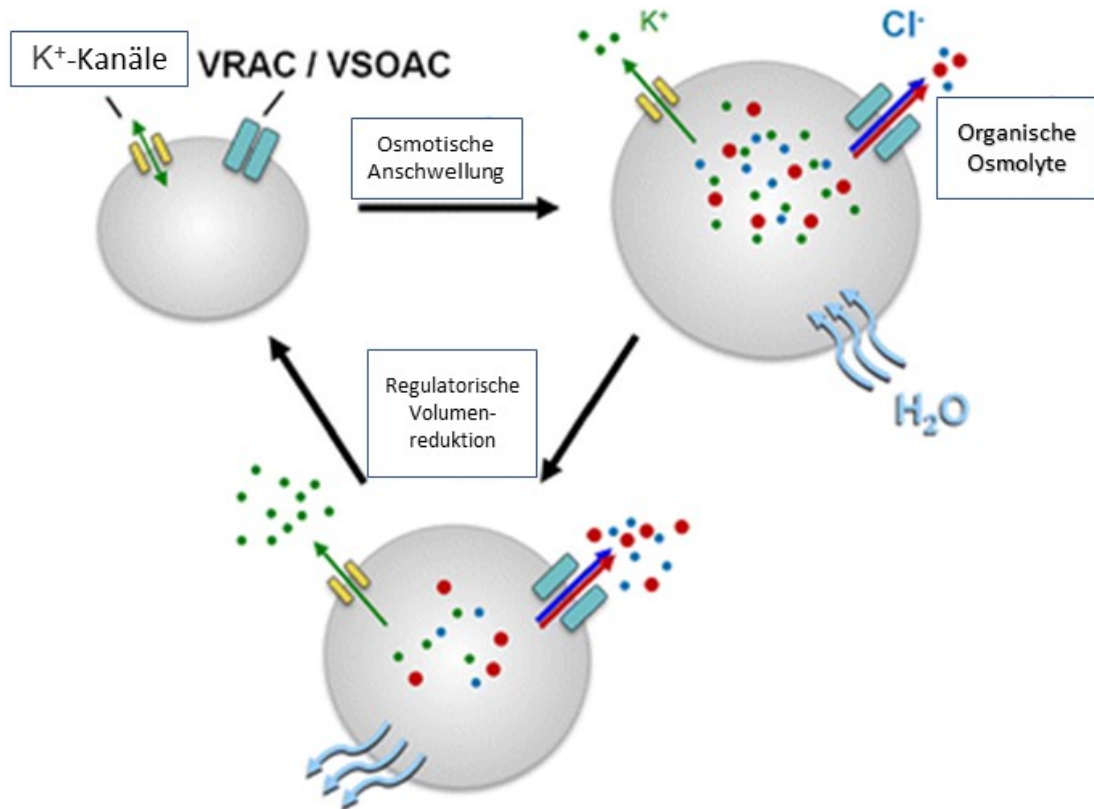


Abbildung 2: Darstellung der VRAC-Funktion [49]. Die Abbildung erläutert die Physiologie der VRACs und ihre Rolle bei der Zellvolumenregulation. Der Ausstrom der Kalium- und Chloridionen über die aktivierten volumenregulierten Kanäle führt zu einer osmotischen Volumenreduktion und damit zur Zellschrumpfung.

Aus LRRC8A-E bestehende VRACs spielen eine wesentliche Rolle beim Transport verschiedener organischer Moleküle. Dazu gehören der second messenger cGAMP, sowie die Chemotherapeutika Cisplatin und Carboplatin [45]. Außerdem gibt es Hinweise, dass die VRACs an der Resistenzentwicklung gegenüber bestimmten Chemotherapeutika, insbesondere den platinbasierten Therapeutika, beteiligt sind [51]. [42]. Nicht nur der Cisplatintransport findet über die VRACs statt, sondern sie tragen auch zur Caspase-3-Aktivierung in den Zellen und zur folgenden Chemotherapie-induzierten Apoptose bei. Damit die Apoptose eingeleitet wird, müssen die volumen-sensitiven Ionen-Kanäle aktiviert werden. Durch den Ausstrom von verschiedenen Ionen kommt es in der Zelle zur osmotischen Volumenreduktion (AVD). Dadurch

schrumpft die Zelle, und die Apoptose wird über die Aktivierung der Caspase-3 eingeleitet [43, 52].

1.3 Rolle der Untereinheit LRRC8A (SWELL1) bei der Resistenzentwicklung gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika

Platinbasierte Chemotherapeutika sind potente Arzneimittel, die bei der Therapie einer großen Gruppe von Karzinomen verwendet werden. Cisplatin, das am meisten benutzte platinbasierte Chemotherapeutikum, entfaltet seine Wirkung über unterschiedliche Mechanismen. Zunächst muss Cisplatin in die Zellen gelangen. Dies erfolgt über die passive Diffusion oder aktiv über mehrere Transportsysteme. Dazu gehören die Transporter der organischen Kationen OCT1–3, und die Kupfertransporter-Rezeptoren Ctr1 und Ctr2, die sowohl Kupfer als auch Platin transportieren [53]. Studien haben weiterhin gezeigt, dass LRRC8A und LRRC8D, als Untereinheiten der VRACs, auch bei der Aufnahme von Cisplatin eine wesentliche Rolle spielen [53, 54]. Chen et al. konnten zeigen, dass die membranöse cGAMP-Synthase in der Aktivierung von VRACs in mit Serum oder TNF behandelten Zellen und damit in der Cisplatinaufnahme involviert ist. Die Behandlung der Tumorzellen mit Serum und TNF konnte die Aufnahme von Cisplatin erhöhen und damit den Zelltod fördern. Allerdings war diese Förderung der Cisplatinwirkung durch TNF oder Serum in der Abwesenheit von LRRC8A invalide. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die LRRC8A sogar die Hauptrolle bei der Cisplatinaufnahme spielt [45].

Neben einem breiten Spektrum an Nebenwirkungen bleibt die Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber platinhaltigen-Chemotherapeutika eine große Hürde in der Krebstherapie. Das Überwinden der Resistenz ist eines der wichtigsten Ziele der modernen Krebsforschung. Davor müssen die Mechanismen, die an der Resistenzentwicklung beteiligt sind, erkannt und nachvollzogen werden. Zwei bekannte Aspekte sind die effizienten DNA-Reparaturmechanismen und der schnelle Abfluss bzw. die schnelle Beseitigung von Cisplatin durch die Zelle über die ATP-abhängigen, Kupfer-transportierenden ATP-asen ATP7A und ATP7B [53].

Planells-Cases et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass LRCC8A eine große Rolle bei der Aufnahme von Cisplatin spielt. Ungefähr 50-70 % der Cisplatinaufnahme erfolgt

über die Untereinheiten LRRC8A und LRRC8D [43]. Es wurde beobachtet, dass die Expression der LRRC8A-Proteine in Zellen der humanen ovariellen Karzinome sogar 18 Stunden nach der Behandlung mit Cisplatin signifikant anstieg [54]. Dennoch wurde bei den cisplatinresistenten Zellen beobachtet, dass die Expression von LRRC8A sehr reduziert war. Die Resistenz gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika kann mit dem Knockout des LRRC8A und mit verminderter Aktivität der VRACs zusammenhängen. Funktionsverlust der VRACs kann außerdem zu einer Hemmung der Apoptose führen, welches höchstwahrscheinlich an einer verminderten AVD und an einer mangelnden Aktivierung der Caspase-3 beruht [55].

Ein anderer Aspekt bei der Cisplatinresistenz ist die Störung der Balance zwischen der Aktivität der apoptischen und der anti-apoptischen Kanäle in den Zielzellen [56]. In den resistenten Zellen wurde eine Herunterregulation der apoptischen Kanäle, wie VRACs und VSOACs, und/oder eine Hochregulation der anti-apoptischen Kanäle, wie die Ca-ATPase, die Na/K-ATPase und der Na/K/2Cl-Cotransporter festgestellt. Das beugt der Zellschrumpfung vor, schützt damit die Zelle vor der Apoptose und macht sie gegenüber dem Therapeutikum resistent [56].

Zudem können die unterschiedlichen genetischen Eigenschaften der Menschen einen Einfluss auf die Sensitivität ihrer Zellen in Bezug auf die Therapie mit Cisplatin haben. Beispielsweise kann ein Polymorphismus in den Genen, die für die DNA-Reparatur und für den Metabolismus oder Transport von Cisplatin zuständig sind, die Effizienz bzw. die Toxizität der Therapie beeinflussen [53]. Daher kann das Erfassen dieser genetischen Variabilität einen Fortschritt in der Definition individualisierter Therapieregime und in der Bestimmung der passenden Cisplatin-Dosis eines jeden Patienten bedeuten.

Die Auswirkung des LRRC8A-Knockouts auf das Ansprechen und die Resistenz der HNSCC-Tumorzellen auf platinbasierten Chemotherapeutika wurde im Rahmen dieser Studie anhand mehrerer Experimente und Assays an den Pica-Zellen (Wildtyp- und Knockout-Zellen) erforscht, und wird im Ergebnissteil dargestellt.

1.4 Die Pica-Zelllinie

Für die Gesamtheit der Versuche dieser Arbeit wurden immortalisierte Zelllinien verwendet. Die Hauptzelllinie war die Pica-Zelllinie. Sie wurde aus einer chirurgischen HNSCC-Biopsie eines Larynxkarzinom-Patienten hergestellt [57]. 95-100 % der Zellen dieser Biopsie zeigten eine starke Expression von EpCAM. Mehrere Verdünnungspassagen wurden durchgeführt, um die Anzahl der Fibroblasten zu vermindern. Die resultierende Zelllinie wurde im Monolayer kultiviert und konnte für Experimente verwendet werden. Die Abbildung 3 stellt die Schritte der Herstellung der Pica-Zelllinie dar.

Für diese Arbeit wurden zwei Zelltypen der Pica-Zelllinie bereitgestellt. Der erste war der Wildtyp (WT) und der zweite ein Knockout-Zelltyp (KO). In den Knockout-Zellen wurde die Expression der Untereinheit LRRC8A der VRACs unterbunden. Die genetische Modifizierung des LRRC8A-Gens in den KO-Zellen erfolgte mittels *CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), und CRISPR-associated systems (Cas))*. CRISPR/Cas9 ist eine molekularbiologische genmodifizierende Methode, mit der die DNA gezielt verändert werden kann [58, 59]. Es können komplette Gene oder Nukleotide eingefügt oder entfernt werden. Diese Technik beruht auf einem bakteriellen Abwehrmechanismus gegen Virusinfektionen. Das Protein Cas9 ist eine bakterielle Endonuklease, die eine kurze RNA-Sequenz bindet. Diese RNA-Sequenz kann bestimmen, wo dieses Enzym die virale DNA schneidet, um sie unschädlich zu machen. Die RNA-Sequenz des Cas9-Proteins konnte künstlich hergestellt und variiert werden. Dadurch konnte genau bestimmt werden, wo die DNA geschnitten werden soll und welche Gene gezielt ausgeschaltet oder ausgetauscht werden [60].

Zudem wurde aus den beiden Zelltypen jeweils ein Einzelzellklon isoliert, und zwar aus der Wildtyp-Zelllinie der Klon WT4 und aus der Knockout-Zelllinie der Klon KO36. Der Knockout des LRRC8A-Gens und die Isolierung beider Zellklonen wurden vor der Verwendung der Zellen auf DNA- und RNA-Ebene überprüft. Die beiden Zelltypen und die Einzelzellklone wurden nach der Überprüfung für diese Arbeit bereitgestellt und die Versuche konnten daran durchgeführt werden.

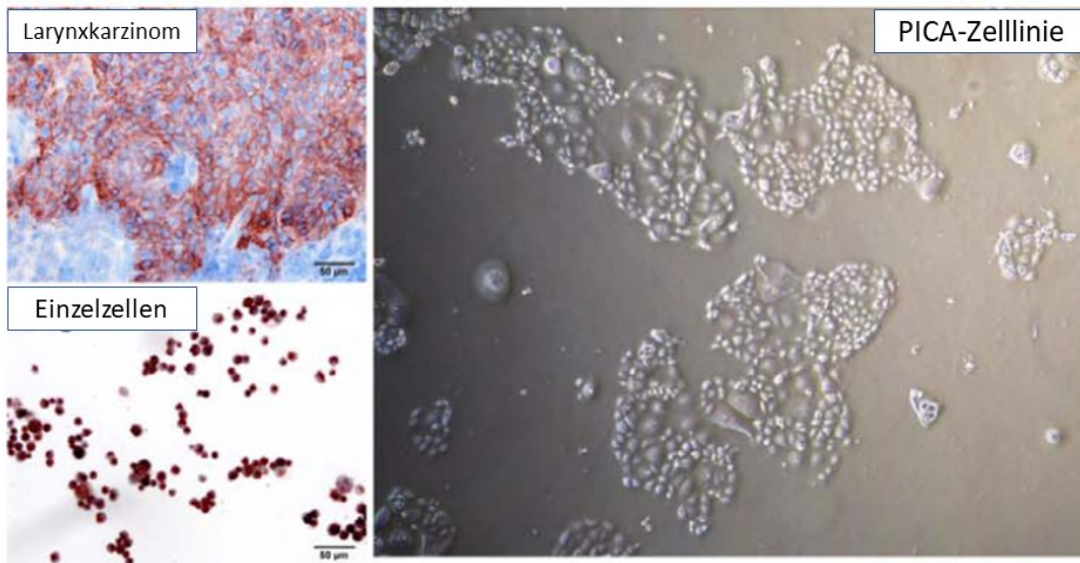


Abbildung 3: Biopsie eines Larynxkarzinoms (links oben). Einzelzellen aus derselben chirurgischen Biopsie (links unten) zeigen eine stark positive Expression von EpCAM. Die Pica-Zelllinie als Monolayer-Zellen in Kultur (Rechts) [43].

1.5 Die dreidimensionale Zellkultur

Zellkultursysteme sind wichtige Methoden in der experimentellen Forschung. Die zahlreich vorhandenen humanen Zelllinien erlauben die Beobachtung vieler physiologischer Vorgänge, die sonst *in vivo* schwer zu studieren sind. Außerdem kann das Verhalten der Zellen unter konstanten Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, O₂- und CO₂-Partialdruck) und ohne physiologische Einflüsse der unterschiedlichen humanen Körpervariationen untersucht werden [61].

Die verbreitete zweidimensionale Zellkultur ist bekannt für ihre Zuverlässigkeit, einfache Anwendungsart und ihre reproduzierbaren Ergebnisse. Allerdings können zweidimensionalen Kulturmodelle viele Eigenschaften der Tumore *in vivo* und die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellarten nicht reflektieren [62]. Die dreidimensionale Zellkultur kann eine wichtige Ergänzung zu den etablierten Methoden und zu zweidimensionalen Zellkulturmodellen sein, da sie solide Tumore entstehen lässt und Zell-Zell-Interaktionen und Sauerstoffversorgung besser abbildet. Die Anwendung des dreidimensionalen Zellkultursystems gewinnt durch diese realitätsnähere Darstellung der Gewebe an Bedeutung [63, 64]. Dreidimensionale

Modelle können zur Erprobung der verschiedenen Patientenreaktionen auf die Therapeutika und zur Erarbeitung und Entwicklung neuer patientenorientierter Therapieregime verwendet werden [36, 65]. Die Forschung an diesen Tumorkonglomeraten bietet eine Annäherung an die Interaktionen zwischen den Tumorzellen und der Mikroumgebung und an die physiologische Reaktion der Tumorzellen im Körper der Patienten. Tumorsphäroide ähneln dem Tumorgewebe *in vivo* in ihrer Form, ihrem Wachstumsverhalten, ihrer Genexpression, ihrer Nährstoffverteilung und ihrem Ansprechen auf die Therapie und erlauben damit eine bessere Beurteilung der verschiedenen Therapieregime *in vitro* vor dem Beginn mit einer patientenorientierten Behandlung [66]. Dank der Tumorsphäroide können außerdem die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Therapeutika *in vitro* getestet werden [67]. Dieses Modell kann eine vielversprechende, mit weniger Kosten verbundene Alternative werden, die zu einer Reduktion der Anzahl an Tierexperimenten führen kann [68].

Um ein besseres Verständnis für die Charakteristika und Besonderheiten der Sphäroide zu erhalten, muss erst ihre Geometrie berücksichtigt werden. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der Sphäroide und die verschiedenen Schichten, aus denen ein Sphäroid besteht.

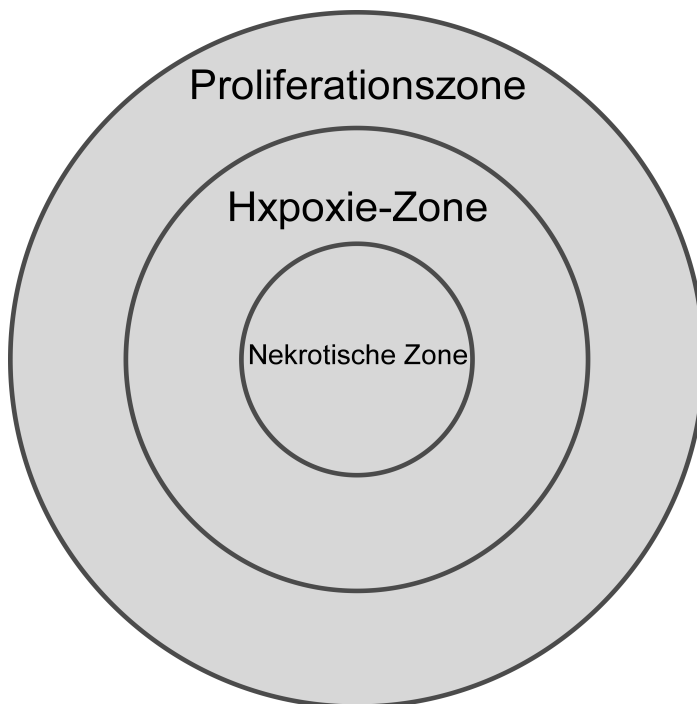


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Sphäroids (Verändert nach [67]). Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung eines Querschnitts in einem Sphäroid mit seinen drei Schichten. Der Gradient von Nährstoffen, Sauerstoff und ATP sinkt von der Proliferationszone bis zur nekrotischen Zone, was die höhere Proliferationsrate in der äußeren Schicht begründet. Die Konzentration des Therapeutikums verhält sich genauso.

Die Sphäroide können zwar das Verhalten der Tumore *in vivo* besser reflektieren als die zweidimensionalen Modelle, sie verfügen aber im Gegensatz zu den Tumoren *in vivo* nicht über ein Gefäßsystem für die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Tumorsphäroide erhalten ihre Nährstoffe von dem umgebenden Nährmedium über Diffusion. Aus diesem Grund nehmen der Sauerstoffgradient und die Konzentration der Nährstoffe von der äußeren zur inneren Schicht ständig ab. Das beeinflusst wiederum die Proliferationsrate der Zellen. Die Zellen der äußeren Schicht haben eine hohe Proliferationsrate und das ist die namensgebende Eigenschaft dieser Zone. Sauerstoffmangel in den nächsten zwei Schichten führt zum oxidativen Stress und erhöht die Konzentration der freien Radikale. Das bremst bzw. stoppt die Proliferation der Zellen in der zentralen Schicht und verursacht deren Nekrose. Das imitiert die Situation innerhalb der Tumore *in vivo*, unterscheidet aber die Sphäroide stark von den zweidimensionalen Modellen, die im Monolayer wachsen und gleichmäßig versorgt werden [69]. Die Hypoxie in der zentralen Schicht macht das Sphäroid robuster gegenüber 5-Fluoruracil und Cisplatin [67].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das onkologische Ansprechen der Tumore auf die medikamentöse Therapie, meist in Kombination mit Radiatio, ist sehr unterschiedlich. Dies erschwert die Behandlung von vielen Tumorpatienten, insbesondere HNSCC-Patienten. Bisherige Expressionsstudien von HNSCCs haben eine überdurchschnittlich hohe Heterogenität in Bezug auf Genexpression gezeigt, sodass nicht auszuschließen ist, dass einzelne Expressionsmuster für die unterschiedlichen Ansprechraten mitverantwortlich sind. LRRC8A stellt eine entscheidende und konstituierende Komponente der VRACs dar [42, 45]. Neben ihrer Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase werden mit der fortschreitenden Forschung andere vielseitige Aufgaben entdeckt. LRRC8A ist bekanntermaßen am zellulären Influx von Cisplatin beteiligt, und könnte maßgeblich an der Resistenzentwicklung gegenüber platinhaltiger Chemotherapie mitbeteiligt sein [43].

Die genauen Mechanismen der Resistenzentwicklung bei HNSCC-Patienten sind noch nicht vollständig erforscht. Diese Studie beschäftigt sich mit der Bedeutung der Expression von LRRC8A-Gen und seine Effekte auf das Therapieansprechen einer HNSCC-Zelllinie sowie auf die Resistenzentwicklung gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika. Dies erfolgt *in vitro* mithilfe von immortalisierten Zelllinien. Die Analyse der Folgen eines LRRC8A-Knockouts könnte wichtige Informationen zur Verbesserung der Therapie von HNSCC-Patienten, insbesondere mit platinhaltigen Chemotherapeutika, liefern.

Im Rahmen dieser Studie wird die Auswirkung von LRRC8A auf die Proliferation der Tumorzellen untersucht. Dies wird im Rahmen dieser Arbeit anhand des *wound healing assays* überprüft. Die Erkenntnisse aus diesem Bereich könnten als ein Ansatzpunkt für ein besseres Verständnis des Proliferationsverhaltens von Karzinomzellen *in vivo* dienen.

Bei der Studie soll auch ein etabliertes dreidimensionales *in vitro* Kultursystem zur Therapietestung eingesetzt werden. Hierzu wird die Mehrheit der Assays jeweils an Monolayer-Zellen und an Tumor-Sphäroiden durchgeführt. Die Forschung an diesen dreidimensionalen Tumorkonglomeraten ermöglicht eine Beobachtung der komplexen Tumoreigenschaften, da Sphäroide den Karzinomen *in vivo* ähnlicher als Monolayer-Zellen sind. Außerdem hat der Vergleich zwischen den Ergebnissen der zwei- und dreidimensionalen Zellkultursysteme einen hohen Stellenwert. Es sollte untersucht

werden, ob beide Kultursysteme gleiche Aussagen über das Therapieansprechen und die Resistenzentwicklung ermöglichen.

Zwei platinhaltige Chemotherapeutika werden für die Experimente eingesetzt: Cisplatin und Carboplatin. Die Durchführung der Experimente mit beiden Chemotherapeutika sollte Auskunft darüber geben, ob sie beide die Tumorzellen gleichermaßen beeinflussen, sowie ob der LRRC8A-Knockout unterschiedliche Effekte je nach Chemotherapeutikum erzeugt.

Weiterhin sollte analysiert werden, inwieweit die Ergebnisse dieser Studie für die Patientenversorgung relevant sind. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit können einen weiteren wichtigen Schritt auf dem Weg zu personalisierten und patientenorientierten Therapieschemata darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Liste allgemeiner Verbrauchsmaterialien

| Name | Hersteller | Ort |
|---|-----------------------------|---------------|
| Deckgläser | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |
| Einmalpipetten | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Kulturschälchen für Fluoreszenzmikroskopie | MatTek | USA |
| Nitrocellulose Blotting Membran | GE Health Care Life Science | Freiburg |
| Objektträger | Diagonal | Münster |
| Pipettenspitzen | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Polypropylen-Reaktionsgefäße 15ml/50 ml | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml/1,5 ml/2 ml | Eppendorf | Hamburg |
| Verpackungsfolie | Sarogold | Rorschach |
| Whatman-Filterpapier | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |

2.1.2 Geräte

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller | Ort |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------|------------|
| Autoklav | 5050 ELV | Tuttnauer | Breda |
| ChemiDoc | MP Imaging System | Bio-Rad Laboratories GmbH | München |
| Einfrierhilfe | CoolCell | Biocision | USA |
| Elektrophorese- Kammer Protein | Elektrophoresesystem | Bio- RadLaboratories GmbH | München |
| Falkonzentrifuge | Heraeus Multifuge | Thermo Scientific | Tuttlingen |

| | | | |
|-------------------------------|---|---|---------------------------------|
| | 1L-R | | |
| Gefrierschrank- 80° C | Hera freeze | Heraeus Holding GmbH | Hanau |
| Gelgießstand | Gel-Gießschiene | Bio-Rad Laboratories GmbH | München |
| Heizblock | Thermomixer F 1.5 | Eppendorff GmbH | Wesseling |
| Kühlzentrifuge | Biofuge firesco | Heraeus Holding GmbH | Hanau |
| Magnetrührer | Ikamag RCT | Ika | Staufen |
| Mikroskope (Fluoreszenz) | Nikon Eclipse TE2000-U AxioVert 200M | Nikon GmbH Zeiss | Düsseldorf Jena |
| Mikroskopie-Slide | 15µ-Slide 8well ibiTreat | Ibidi | München |
| Mikroskop-Zellkultur | Nikon TMS | Nikon GmbH | Düsseldorf |
| Pipettenspitzen | EpTIPS PhysioCare concept | Eppendorff GmbH | Wesseling |
| Schüttler | WS 10 Rocker 2d digital 3D Rocking Shaker | Edmung Bühler GmbH IKA StarLab | Hechingen Staufen Hamburg |
| Sterilbank | Hera Safe | Heraeus Holding GmbH | Hanau |
| Stickstoff-Tank | GT 38 | Omnilab AG | Mettmenstetten |
| Stromgeber | Power Pac | Bio-Rad Laboratories GmbH | München |
| Tischzentrifuge | Mikro 120 Heraeus PICO 17 Centrifuge | Andreas Hettich GmbH & Co KG Thermo Electron Corporation | Tuttlingen Dreieich |
| Turbo-Blotter | Trans-Blot Turbo Transfer System | Trans-Blot Turbo Transfer System | München |
| Ultraschall- Homogenisator | Sonoplus HD 2070 Sonoplus mini20 | Bandelin | Berlin |
| Vortexer | VWR VV3 REAX 2000 | VWR Int. GmbH Heidolph | Darmstadt Schwabach |
| Waage | ABT 120-SDM | Kern & Sohn GmbH | Balingen |
| Wasserbad | Polystat CC3 | P.Huber Kältemaschinenbau GmbH | Offenburg |

| | | | |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------|
| Zählkammer | Neubauer Zählkammer | Karl Hecht „Assistent“ GmbH | Altnau TG |
| Zellkulturbrutschrank | Hera Cell | Heraeus Holding GmbH | Hanau |
| Zellzähler | CASY 1TT | Innovatis | Reutlingen |
| Zellzentrifuge | Cytospin Universal 16R | Hettich | Tuttlingen |
| Zentrifugenröhrchen | Rotilabo | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |

2.1.3 Software

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Software-Programme

| Software | Entwickler | Ort |
|----------------------------|-------------------------------------|--|
| Canvas | ACD Systems | Victoria, British Columbia, Canada |
| EndNote X9.3.1 for Windows | Clarivate Analytics | Philadelphia, USA |
| GraphPad Prism 5 ® | Graph Pad Software | La Jolla, CA; USA |
| Image J | National Institutes of Health (NIH) | Bethesda, PA, USA |
| Microsoft Office 2019 | Microsoft Deutschland GmbH | Unterschleißheim |

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 9: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller | Ort |
|----------------------------|----------------------|-----------|
| Acrylamid (Rotiphorese 30) | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |
| Agarose | Invitrogen GmbH | Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck | Darmstadt |
| Ampicillin | AppliChem GmbH | Darmstadt |
| Bovines Serumalbumin | AppliChem GmbH | Darmstadt |

| | | |
|--|----------------------------|-----------------|
| BSA 100x | New England Biolabs Inc. | Ipswich |
| CellTiter-Glo® puffer | Promega | Walldorf |
| CellTiter-Glo® Reagenz | Promega | Walldorf |
| CellTiter-Glo® 3D Reagenz | Promega | Walldorf |
| CellTrace CFSE | ThermoFisher Scientific | Tuttlingen |
| ECL, ECL/Plus | Amersham Bioscience | Buckinghamshire |
| Entwickler-Lösung | Imagine Medical | Sierra Blanca |
| Ethanol | AppliChem GmbH | Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Sigma Aldrich Chemie GmbH | München |
| Ethylendiamintetraacetat | Sigma Aldrich Chemie GmbH | München |
| Fetales Kälberserum | Gibco, Invitrogen GmbH | Karlsruhe |
| Fixierer | Imagine Medical | Sierra Blanca |
| Glycin | AppliChem GmbH | Darmstadt |
| Größenstandard, Protein | peqlab Biotechnologie GmbH | Erlangen |
| HCL, rauchend | Merck KG aA | Darmstadt |
| Hoechst 33342 | Sigma Aldrich Chemie GmbH | München |
| Isopropanol | Fisher Scientific GmbH | Schwerte |
| L-Glutamin | Gibco, Invitrogen GmbH | Karlsruhe |
| Magermilchpulver | AppliChem GmbH | Darmstadt |
| Methanol | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |
| Natriumcitrat | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |
| Paraformaldehyd | Serva Elektrophoresis GmbH | Heidelberg |
| PBS, steril | Gibco, Invitrogen GmbH | Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco, Invitrogen GmbH | Karlsruhe |
| ReBlotplus strong 10x Stripping | Chemicon International | Hofheim |
| Rotiblock | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |
| Sodiumdodecylsulfat | Carl Roth GmbH&Co KG | Karlsruhe |
| Tetramethylethylendiamin TEMED | Serva Elektrophoresis GmbH | Heidelberg |
| TGX Stain-free fast Cast Acrylamide Kit | Bio-Rad Laboratories GmbH | München |
| Tris | Neolab | Heidelberg |
| Trypsin LE Express | Gibco by Life Technologies | Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA | Gibco, Invitrogen GmbH | Karlsruhe |
| Tween20 | AppliChem GmbH | Darmstadt |

2.1.5 Zellkultur

Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

| | |
|------|--|
| PBS | 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 7.4 |
| EDTA | 0,5 M, pH 8,0 |

Medium und Zusätze

Tabelle 11: Übersicht der Kulturmedien

| Medium | Beschreibung | Zusätze | Verwendung | Hersteller |
|--------|--|--|-------------------------------------|--------------------------------|
| DMEM | Glukose 4500mg/l, Na-Pyruvate, ohne L-Glutamine | 10% FCS 1% Pen/Strep 1% Glutamin | Zellpassage und Erhaltungskultur | Gibco (Karlsruhe) #21969 |

Kulturgefäße

Tabelle 12: Liste der verwendeten Kulturgefäße

| Kulturgefäß | Hersteller | Ort |
|---------------------------------------|----------------------|---------------|
| Culture-Insert 2 Well in µ-Dish 35 mm | Ibidi GmbH | Gräfelfing |
| 96/48/24/12/6-Well Platten | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| 96-Well-Sphäroid-Mikroplatten | Corning GmbH | New York |
| 96-Well-Platte Flat White | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Kulturflaschen 25/75/175 | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |
| Petrischalen 10cm | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen |

2.1.6 Verwendete Zelllinien

Für die Experimente wurden humane Zellen aus der Pica-Zelllinie verwendet. Diese immortalisierte Zelllinie wurde aus primären HNSCC-Zellen von Patientenbiopsien hergestellt [70]. Außerdem wurden von BRAIN AG Knockout-Zellen aus der Pica-Zelllinie für die Experimente bereitgestellt. In diesen Zellen wurde das LRRC8A-Gen mittels CRISPR/Cas9 ausgeschaltet.

Die Klone Pica-Wildtyp 4 und Pica-Knockout 36 wurden vom Labor bereitgestellt.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Zelllinien

| Zelllinie | Ursprung | Medium/Passage |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Pica-Wildtyp | Humane HNSCC-Biopsat [57] | DMEM+++, dreimal pro Woche 1:6 |
| Pica-Knockout | Humane HNSCC-Biopsat [71, 72] | DMEM+++, dreimal pro Woche 1:6 |
| Klon Pica-WT 4 | Humane HNSCC-Biopsat [71, 72] | DMEM+++, dreimal pro Woche 1:8 |
| Klon Pica-KO 36 | Humane HNSCC-Biopsat [71, 72] | DMEM+++, dreimal pro Woche 1:8 |

2.1.7 Verwendete Antikörper

Tabelle 14: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper

| Antikörper | Spezies | Eigenschaft | Hersteller | Verwendung |
|------------|-----------|-------------|------------|--------------|
| GAPDH | Maus | Monoklonal | Santa Cruz | 1:3000 |
| LRRC8A | Kaninchen | Polyklonal | Abcam | 1:500-1:1000 |
| LRRC8A | Kaninchen | Polyklonal | Novus Bio | 1:100-1:2000 |

Tabelle 15: Zusammenstellung der verwendeten Sekundärantikörper

| Antikörper | Spezies | Eigenschaft | Hersteller | Verwendung |
|------------|---------|-------------|------------|------------|
| Kaninchen | Ziege | HRP | Santa Cruz | 1:5000 |
| Maus | Ziege | HRP | Santa Cruz | 1:5000 |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zellen langfristig lagern

Zellvorräte müssen regelmäßig angelegt werden, damit dauerhaft ein genügend großes Reservoir gesichert ist, auf das z.B. bei nachlassender Zellqualität nach vielen Passagen in der Zellkultur oder im Falle eines Pilzbefalls zugegriffen werden kann. Die Zellen können im Stickstofftank bei ungefähr -173°C jahrelang gelagert werden. Die Restzellen nach der Zellkultivierung werden zentrifugiert und in einem fetalen Kälberserum (FCS) resuspendiert. 10%iges DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) wird zugegeben, was den osmotischen Wert intrazellulär erhöht, die Gefrierschwelle erniedrigt und die Bildung von Eiskristallen und damit die Beschädigung bzw. Zertrümmerung der Zellen während des Gefriervorgangs verhindert. DMSO ist allerdings ein potentes Zellgift, deswegen sind eine schnelle Bearbeitung und ein möglichst rascher Transport von großer Bedeutung. Für eine gelungene Anpassung der Zellen an die kühle Umgebung im Stickstofftank, werden die Zellen erst bei circa -80°C gelagert, und dafür um 1°C pro Minute heruntergekühlt.

Zellen auftauen

Die Zellen werden aus den im Stickstofftank eingefrorenen Zellstocks aufgetaut und in Kultur genommen. Die eingefrorenen Zellen werden in 37°C warmem Wasser schnell aufgetaut, und mit 5 ml Medium in ein Falcon überführt. Der Inhalt des Falcons wird bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, und das Pellet mit 6 ml Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt. Die Kulturflasche wird zur Vermeidung von Verwechslungen mit dem Datum und dem Namen der Zelllinie beschriftet und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Allgemeine Zellkultur

Die Zelllinien, die für die Experimente verwendet werden, müssen in Kultur gehalten werden. Dafür werden die mit Medium versorgten Zellen in Kulturflaschen kultiviert und während ihres Wachstums im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 aufbewahrt. Dabei muss eine Kontamination der Zellen vermieden werden. Das gelingt durch das Anziehen von Handschuhen und einem sauberen Laborkittel, das Desinfizieren der Hände vor dem Arbeitsbeginn und die Ausführung aller Schritte der Zellkultur auf der

sterilen Werkbank. Die Zellen werden während ihres Wachstums regelmäßig unter dem Mikroskop beobachtet, um jegliche unerwünschte Veränderungen frühzeitig zu merken und rechtzeitig angemessen darauf zu reagieren. So werden die Vitalität, die Konfluenz oder die Zelldichte der Zellen sowie ein möglicher Befall beobachtet.

Die Pica-Zellen wurden nach Kontrolle der Zelldichte ungefähr alle zwei Tage gesplittet, um ein regelmäßiges Wachstum zu gewährleisten und eine Wachstumshemmung durch eine zu hohe Zelldichte zu verhindern. Das verbrauchte Medium wird abgesaugt, und die Zellen mit 6 ml PBS gewaschen, um die toten Zellen zu entfernen. Nach Absaugen des PBS werden die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturflasche mittels 0,5-1 ml Trypsin abgelöst. Die mit Trypsin behandelten Zellen werden auf der Heizplatte bei 37° C 3 bis 6 Minuten inkubiert, bis die proteinspaltende Wirkung des Trypsins eingetreten ist. Danach wird frisches, auf 37° C vorgewärmtes Medium hinzugefügt, um die Wirkung des Trypsins zu stoppen. Das nötige Zellvolumen wird von der alten Kulturflasche in eine neue überführt, und die Flasche wird mit einer Menge frischen Mediums befüllt, sodass das Richtvolumen der Kulturflasche erreicht wird (6 ml für kleine T25 Zellkulturflaschen).

Zellen zählen

Bevor die Zellen für die Experimente kultiviert werden, müssen sie gezählt werden. Das erfolgt mithilfe des Casy, einem automatischen Zellzähler und -analysator. Eine andere Methode zur Zellzählung ist die manuelle Zählkammer von Neubauer.

Das Gerät muss vor der Messung auf das passende Programm für die zu zählenden Zellen eingestellt werden. Eine Zellprobe von 50 µl wird in 10 ml der isotonischen Salzlösung Casyton verdünnt und durch Invertieren gut gemischt. Das Casy misst dann die Anzahl der Zellen pro Milliliter und berücksichtigt bei dieser hochauflösenden Messung die Vitalität der Zellen. Das Gerät ermittelt auch Informationen über Debris, Zellvolumen und Zellaggregation.

Nachdem das Casy das endgültige Ergebnis für die Zellzahl pro Milliliter errechnet hat, kann durch die folgende Formel das Zellvolumen berechnet werden, das gebraucht wird, damit die Zellprobe die benötigte Zellzahl enthält.

$$\text{Das benötigte Volumen} = \text{gewünschte Zellzahl} \div \text{Zellzahl pro Milliliter}$$

Eine andere Messmethode ist die manuelle Zellzählung mittels der Neubauer-Zählkammer. Diese Zählkammer ist eine 30 mm x 80 mm messende Glasplatte, die etwa 5 mm dick ist und aus mehreren quadratischen Feldern besteht. Die mittleren Felder werden für die Zellzählung und die seitlichen für die Beschriftung verwendet. Der mittlere Steg ist gekennzeichnet durch Markierungen, die die eigentlichen Zählquadrate bestimmen. Die Zählkammern sind in der Grundplatte eingraviert. Auf sie kommt noch eine Deckscheibe, die die eigentliche Kammerhöhe bestimmt. Nach Reinigung der Zählkammern von Restzellen und Fusseln und nach dem korrekten Aufsetzen der Deckscheibe werden ungefähr 5 µl der Zellsuspension seitlich in die Zählkammer pipettiert. Damit die Zellen, die an dem Gitter liegen, nicht doppelt gezählt werden, entscheidet man vor der Zählung, welche Linien der 4 Eckquadrate berücksichtigt werden. So werden die Zellen im Quadrat und auf den linken und oberen Linien gezählt. Die Ergebnisse der einzelnen Quadrate werden addiert und durch vier geteilt, um den Mittelwert der Zellzählung zu erhalten.

Mithilfe der folgenden Formel wird dann die Anzahl der in der Probe vorhandenen Zellen berechnet.

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{Faktor Zellzählung} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Zählkammer}}{\text{Probenanzahl} \times \text{Faktor Volumenanteil}}$$

Dreidimensionale Zellkultur

Für die dreidimensionale Zellkultur werden spezielle Kulturgefäße mit einer besonderen Oberfläche benötigt. Diese Kulturplatten verhindern die Adhäsion der Zellen an der Plattenoberfläche und erleichtern die Formation der Sphäroide. Für das Aussäen der Sphäroide werden im Vergleich zur konventionellen Monolayer-Kultivierung wenige Zellen gebraucht. Nach dem Zellzählen werden 1000 Zellen in jedes Well einer 96-Well-Low-Adhesion-Platte pipettiert. Die Platte wird dann über 3 Tage bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert, bis die Sphäroide sich gebildet haben. Die Sphäroide können unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Nach 72 Stunden sind sie sogar mit dem bloßen Auge zu sehen. Ab 72 Stunden können die Sphäroide mit verschiedenen Konzentrationen platinbasierter Chemotherapeutika behandelt werden. Der Einfluss der Behandlung auf das Wachstum der Sphäroide wird mit unbehandelten Kontroll-Well verglichen. Für ein bildbasiertes Monitoring des

Sphäroidwachstums ist das automatisierte High-Content-Mikroskop ArrayScan VTI (Thermo Scientific) geeignet (siehe Abbildung 5). Damit lassen sich das mittlere Objekt-Volumen (MOV), die mittlere Objekt-Fläche (MOA) und die mittlere Objekt-Totalintensität (MOT) messen. Außerdem können die Sphäroide für andere Assays wie den *luminescent cell viability assay* genutzt werden.



Abbildung 5: Thermo Scientific ArrayScan VTI, automated high content screening microscope. (Bild: Thermofisher.com)

2.2.2 Wound healing assay

Der *wound healing assay* ist eine Methode zur Analyse der Migration von Tumorzellen *in vitro*. Der Assay erlaubt Rückschlüsse auf die Wachstumsgeschwindigkeit und das Migrationsverhalten der Tumorzellen. Die Analyse erfolgt durch den Vergleich verschiedener Zelllinien mit oder ohne Behandlung.

Zellen werden in bestimmte, für diesen Assay geeignete Kulturschälchen ausgesät. Diese Kulturschälchen werden *2-wells-culture-inserts* genannt und sind in Abbildung 6 dargestellt. Sie bestehen aus 2 Wells, die durch eine abnehmbare Silikone-Wand voneinander getrennt werden. Diese Trennwand formt einen zellfreien Raum. Jedes Well hat eine Volumen-Kapazität von 70 μ l. 500000 Zellen werden in die zwei Wells ausgesät und über mindestens 24 Stunden im Inkubator bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert, bis eine konfluente Zellschicht entsteht. Danach wird die Konfluenz der Zellen unter dem Mikroskop überprüft und das Culture-Insert wird mit einer sterilen Pinzette entfernt. Dadurch entsteht ein artifizielles, zellfreies Areal zwischen den beiden Wells. Als Nächstes muss sichergestellt werden, dass die Zellen an der Platte haften bleiben und nicht im Medium schwimmen. Die Zellen werden dann mit PBS gewaschen, um nicht-anheftende Zellen zu eliminieren. Das Kulturschälchen wird mit 2 ml DMEM gefüllt, und die ersten Fotos werden zum Zeitpunkt „24 Stunden“ aufgenommen. Diese stellen die Kontrollfotos dar. Das Kulturschälchen wird ggf. mit den gewünschten Therapeutika behandelt und in den Inkubator zurückgestellt. Die nächsten Fotoaufnahmen werden zum Zeitpunkt „48 Stunden“ gemacht und können mit den Kontrollaufnahmen oder mit unbehandelten Zellen verglichen werden, um die Änderungen in der Spaltoberfläche zu beobachten. Durch die verschiedenen Größen dieses zellfreien Areals kann das Migrations- und Proliferationsverhalten der unterschiedlichen Zellen analysiert werden. Außerdem können Effekte der Medikamente auf die Migration der Zellen erforscht werden.

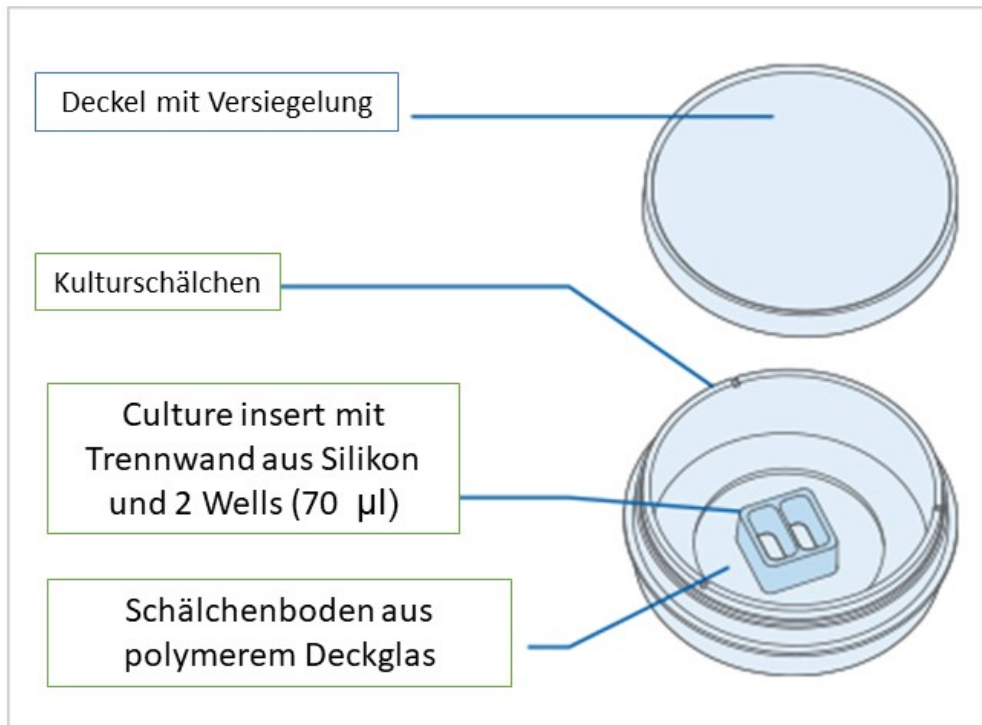


Abbildung 6: Darstellung eines 2-Well-Culture-Insert von ibidi. (Bild: ibidi.com)

2.2.3 Luminescent cell viability assay

Der *luminescent cell viability assay* dient dazu, die Viabilität der Zellen in der Kultur zu überprüfen. Dies erfolgt durch die Quantifizierung der ATP-Menge in der Zellkultur, was wiederum Rückschlüsse auf die Anzahl lebensfähiger Zellen in den Wells erlaubt. Das CellTiter-Glo-Reagenz muss vor dem Experiment durch die Mischung eines 10ml-Fläschchen CellTiter-Glo-Puffer mit einem Fläschchen CellTiter-Glo-Substrat hergestellt werden. Der Puffer wird in das Substrat-Fläschchen eingegeben und die Ampulle wird mehrmals invertiert, bis eine Reagenz-Lösung entsteht. Je nach gewünschtem Endvolumen können die Mengen der einzelnen Komponenten in denselben Verhältnissen vervielfacht werden. Das Produkt wird bis zu 21 Wochen bei -20°C eingelagert und für den Gebrauch ungefähr vier Stunden vor dem Experiment bei Raumtemperatur gehalten.

Bei der zweidimensionalen Variante werden pro Well 100 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von 50000 Zellen/ml in eine 96-Well-Platte ausgesät und über 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Die Zellzahl muss möglichst in allen Wells gleich sein. Nach 24 Stunden werden die Zellen mit den gewünschten

Konzentrationen der Chemotherapeutika behandelt und für weitere 48 Stunden in den Inkubator gestellt. Nach diesen 48 Stunden werden 100 µl CellTiter-Glo-Reagenz hinzugefügt und der Inhalt wird für zwei Minuten auf dem Shaker gut gemischt. Danach wird die Platte mit dem Inhalt im Dunkeln bei Raumtemperatur zehn Minuten inkubiert. Die Detektion des ATP-Gehalts erfolgt durch Messung der Lumineszenz mithilfe des Tecans. Das Lumineszenzsignal entsteht durch die Luciferase-Reaktion bei Vorhandensein von Luciferin, Sauerstoff, Magnesium und ATP [73].

Die dreidimensionale Variante dieses Assays unterscheidet sich nicht wesentlich von der zweidimensionalen Variante. Tumorsphäroide werden, wie im Abschnitt 2.1.1 beschrieben, ausgesät. Nach 72-stündiger Inkubation werden 100 µl des Mediums abgesaugt und die Sphäroide werden zum ersten Mal mit dem zu untersuchenden Therapeutikum behandelt. Die Sphäroidplatte wird für weitere 48 Stunden in den Inkubator gestellt. Zu diesem Zeitpunkt wird ein Mediumwechsel mit einer erneuten Behandlung durchgeführt. 48 Stunden nach der zweiten Behandlung werden 100 µl des Mediums abgesaugt und stattdessen 100 µl CellTiter-Glo-dreidimensional-Reagenz zugegeben. Im Vergleich zur zweidimensionalen Version verfügt der dreidimensionale *cell viability Assay* über eine stärkere Lyse-Funktion des Reagenzes, da er an Tumorkonglomeraten und nicht an einfachen Monolayer-Zellen durchgeführt wird. Ein anderer Unterschied ist die längere Inkubationszeit mit dem Reagenz im Vergleich zur zweidimensionalen Version. Denn der Inhalt der Wells wird auf dem Shaker für 5 Minuten durchmischt und die Platte wird danach im Dunklen für 25 Minuten in Raumtemperatur gestellt. Danach kann die Lumineszenz wie gewohnt mittels Tecan gemessen werden.

2.2.4 Immunologische Methoden

Westernblot

Der Westernblot ist eine immunologische Methode zur Quantifizierung von bestimmten Proteinen, die sich in einer Proteinprobe befinden. Es wird benutzt, um das Vorhandensein oder der Knockout eines Proteins zu bestätigen, oder um den Einfluss einer Behandlung auf die Proteinexpression zu beobachten. Bei dieser Methode werden behandelte mit unbehandelten Proben verglichen. Mittels Gelelektrophorese werden die verschiedenen Proteine im elektrischen Feld voneinander getrennt, dann

vom Gel auf die Membran übertragen und mit spezifischen, für das jeweilige Protein geeigneten Antikörpern detektiert.

Die Gele (Sammel- und Trenngel) werden am Vortag gegossen und im Kühlschrank bei 4° C bis zum nächsten Tag gelagert. Die Plexiglas-Kammern werden zunächst mit Propanol und fusselfreien Tüchern gut gereinigt, und in den dafür vorgesehenen Ständer gestellt, sodass die Gele nach dem Gießen nicht auslaufen.

Das Trenngel ist zehnprozentig und enthält 3,3 ml Rotiphorese 30 (Acrylamid-Lösung), 2,7 ml SDS-Gel-Puffer und 4 ml destilliertes Wasser. Diese Inhaltsstoffe werden zusammengemischt, und mit 100 µl APS und 10 µl TEMED versetzt. Das Produkt wird in die Gelkammer gegossen und mit Propanol überschichtet, um die Entstehung von Luftblasen auf der Oberfläche zu verhindern. Das Trenngel braucht etwa 45 bis 60 Minuten, um sich zu verhärten. Danach wird das vierprozentige Sammelgel hinzugefügt, das aus 5 ml Sammelgel-Lösung (pH 8,9), 50 µl APS und 5 µl TEMED besteht. Die Sammelgel-Lösung enthält SDS-Puffer und Acrylamid. Abschließend wird der Kamm eingelegt und ungefähr 60 Minuten gewartet. Nach Aushärtung des Sammelgels können die Gele in einem mit SDS-Puffer getränkten Papier eingepackt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Aus den zu testenden Zellen werden dann Proteinlysate hergestellt. Alle Schritte erfolgen konsequent auf Eis. Am Vortag werden Zellen aus den gewünschten Zelllinien in Schälchen ausgesät und in den Inkubator gestellt. Wenn die Zellen konfluent sind, werden sie von der Oberfläche der Schälchen abgeschabt und in einen 15-ml-Falcon überführt. Danach werden sie bei 4° C und 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 1 ml gekühltem PBS resuspendiert und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Inhalt wird bei 4° C und 2000 rpm erneut für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wird abgesaugt. Je nach Größe wird das Pellet in 60-120 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Innerhalb der nächsten 20 Minuten wird der Inhalt 3 Mal mit jeweils 30 Pulsen sonifiziert. Das erfolgt in zeitlichen Abständen von 5 Minuten. Während der Wartezeiten zwischen den Sonifizierungsrunden bleibt das Gefäß auf Eis. Nach dem Sonifizieren wird der Inhalt bei 4° C und 13000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 30 µl von diesem Eluat werden mit 6 µl Dissoziationspuffer gemischt und bei 95° C für 5 Minuten gekocht.

Im Gel wird der Kamm entfernt. Die im Sammelgel durch den Kamm geformten Aussparungen werden durch Auf- und Abpipettieren gründlich gespült. In die Taschen werden jeweils 20-30 µl aus den Proteinproben pipettiert. In eine benachbarte Tasche

werden 8 µl Protein ladder aufgetragen. Danach wird das Sammelgel bei 60 Volt und das Trenngel bei 90 Volt im elektrischen Feld laufen gelassen. Gleichzeitig wird die Membran vorbereitet und in Methanol für eine Minute aktiviert und danach zum Äquilibrieren für 5 Minuten in Transfer-Puffer getränkt. Anschließend wird das Gel vorsichtig auf die Membran gelegt und es wird im Trans-Blot-Turbo-Blotter über 45 Minuten geblottet. Die Proteine werden durch das Blotting auf die Membran übertragen. Die Membran wird anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in ungefähr 5 ml Milch blockiert. Als Nächstes wird sie in den Primärantikörper nach der angegebenen Verdünnung in Milch über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper wird darauf gegeben. Die Membran wird eine Stunde in Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und dann erneut gewaschen. Die Proteine werden mithilfe der Detektionsreagenzien und des ChemiDoc-Entwicklers detektiert. In dieser Arbeit wurden die Anti-LRRC8A-Antikörper als Primärantikörper verwendet. Außerdem wurden die Pica-Zellen zur Ladekontrolle mit den sekundären GAPDH-Antikörpern inkubiert. GAPDH verfügt über ein anderes Molekulargewicht (30-40 kDa) als LRRC8A (80-100 kDa) und wird in fast allen Gewebetypen in hohen Konzentrationen exprimiert. Daher eignet sich in dem Fall sehr gut als Ladekontrolle.

2.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Ergebnisse (T-Test) erfolgte mittels der Software Prism©. Ab einem p-Wert von <0.05 wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Einsatz der dreidimensionalen Zellmodelle in der Therapietestung

Zur Kultivierung von Zellkulturen in dreidimensionaler Form wurden Sphäroide aus beiden Zelllinien in speziellen *low-adhesion* Kulturplatten ausgesät. Zunächst musste bestätigt werden, dass die Sphäroide gleichmäßig wachsen und für die Experimente geeignet sind. Aus diesem Grund wurden Sphäroide der Pica-Zelllinie über sieben Tage nach Protokoll kultiviert. An 3 Zeitpunkten wurden die *Mean object area* (MOA), *Mean object totalintensity* (MOT) und *Mean Sphere Volum* (MSV) mittels des automatisierten high-content-Mikroskops Thermo Scientific ArrayScan VTI gemessen. Die Abbildung 7 stellt Fotos der Pica-Sphäroide und deren Wachstum über sieben Tage anhand der mittleren Oberfläche (*Mean Object Area*) dar. Die Ablesung mehrerer Array-Scan-Messungen zeigte, dass das Wachstum der Tumorsphäroide über die Zeit gleichmäßig und reproduzierbar ist. Diese Erkenntnis bildet die Grundlage für die Experimente an den Sphäroiden.

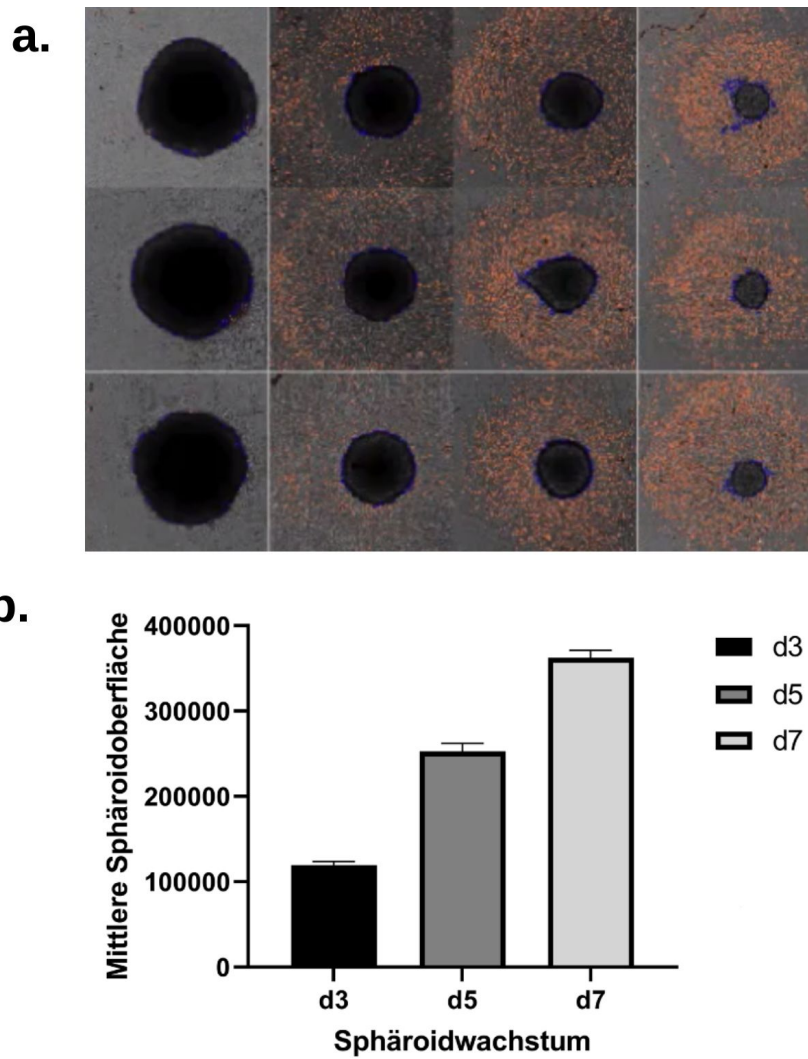


Abbildung 7: a. Eindrücke von den Pica-Sphäroiden. b. Größenvarianz der Pica-Sphäroide über sieben Tage. D3 steht für den dritten, d5 für den fünften und d7 für den siebten Wachstumstag.

3.2 Bestätigung des LRRC8A-Knockouts

Vor dem Beginn der Experimente an den Pica-Zellen wurde der Knockout des LRRC8A-Gens in den bereitgestellten KO-Zellen eigenständig verifiziert. Dies erfolgte mittels Westernblot. Dafür wurden die Klone WT4 und KO36 verwendet. Die Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse des Westernblots. Darauf ist eine Bande des Proteins LRRC8A beim Klon WT4 zu sehen, während beim Klon KO36 keine Bande erkennbar ist. Der GAPDH-Ladekontrollantikörper wurde bei beiden Zellklonen gleichmäßig exprimiert und dadurch auch im gleichen Maße detektiert.

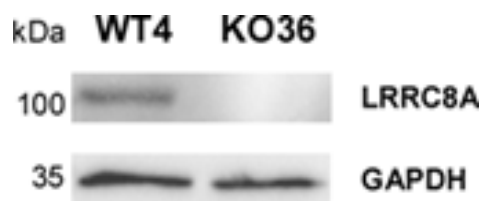


Abbildung 8: Westernblot zur Analyse des LRRC8A-Knockouts. Die Expression des LRRC8A-Proteins bei den WT-Zellen war unverändert, während sie bei den KO-Zellen fehlte. GAPDH dient als Ladekontrolle. (Erwartetes Molekulargewicht in kDa angegeben).

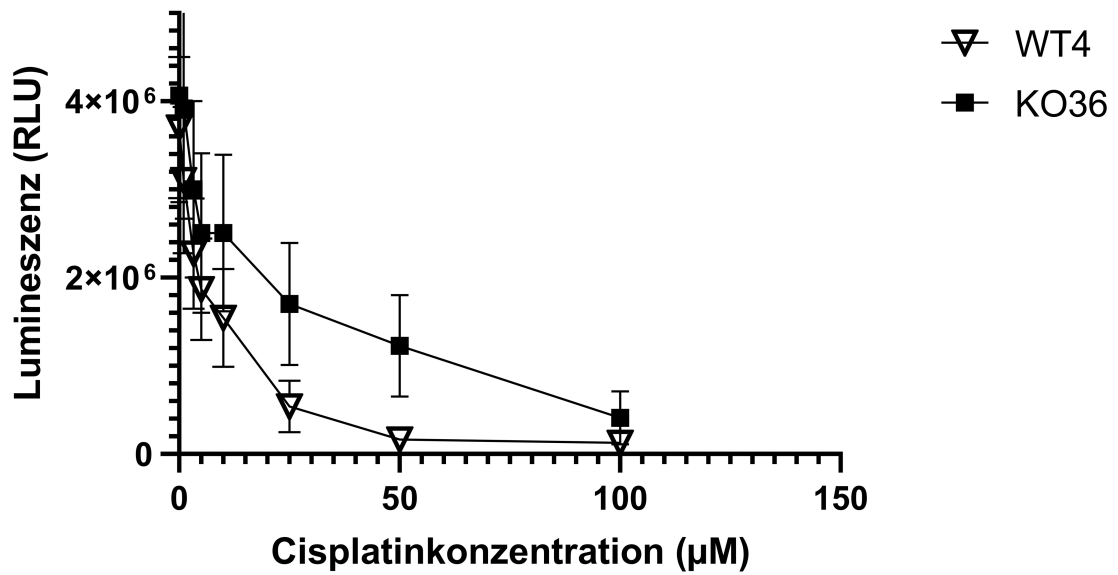
3.2.1 LRRC8A-Knockout steigert die Resistenz gegenüber Cisplatin in zweidimensionaler Zellkultur

Um die Hypothese der Rolle von LRRC8A bei der Resistenzentwicklung der Knockout-Zellen gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika zu überprüfen, wurde damit begonnen, die Sensitivität beider Zelltypen hinsichtlich einer Cisplatinbehandlung zu vergleichen. Beide Zelltypen wurden dafür in 96-Well-Platten kultiviert. Nach 24 Stunden wurden jeweils drei Wells von jedem Zelltyp mit einer bestimmten Cisplatinkonzentration behandelt. Jeweils drei Wells blieben als Kontrollzellen unbehandelt. Der *luminescent cell viability* Assay wurde in Triplikaten durchgeführt. In Abbildung 9 ist die gemeinsame Auswertung dieser 3 Triplikate dargestellt. Die x-Achse in Abbildung 9a zeigt die Cisplatinkonzentrationen und die y-Achse die Lumineszenz. Die Lumineszenz ist ein Indikator für die Zellviabilität. Das Lumineszenzsignal verhält sich umgekehrt proportional zu den Cisplatinkonzentrationen. Dies bedeutet einen eindeutigen Rückgang der Zellviabilität mit der steigenden Cisplatinkonzentration. Es konnte ein klarer Unterschied in der Lumineszenz zwischen den WT- und KO-Zellen zugunsten der KO-Zellen beobachtet werden. Daraus lässt sich herleiten, dass der Knockout des LRRC8A-Gens der Grund für die höhere Viabilität der KO-Zellen unter Cisplatinbehandlung ist.

Abbildung 9b veranschaulicht das Dosis-Wirkung-Verhältnis desselben Experiments. Auf der x-Achse sind die Logarithmen der Cisplatinkonzentrationen dargestellt. Die y-Achse präsentiert die Viabilität der beiden Zelllinien nach der Cisplatinbehandlung. An den Kurven ist zu erkennen, dass für die Abtötung von 50 % der WT-Zellen niedrigere Cisplatinkonzentrationen als bei den KO-Zellen notwendig sind. Dies hat zu bedeuten, dass die Viabilität der KO-Zellen nach der Behandlung mit Cisplatin höher als die der WT-Zellen ist.

a.

Luminscent cell viability assay 2D



b.

Luminscent cell viability assay 2D

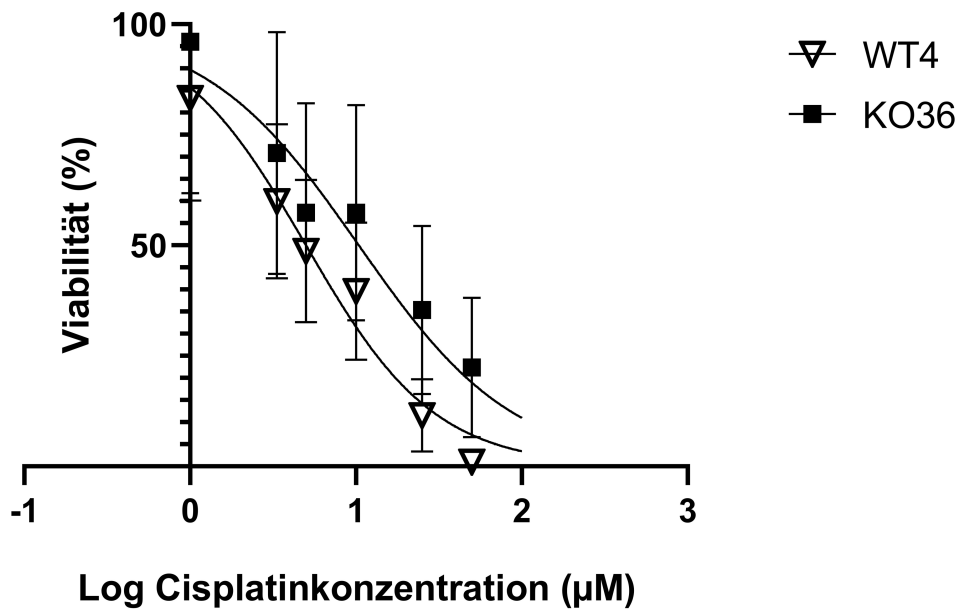


Abbildung 9: Zellviabilität bei Cisplatinbehandlung in zweidimensionaler Kultur. Pica WT4 und KO36 Zellen wurden für 48 Stunden mit den angegebenen Cisplatinkonzentrationen behandelt und für den *Cell Titer Glo Viabilitätsassay* genutzt. **a.** Lumineszenzsignale (*Relative light units, RLU*) korrelieren mit intrazellulärem ATP-Gehalt. **b.** Die Zellviabilität korreliert mit den Cisplatinkonzentrationen. ** n=9.

3.2.2 Bestätigung der Bedeutung von *LRRC8A*-Knockout für die Cisplatinresistenz in Tumorsphäroiden

Damit die Effekte des *LRRC8A*-Knockouts auch an Tumorsphäroiden überprüft werden können, wurde eine an die dreidimensionale Kultur angepasste Form des *luminescent cell viability assays* angewendet. Dieses Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Dabei wurden bei den Tumorsphäroiden niedrigere Cisplatinkonzentrationen als bei den Monolayer-Zellen verwendet. Eine gemeinsame Auswertung der 3 Triplikate wurde durchgeführt. In Abbildung 10 sind auf der x-Achse die Cisplatinkonzentrationen aufgeführt, auf der y-Achse die Lumineszenzwerte. Es konnten bei den KO-Sphäroiden höhere Lumineszenzwerte beobachtet werden. Diese reflektieren eine höhere ATP-Konzentration und damit eine höhere Viabilität im Vergleich zu den WT-Sphäroiden.

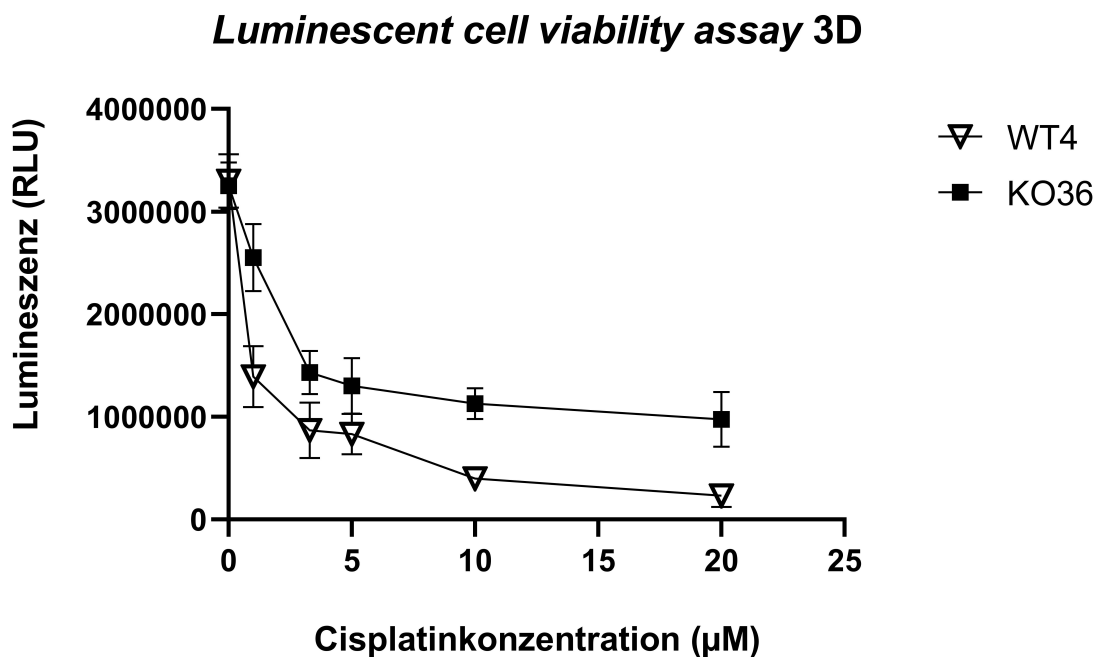


Abbildung 10: Zellviabilität bei Cisplatinbehandlung in dreidimensionaler Kultur. Pica WT4- und KO36-Sphäroide wurden über 5 Tage mit den angegebenen Cisplatinkonzentrationen behandelt und für den *luminescent cell viability assay* genutzt. Lumineszenzsignale (*Relative light units, RLU*) korrelieren mit der Viabilität der Sphäroide. ** n=12.

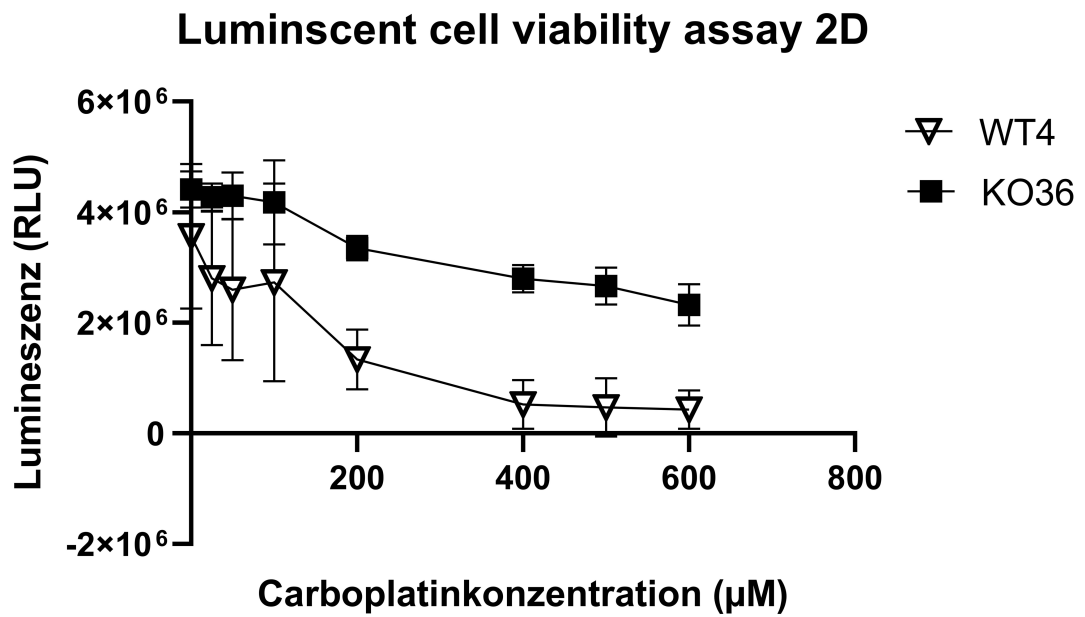
3.2.3 LRRC8A-Knockout steigert die Resistenz gegenüber Carboplatin in zweidimensionaler Zellkultur

Um zu überprüfen, dass die durch den LRRC8A-Knockout entstandene Resistenz weitere platinbasierte Chemotherapeutika gleichermaßen betrifft, wurde mit Carboplatin der Einfluss eines anderen platinbasierten Chemotherapeutikums auf die Pica-Zellen untersucht. Zunächst sollten die geeigneten Carboplatinkonzentrationen ermittelt werden. Dafür wurde das etablierte *luminescent cell viability assay* unter den gleichen Bedingungen für die Behandlung mit Carboplatin wiederholt. Aus mehreren Testdurchläufen ließ sich herleiten, dass hier im Vergleich zu den Cisplatinexperimenten höhere Carboplatinkonzentrationen notwendig sind.

Der Versuch wurde in 3 Replikaten durchgeführt. Abbildung 11 stellt die Ergebnisse des Experiments. Die Abbildung 11a zeigt deutlich, dass die Viabilität der KO-Zellen unter Carboplatinbehandlung höher ist als die der WT-Zellen. Die Zellviabilität wird durch die Höhe der Lumineszenzsignale reflektiert.

Abbildung 11b stellt das Dosis-Wirkungs-Verhältnis desselben Experiments dar. Auf der x-Achse sind die Logarithmen der Carboplatinkonzentrationen dargestellt. Die y-Achse präsentiert die Viabilität der beiden Zelllinien nach der Carboplatinbehandlung. An den Kurven ist zu erkennen, dass für die Abtötung von 50 % der WT-Zellen niedrigere Carboplatinkonzentrationen als bei den KO-Zellen notwendig sind. Dies hat zu bedeuten, dass die Viabilität der KO-Zellen nach der Behandlung mit Carboplatin höher als die der WT-Zellen ist.

a.



b.

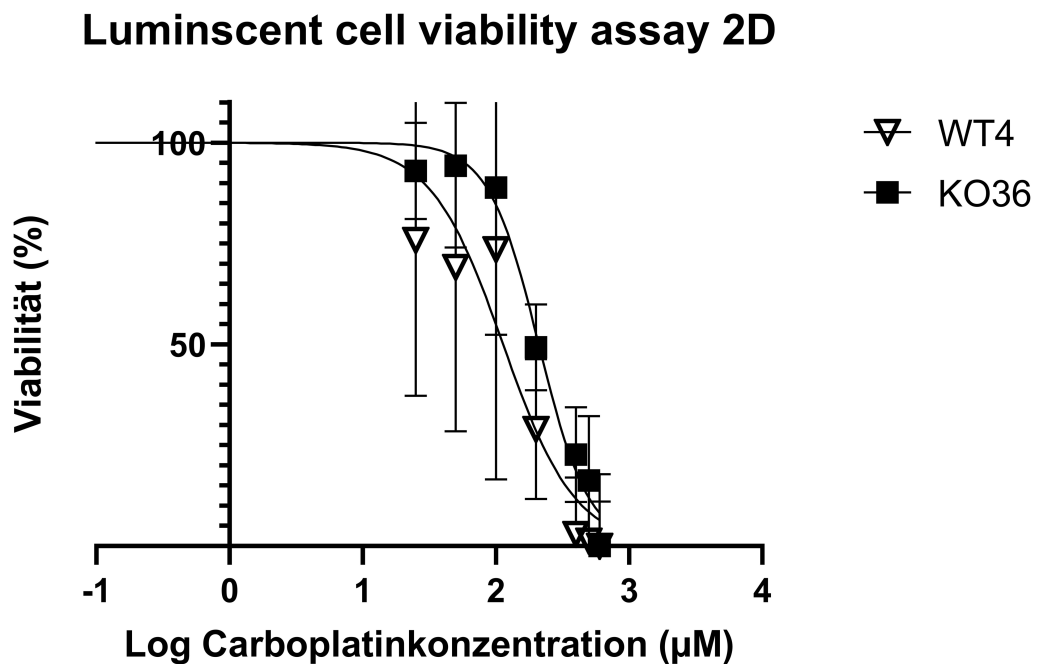


Abbildung 11: Zellviabilität bei Carboplatinbehandlung in zweidimensionaler Kultur. Pica WT4 und KO36 Zellen wurden für 48 Stunden mit den angegebenen Carboplatinkonzentrationen behandelt und für den *Cell Titer Glo* Viabilitätsassay genutzt. **a.** Lumineszenzsignale (*Relative light units, RLU*) korrelieren mit intrazellulärem ATP-Gehalt. **b.** Die Zellviabilität korreliert mit den Carboplatinkonzentrationen. ** n=9.

3.2.4 Bestätigung der Bedeutung von LRRC8A-Knockout für die Carboplatinresistenz in Tumorsphäroiden

Um die durch den LRRC8A-Knockout entstandene Carboplatinresistenz auch an Tumorsphäroiden zu überprüfen, wurde eine dreidimensionale Form des *luminescent cell viability assays* in Triplikaten durchgeführt. Abbildung 12 zeigt die Auswertung des Experiments. Auf der x-Achse sind die Carboplatinkonzentrationen, mit denen die Tumorsphäroide behandelt wurden, dargestellt. Auf der y-Achse die Lumineszenz. Es konnte nach der Auswertung dieses Assays festgestellt werden, dass der ATP-Gehalt und damit die Viabilität der KO-Sphäroide unter Carboplatinbehandlung höher als die der WT-Sphäroide ist.

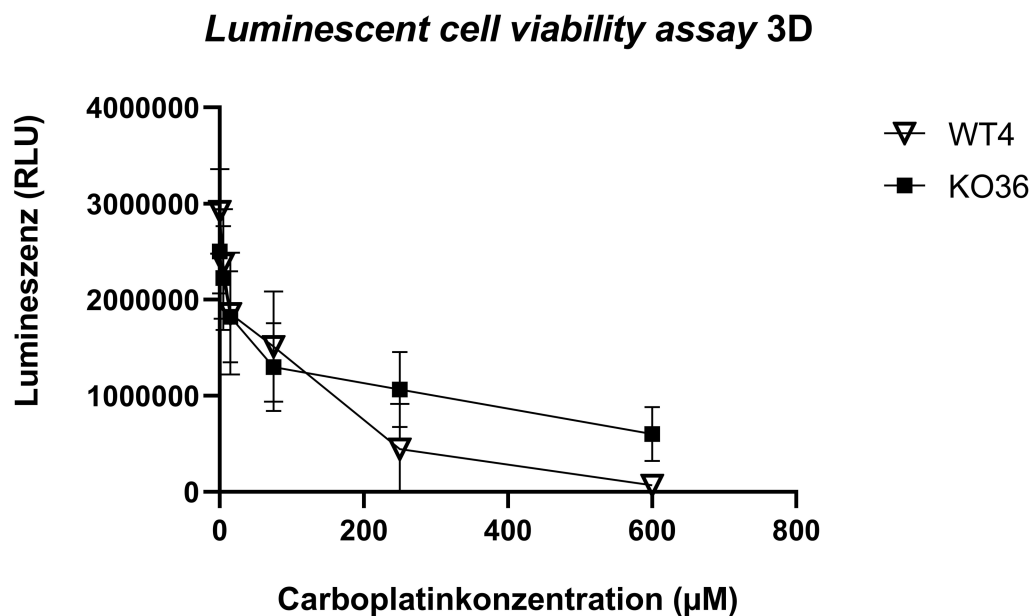


Abbildung 102: Zellviabilität bei Carboplatinbehandlung in dreidimensionaler Kultur. Pica WT4- und KO36-Sphäroide wurden über 5 Tage mit den angegebenen Carboplatinkonzentrationen behandelt und für den *luminescent cell viability assay* genutzt. Lumineszenzsignale (*Relative light units, RLU*) korrelieren mit der Viabilität der Sphäroide. ** n=12.

3.3 LRRC8A-knockout stabilisiert die Morphologie der Sphäroide

Nachdem die Experimente bei den KO-Zellen eine gesteigerte Resistenz gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika im Vergleich zu den WT-Zellen gezeigt haben, wurde der Effekt des LRRC8A-Knockouts an Tumorsphäroiden erneut bildmorphologisch überprüft. Dafür wurden Sphäroide aus beiden Zelltypen nach Protokoll ausgesät. Nach 72 Stunden Wachstum wurde mit der Cisplatinbehandlung begonnen. Dieses Experiment wurde im Vergleich zu unbehandelten Kontrollsphäroiden durchgeführt. Am dritten Wachstumstag (d3) wurden die mittlere Oberfläche (MOA) und die mittlere Totalintensität (MOT) der Sphäroide vor der Cisplatinbehandlung gemessen. Die Messung und die Behandlung wurden alle zwei Tage wiederholt. Dies bedeutet, dass beispielsweise der fünfte Wachstumstag (d5) dem zweiten Behandlungstag (t2) entsprach. An jedem der Zeitpunkte wurden via *ArrayScan* Digitalfotos der Sphäroide aufgenommen. Diese Fotos zeigen Eindrücke behandelter Sphäroide aus den beiden Zelltypen unter der Einwirkung von Cisplatin. In Abbildung 13 sind zwei Sphäroide am zehnten Wachstumstag (d10) zu sehen. Beide Sphäroide wurden mit derselben Konzentration von Cisplatin (20 μ M) behandelt. Das Sphäroid aus den KO-Zellen mit dem ausgeschalteten LRRC8A-Gen konnte trotz siebentägiger Cisplatinbehandlung seine Form beibehalten. Grund dafür könnte sein, dass der LRRC8A-Knockout die Zellen und damit die Sphäroide resistenter gegenüber Cisplatin machen kann. Auf der rechten Seite derselben Abbildung ist dagegen ein zerfallenes Pica-WT-Sphäroid.

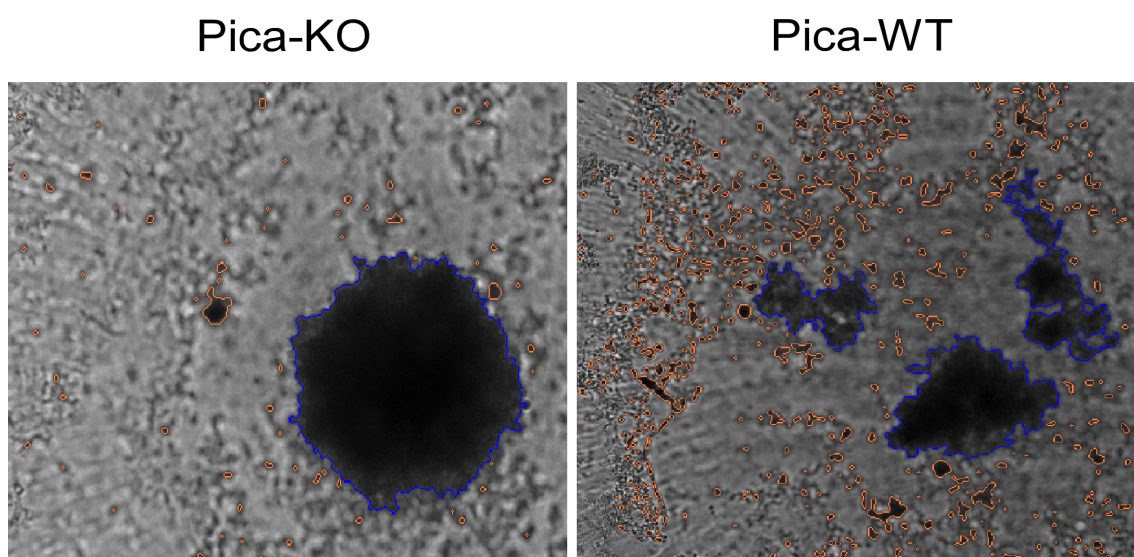


Abbildung 13: Links: Sphäroid aus Pica-KO-Zellen, Rechts: zerfallenes Sphäroid aus Pica-WT-Zellen. Beide Sphäroide wurden über 10 Tage mit 20 μ M Cisplatin behandelt.

3.4 LRRC8A-Knockout verlangsamt die Proliferation und Migration der Tumorzellen

Um weitere Effekte des LRRC8A-Knockouts auf die Migration und Proliferation der Tumorzellen zu analysieren, wurde ein Assay gesucht, der diese Tumoreigenschaften repräsentiert. Der *wound healing assay* bzw. *migration assay* ist eine geeignete Methode zur Beobachtung des Proliferations- und Migrationsverhalten lebender Zellen. Bei diesem Assay werden Zellen in bestimmte, für diesen Assay geeignete Kulturschälchen ausgesät. Diese Kulturschälchen bestehen aus zwei Wells. Die Wells sind durch eine Silikonwand voneinander getrennt. Diese erzeugt einen zellfreien Spalt zwischen den Wells. Durch das Fotografieren der Wells zu unterschiedlichen Zeitpunkten kann die Geschwindigkeit des Zellwachstums bis zum kompletten Verschluss des künstlich erzeugten Spalts überwacht werden.

Der Vergleich zwischen den beiden Zelltypen, den Wildtyp- und den Knockout-Zellen, unter verschiedenen Bedingungen, lässt zuverlässige Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen zu. Der *wound healing assay* wurde nach Protokoll, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Beide Zelllinien wurden dabei sowohl unbehandelt als auch unter Behandlung mit 5 μM Cisplatin inkubiert. Die ersten Aufnahmen, die nach 24 Stunden gemacht wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens. Erst nach 48 Stunden wurden die ersten bemerkenswerten Veränderungen beobachtet (Abbildung 14). Die Knockout-Zelllinie hatte ein verändertes Wachstumsmuster. Die behandelten KO-Zellen zeigten ein schnelleres Wachstum als die behandelten WT-Zellen, was wiederum eine höhere Cisplatinresistenz bei den KO-Zellen vermuten lässt. Der gesicherte Knockout des LRRC8A-Gens in den KO-Zellen macht dieses Ergebnis plausibel.

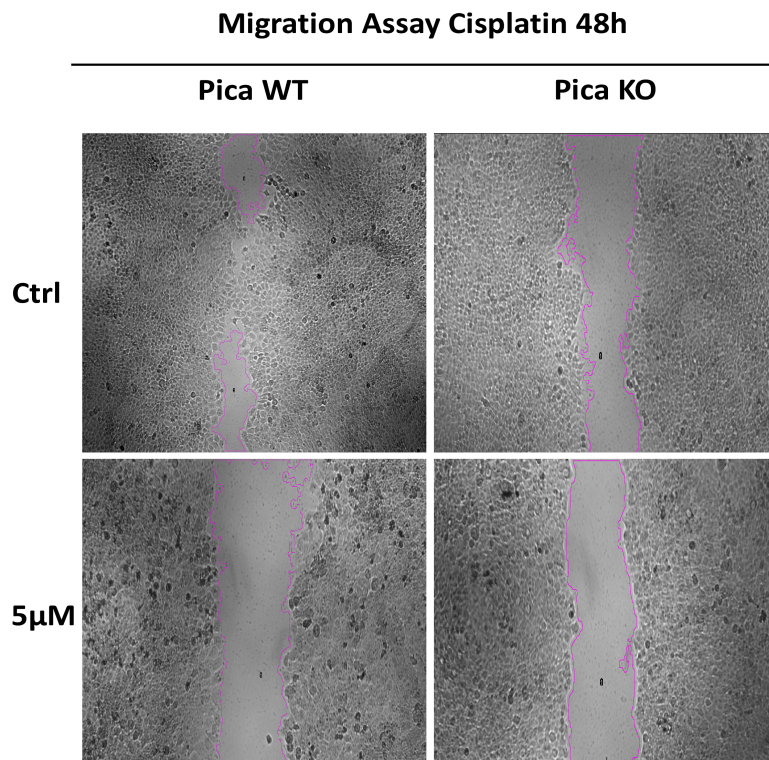


Abbildung 11: 48-Stunden-Aufnahme der WT- und KO-Zellen im Rahmen des *wound healing assays*, ausgewertet mittels ImageJ. ** n=1.

Mithilfe der Software ImageJ wurde die Oberfläche des Wundspalts markiert und der Flächeninhalt der nicht von Zellen bewachsenen Spaltoberfläche bestimmt (Abbildung 14 und 15). Abbildung 14 zeigt einen Vergleich zwischen Oberfläche des Wundspalts der WT- und KO-Zellen. Für die WT- und KO-Zellen wurden jeweils Quotienten ermittelt, in denen die Restgröße des Wundspalts bei behandelten und unbehandelten Zellen in Verhältnis gesetzt wurde. Dies zeigt, in welchem Verhältnis sich das Migrationsverhalten beider Zelltypen nach der Behandlung mit Cisplatin verändert. Das Migrationsverhalten und damit die Geschwindigkeit des Wundverschlusses der WT-Zellen haben sich unter Cisplatinbehandlung drastisch vermindert, während sie sich bei den KO-Zellen kaum verändert haben. Es wird vermutet, dass der Knockout des LRRC8A-Gens und der dadurch entstandenen Störung der Volumenregulation innerhalb der Zellen sowie die resultierende Resistenz gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika in Zusammenhang stehen kann.

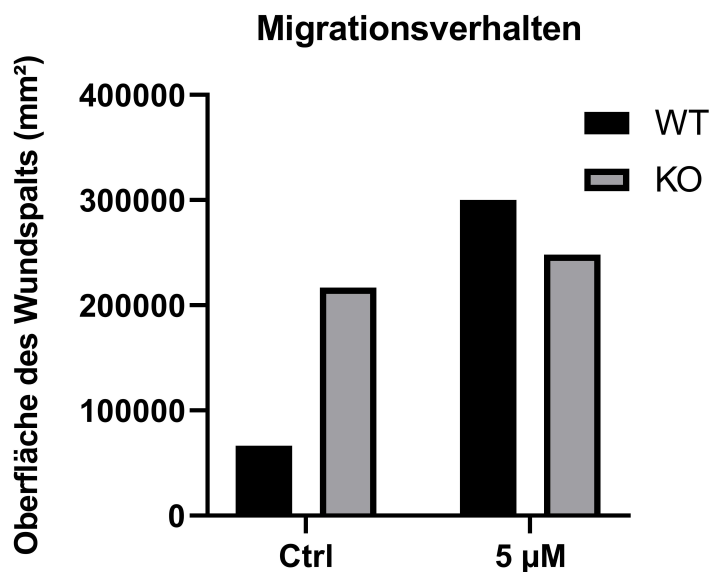


Abbildung 12: Vergleich zwischen den mit Cisplatin behandelten Zellen und Kontrollzellen bezüglich des Migrationsverhaltens. Die Größe des Wundspalts wurde nach 48 Stunden gemessen. ** n=1.

3.5 Sphäroide sind gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika anfälliger als Monolayer-Zellen

Bis die passende Konzentration des platinbasierten Chemotherapeutikums definiert werden konnte, wurden in jedem Experiment im Rahmen dieser Studie unterschiedliche Konzentrationen der platinbasierten Chemotherapeutika getestet. Währenddessen wurde beobachtet, dass jeweils in der zweidimensionalen und dreidimensionalen Zellkultur unterschiedliche Konzentrationen der Therapeutika gebraucht wurden, um ähnliche Ergebnisse zu erzielen.

Mithilfe des *luminescent cell viability assays* wurden das Wachstum und die Viabilität der Zellen unter Cisplatinbehandlung beobachtet. Dieser Assay wurde in Triplikaten durchgeführt. Dies erfolgte gleichzeitig an den WT-Zellen und den KO-Zellen in zwei- und dreidimensionaler Form. Beide Zelltypen wurden mit denselben Cisplatinkonzentrationen behandelt. Die KO-Zellen wuchsen unter Cisplatinbehandlung schneller und waren vitaler als die WT-Zellen. Außerdem wurden bei den KO-Zellen höhere Cisplatinkonzentrationen benötigt, um dieselbe Auswirkung auszulösen. Um dies zu relativieren, wurden die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC50) von Cisplatin und Carboplatin gemessen. IC50 ist die Konzentration des toxischen Therapeutikums, bei der 50 % der maximal möglichen Toxizität erreicht wird.

Abbildung 16 zeigt den Vergleich von Mittelwerten der IC50-Werte aus jeweils 3 Replikaten. In der Abbildung kann zwischen den WT- und den KO-Zellen ein Unterschied in den IC50-Werten beobachtet werden. Dies kann mit dem LRRC8A-Knockout, der an der erhöhten Resistenz der KO-Zellen gegenüber den platinhaltigen Therapeutika mitbeteiligt sein kann, zusammenhängen. Um zu einer um 50 % verringerten Zellviabilität 48 Stunden nach der Behandlung zu führen, wurden bei den WT-Zellen niedrigere Konzentrationen als bei den KO-Zellen benötigt.

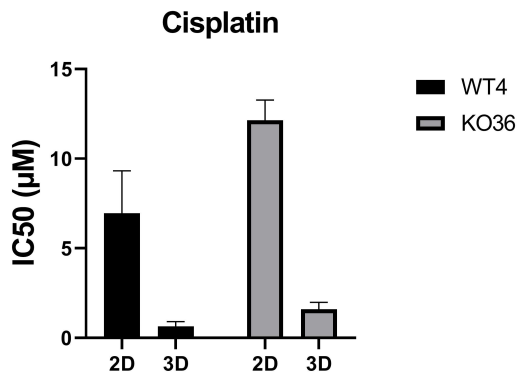
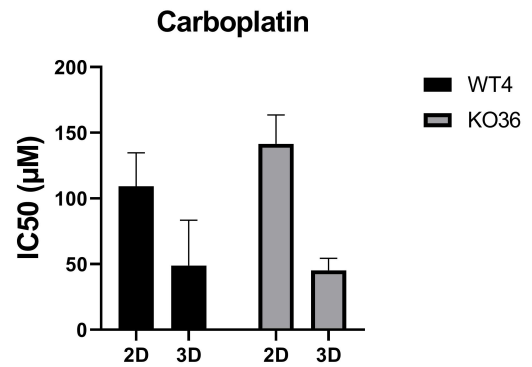
a**b**

Abbildung 16: Darstellung der IC50-Werte von **a.** Cisplatin und **b.** Carboplatin in zwei- und dreidimensionaler Zellkultur. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Wiederholungen, die unter denselben Bedingungen durchgeführt wurden. Die Zellen bzw. Sphäroide wurden in den drei Durchgängen mit denselben Konzentrationen behandelt. **n=9, p= 0,071 (zweidimensional), p= 0,052 (dreidimensional) laut t-Test.

Es konnte aus den Experimenten festgestellt werden, dass bei den Sphäroiden deutlich niedrigere Konzentrationen der platinhaltigen Therapeutika als bei den einfachen Monolayer-Zellen benötigt wurden. Dies ist in der Abbildung 16 an den klaren Unterschieden der IC50-Werte zu erkennen und könnte auf eine erhöhte Therapieresponse der Pica-Tumorsphäroide gegenüber Cisplatin im Vergleich zu den zweidimensionalen Zellen hindeuten.

4 Diskussion

4.1 Relevanz des LRRC8A-Knockouts für die Resistenzentwicklung gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika

Die Ergebnisse der etablierten Protokolle dieser Studie haben gezeigt, dass die VRACs die Reaktion der HNSCC-Tumorzellen auf die Therapie mit platinbasierten Chemotherapeutika *in vitro* deutlich beeinflussen. Für diese Experimente wurde die Pica-Zelllinie eingesetzt. Diese immortalisierte Zelllinie wurde aus einem HNSCC-Tumor gewonnen. Neben den Wildtypzellen kamen auch Zellen mit einem ausgeschalteten LRRC8A-Gen zum Einsatz. Der effektive und gesicherte Knockout des LRRC8A-Gens und der Einsatz automatisierter Verfahren bei der Auswertung der Daten stärken die Zuverlässigkeit der Ergebnisse.

Die Studie hat einen relevanten Unterschied zwischen den WT- und KO-Zellen in Bezug auf ihre Reaktion auf die platinbasierte Chemotherapie in zwei- und dreidimensionaler Zellkultur gezeigt. Die KO-Zellen waren gegenüber diesen Therapeutika resistenter als die WT-Zellen. Die höhere Viabilität der KO-Zellen unter Cisplatin- oder Carboplatinbehandlung lässt vermuten, dass das ausgeschaltete LRRC8A-Gen für die Resistenz gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika mitverantwortlich ist.

Der jetzige Forschungsstand geht von einer Mitbeteiligung des LRRC8As als Teil der VRACs am Influx der platinbasierten Chemotherapeutika aus [43]. Die Untereinheit LRRC8A bildet hauptsächlich mit ihrer Schwester-Untereinheit LRRC8D den Kanal, der die Hauptrolle beim Transport der platinbasierten Therapeutika spielt [74]. Außerdem leisten die VRACs einen großen Beitrag bei der Volumenregulation der Zellen, welches wiederum einen Einfluss auf das Membranpotenzial, die zelluläre pH-Variation und dadurch auch auf den Zellzyklus und die Proliferation der Zellen hat [75, 76]. Des Weiteren konnten Zhang et al. zeigen, dass LRRC8A ein wichtiger Biomarker für das Therapieansprechen der Patienten mit kolorektalen Karzinomen ist [77]. Eine hohe Expression des LRRC8A-Gens in den Tumorzellen kann mit einer erhöhten Metastasierungsrate und damit mit einer schlechteren Prognose verbunden sein [77, 78].

Die Etablierung personalisierter und patientenorientierter Therapieschemata stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Überwindung der Resistenzen

gegenüber den platinhaltigen Therapeutika und die Erhöhung der Ansprechraten bei den HNSCC-Patienten dar. Wichtig wäre dafür die Kenntnis über die zellphysiologischen Eigenschaften der Tumorzellen, die die Resistenzentwicklung fördern und damit die den Therapieerfolg beeinflussen können. Dazu gehört unter anderem der VRAC-Expressionsstatus der Tumore. Diese Studie konnte zeigen, dass die Tumorzellen mit niedriger VRAC-Expression resistenter gegenüber Cisplatin waren. Dementsprechend kann eine Patientenstratifikation nach ihren VRAC-Expressionslevels sehr vorteilhaft sein. Dies erlaubt eine personalisierte Chemotherapie mit wahrscheinlich besseren Erfolgsaussichten [71].

Neben Cisplatin spielt Carboplatin eine große Rolle in der Therapie der HNSCC-Patienten. Die adjuvante Therapie der fortgeschrittenen HNSCCs besteht aus hochdosiertem Cisplatin und Radiatio. Radiochemotherapie überliegt einer alleinigen Radiotherapie [79]. Die Verwendung von Carboplatin anstelle von Cisplatin bei metastasierten und rezidivierenden HNSCCs hat in Kombination mit Fluorouracil niedrigere Responderaten, aber insgesamt einen unwesentlichen Effekt auf die gesamte Überlebensrate gezeigt. Carboplatin ist außerdem ein schwächerer Radiosensitizer als Cisplatin [79]. Carboplatin kommt insbesondere zum Einsatz bei Patienten, die Cisplatin aufgrund seines breiten Nebenwirkungsprofils nicht tolerieren, oder wenn Cisplatin aus anderen medizinischen Gründen kontraindiziert ist.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in gleicher Art und unter denselben Bedingungen auch mit dem platinhaltigen Therapeutikum Carboplatin durchgeführt. Wie im Ergebnissteil dargestellt wurde, war allerdings die Anwendung von Carboplatin anspruchsvoller als Cisplatin. Die Erfassung der passenden Carboplatinkonzentration mittels optimierter Experimente konnte im Rahmen dieser Studie noch nicht erbracht werden und ist eine Forschungslücke, die im weiteren Verlauf genauer adressiert werden könnte. Die Gründe, die hinter dieser Schwierigkeit stecken können, sollen im weiteren Verlauf der Studie analysiert werden. Vermutet wird, dass die niedrigere Potenz und das mildere Toxizitätsprofil von Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin mögliche Ursachen sein können. Belegt wurde diese Annahme aber noch nicht.

Ausgehend von der Annahme, dass Carboplatin weniger potent als Cisplatin ist [22], wurden zunächst die Zellen mit deutlich höheren Carboplatinkonzentrationen behandelt. Die Ergebnisse im Rahmen des *luminescent cell viability assays* führten jedoch zu inkonsistenten Befunden, da die Viabilität der Zellen im Bereich von hohen

Konzentrationen stark variierte. Für einen besseren Vergleich der Ergebnisse wurden für die Versuche nur die Pica-Zellen verwendet, und die Behandlung mit Cis- und Carboplatin wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt. Trotzdem konnten bei Carboplatin keine signifikanten und vollständig reproduzierbaren Ergebnisse erreicht werden. Die konstant beobachtete Tendenz lässt dennoch einen Einfluss der Expression von LRRC8A auf die Carboplatinaufnahme und somit auf seine Toxizität vermuten. Wilczynski et al. zeigten, dass die VRACs bei der Carboplatinaufnahme eine wichtige Rolle spielen [51]. Dies bedeutet, dass eine reduzierte Expression des LRR8A-Gens an der Resistenz gegenüber Carboplatin mitbeteiligt sein kann. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Verwendung von Carboplatin in der kombinierten Chemotherapie vieler HNSCC-Patienten einen hohen Stellenwert besitzt [7, 16]. Trotz der Herausforderungen bleibt die Erforschung von Carboplatin als Teil der Chemotherapie von HNSCCs interessant und relevant für eine große Anzahl an Patienten, die nicht für die Behandlung mit Cisplatin geeignet sind und von dieser Forschung profitieren können.

4.2 Interpretation der Ergebnisse dreidimensionaler Zellkultur

Im Rahmen dieser Studie konnten die Assays, die in zweidimensionaler Form etabliert wurden, auch in dreidimensionaler Form reproduzierbar durchgeführt werden. Es konnte festgestellt werden, dass die Tumorsphäroide für die *in-vitro*-Testung gut geeignet sind. Es war bemerkenswert, dass bei den Sphäroiden wesentlich niedrigere Konzentrationen an Cisplatin notwendig waren, um ähnliche Effekte wie bei dem einfachen Monolayer-Zellkulturmodell zu erzielen. Dies zeigten die unterschiedlich hohen IC50-Werten. Die Ergebnisse implizieren, dass die zytotoxische Wirkung von Cisplatin auf die Tumorkongolmerate stärker war als auf die Monolayer-Zellen. Ein Vorteil dieser Studie diesbezüglich ist, dass die Gesamtheit der Experimente nur an den Pica-Zellen und unter denselben Bedingungen durchgeführt wurden.

Durch die komplizierte Struktur und die mehrschichtige Form der Tumorsphäroide bestand die Annahme, dass die Therapeutika womöglich Schwierigkeiten hatten, bis in das Innere des Sphäroids vorzudringen. Trotz der Annahme der höheren Sensitivität der Monolayer-Zellen wurden in den Experimenten hohe Konzentrationen der Therapeutika gebraucht, um einen Effekt erzielen zu können. Karpinska et al. konnten in einer Studie mit Hela-Zellen und MDA-MB-231-Zellen feststellen, dass beide Zelltypen in der dreidimensionalen Zellkultur die doppelte Konzentration vom PARP-Inhibitor Olaparib als die zweidimensionalen Zellen aufnehmen [80]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Eindringen von verschiedenen Zytostatika ins Sphäroid-Innere leichter als in Monolayer-Zellen gelingen kann. Dennoch sind diese Ergebnisse allein nicht ausreichend, um daraus endgültige Rückschlüsse zu ziehen. Um diese Erkenntnisse zu verifizieren, sind weitergehende Studien notwendig.

Die flache zweidimensionale Kultur ist leicht umsetzbar, sie verursacht geringe Kosten und ihre Ergebnisse sind in der Regel gut reproduzierbar. Dennoch haben Monolayer-Kultursysteme ihre Grenzen. Beispielsweise kann die zweidimensionale Kultur die Interaktionen zwischen den Zellen und ihrer extrazellulären Umgebung nicht genau reflektieren [81]. Außerdem haben andere Studien gezeigt, dass die Sphäroide nicht nur die natürliche Umgebung besser repräsentieren, sondern auch eine genauere Beurteilung der Disposition und Pharmakokinetik von den Medikamenten anbieten können, welches wiederum Rückschlüsse auf die Sicherheit und Wirksamkeit dieser Medikamente erlaubt [82]. Des Weiteren kann die dreidimensionale Kultur der physiologischen extrazellulären Umgebung der Tumorzellen stärker ähneln [83].

Deswegen wurde auf die dreidimensionale Kultur zurückgegriffen, um die zweidimensionalen Kultursysteme zu ergänzen und ihre Nachteile zu minimieren.

4.3 Vor- und Nachteile der *in vitro*-Experimente

Die Durchführung verschiedener neuer Forschungsexperimente am menschlichen Körper ist aufgrund der vielfältigen, möglicherweise unerwünschten Effekte und ihrer negativen Folgen, unethisch. Auch wenn diese Experimente gute Absichten verfolgen, wie ein besseres Verständnis physiologischer oder pathophysiologischer Prozesse oder die Testung neuer Therapieansätze, so bleibt die Forschung am lebendigen humanen Organismus untersagt. Aus diesem Grund musste auf eine angemessene und zweckmäßige Alternative ausgewichen werden. Tierexperimente sind eine dieser Alternativen. Diese sind allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt ethisch vertretbar. Auch für Tierexperimente muss eine Zusage der ethischen Kommission vorliegen, um sicherzustellen, dass die Experimente wirklich gerechtfertigt sind, und um mögliche Gefahren für die Tiere, wie Tod oder Krankheit, vorzubeugen.

Zellkultursysteme stellen hingegen eine interessante Alternative zur *in-vivo*-Form der Experimente dar, insofern dass sämtliche Reaktionen oder Versuche bei dieser *in-vitro*-Variante außerhalb des lebenden Organismus ablaufen können. Dies hat zur Folge, dass viele Vorgänge mit weniger Aufwand untersucht werden können, bevor die Ergebnisse an Tierorganismen und danach am menschlichen Organismus getestet werden müssen [84]. Die mögliche Senkung der Anzahl an Tierexperimenten stellt daher einen Vorteil des *in vitro*-Modells dar.

Insbesondere in der Krebsforschung haben die *in-vitro*-Experimente große Bedeutung. Sie kommen zum Einsatz, um die möglichen Therapieansätze vor der Umsetzung am Patienten zunächst im Labor gründlich zu erforschen. Dies trägt zu einer höheren Effizienz und zu niedrigeren Gesamtkosten bei. Immortalisierte Tumorzelllinien werden aufgrund ihres reproduzierbaren Wachstumsverhaltens gerne in der präklinischen Phase der Krebsforschung eingesetzt [85]. Allerdings haben *in-vitro*-Experimente auch Nachteile. Ein Manko der *in-vitro*-Experimente in dieser Studie ist die Tatsache, dass die verwendeten Zelllinien im Gegenteil zu den Tumorzellen *in vivo* immortalisiert sind. Außerdem sind HNSCCs heterogene, komplexe Tumore [86]. Dies erschwert den Vergleich der Testergebnisse mit echten Tumorfällen. So wurden sämtliche Experimente ausschließlich an homogenen, monozellulären Kulturmodellen durchgeführt. Das Fehlen der Kokultur mit anderen Zelltypen erschwert die genaue Übertragung der Daten aus dieser Studie auf die Patienten.

Zweidimensionale Kultursysteme waren über einen längeren Zeitraum und sind immer noch ein sehr wichtiger Teil der pharmakologischen Forschung und der Medikamentenstudien [87]. Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die *in-vitro*-Experimente nicht nur in der einfachen zweidimensionalen Form, sondern auch in dreidimensionaler Form durchzuführen. Dreidimensionale Kultursysteme wurden auf Anwendbarkeit überprüft und für Gesamtheit der Experimente dieser Studie eingesetzt. Anhand des *in-vitro*-Modells konnte in dieser Arbeit das Hauptergebnis, dass das Ansprechen der Tumorzellen auf die platinbasierte Chemotherapie mit dem Knockout des LRRC8A-Gens in Zusammenhang stehen kann, bestätigt werden.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das dreidimensionale Tumormodell bei verschiedenen Fragestellungen eingesetzt werden. Allerdings waren die Sphäroide monozellulär. Die Anwendung von multizellulären heterogenen Sphäroiden als realistische Tumormodelle kann eine wesentliche Bedeutung für die Krebsforschung haben [88]. Die Integration mehrerer Zelltypen ins Testsystem könnte die Untersuchung der interzellulären Kommunikation und der ganzen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Stromazellen oder anderen Zelltypen wie Endothelzellen, Immunzellen oder Fibroblasten ermöglichen [89]. Dies kann wiederum bedeutsame Informationen über das Wachstum, die Differenzierung, das Metastasierungsverhalten oder auch über die Resistenzentwicklung der Tumorzellen liefern. Ein Teil der unerwünschten Wirkungen der Therapeutika auf die gesunden Körperzellen könnte auch auf diesem Weg erfasst werden.

Platinbasierte Medikamente; insbesondere Cisplatin sind vielversprechende Chemotherapeutika in der Behandlung von HNSCC-Patienten. Der Therapieerfolg wird allerdings durch die gravierenden Nebenwirkungen und die Resistenzentwicklung stark eingeschränkt [90]. Da es beinahe unmöglich ist, die Therapieresistenz komplett zu verhindern, ist es umso wichtiger, ein Verständnis für die Mechanismen der Resistenzentwicklung zu schaffen. Die VRACs sind für die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Cisplatin unerlässlich. Die Resistenzentwicklung hängt mit dem Knockout des LRRC8A-Gens als essenzieller Teil der VRACs zusammen. Sogar Tumorzellen, die von Natur aus resistent gegenüber Cisplatin sind, weisen niedrigere Expressionslevel der VRACs als die WT-Zellen auf [71]. So könnte es in Zukunft sinnvoll sein, noch vor dem Therapiebeginn die Tumorzellen eines jeden HNSCC-Patienten auf LRRC8A-Gen zu sequenzieren, um abhängig von seinem LRRC8A-Status ein individualisiertes Therapieschema für den Patienten zu erstellen, so wie es heute für andere Biomarker, wie UGT1A1 bei metastasierten Kolorektalen Karzinomen durchgeführt wird [91]. UGT1A1 ist ein Biomarker für die Toxizität von Irinotecan. Die Genotypisierung von UGT1A1 kann die Findung der passenden tolerablen Irinotecan-Dosis für die einzelnen Patienten erleichtern. Therapieansätze der HNSCC-Patienten dürften sogar das Ziel haben, die Expression des LRRC8A-Gens soweit möglich zu verstärken, sodass der Influx von Cisplatin positiv beeinflusst wird.

Weiterhin wird es in Zukunft wichtig sein, patientenorientierte Therapieschemata zu etablieren. Denn personalisierte Therapieregime können zukünftig eine zentrale Rolle in der Prognoseverbesserung der HNSCC-Patienten spielen. Patientenorientiert zu therapieren kann für die Betroffenen höhere Ansprechraten, günstigere Nebenwirkungsprofile und damit größere Therapieerfolge bedeuten [71]. Hier könnte das dreidimensionale Tumormodell ein wichtiger Teil der präklinischen Phase in der Therapietestung sein. In Matrigel eingebettete Sphäroide können ein geeignetes Modell für die nachfolgenden Experimente im Rahmen dieser Studie sein. Matrigel ist reich an Laminin, Kollagen IV, Enactin, Growth-Faktor und Proteoglykanen. Durch seine Zusammensetzung kann Matrigel die Formation der Sphäroide beschleunigen und deren Zirkularität verbessern [92].

Besonders interessant für die Optimierung der chemotherapeutischen Versorgung von HNSCC-Patienten ist die Wahl des richtigen platinbasierten Chemotherapeutikums für den jeweiligen Patienten und die Findung der genau passenden Dosierung. Außerdem sollte die Austestung von Kombinationstherapien, z.B. platinbasierte Chemotherapeutika und Strahlentherapie oder Immuncheckpointinhibitoren, an Bedeutung gewinnen. Es wäre denkbar und sinnvoll, diese Kombinationen an den dreidimensionalen Kulturmodellen zu testen, und so auch eine Kombination verschiedener individueller Mutationen oder relevanter Proteinlevels in die Therapiefindung einzubinden.

6 Zusammenfassung

Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen und stehen dabei an sechster Stelle weltweit [93, 94]. Die Therapie dieser Karzinome ist vielseitig und hat in den letzten Jahren viele Fortschritte gemacht. Trotzdem gelten rezidivierende oder fernmetastasierte HNSCCs immer noch als prognostisch ungünstige Tumore [95]. Gründe dafür können die verspätete Diagnose, die Rezidive oder die Therapieresistenz sein [96]. Während die Forschung in diesem Bereich fortschreitet und neue Therapieansätze bzw. Entwicklungen der vorhandenen Therapieansätze erforscht werden, stellt die Entwicklung von Resistenzen gegenüber den verschiedenen Chemotherapeutika eine Hürde für deren Erfolg dar [96]. Das Verständnis der Mechanismen dieser Resistenzentwicklung ist von großer Bedeutung für die Patienten mit fortgeschrittenen und rezidivierenden HNSCCs.

Diese Arbeit zielte auf die Analyse der Rolle eines LRRC8A-Knockouts bei der Resistenzentstehung gegenüber den platinbasierten Chemotherapeutika. Dies erfolgte an der Pica-Zelllinie und im Vergleich zwischen den Wildtyp-Zellen und Zellen mit LRRC8A-Knockout. Die Zellen wurden sowohl in zweidimensionaler als auch in dreidimensionaler Form kultiviert und behandelt. Die Forschung an dreidimensionalen Tumorsphäroiden bietet eine Annäherung zur Reaktion der Tumorzellen im Körper der Patienten und beabsichtigt langfristig die Etablierung von patientenorientierten Therapieschemata [36].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass das LRRC8A-Protein eine große Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber den platinbasierten Chemotherapeutika im Rahmen der Therapie von HNSCC-Patienten spielen kann. Dies wurde sowohl an zwei- als auch an dreidimensionalen Zellmodellen untersucht. Es konnte in dieser Studie durch die Interpretation der Viabilitätsdaten reproduzierbar dargestellt werden, dass Tumorzellen mit einem LRRC8A-Knockout resistenter gegenüber Cisplatin als die Wildtyp-Zellen sind. Außerdem wurde anhand des *wound healing assays* das Migrationsverhalten der Tumorzellen unter Cisplatinbehandlung überprüft. Dieser Assay konnte zeigen, dass die Knockout-Zellen eine stärkere Migration und Proliferation aufweisen, was mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin in Zusammenhang stehen kann.

7 Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|-----------|---|
| 2D | Zweidimensional |
| 3D | Dreidimensional |
| Bzw. | Beziehungsweise |
| C | Celsius |
| C/P | Klinisch/Pathologisch |
| CT | Computertomographie |
| CTLA-4 | cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 |
| Ctr | Copper transporter receptor |
| D(n) | Day (Nummer des Wachstumstags) |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase |
| GFP | Grün Fluoreszierendes Protein |
| Gy | Gray |
| HNO | Hals, Nase und Ohren |
| HNC | Head and neck carcinoma |
| HNSCC | Head and neck squamous cell carcinoma |
| HPV | Humane Papilloma Viren |
| IMRT | Intensitätsmodulierte Radiotherapie |
| ISH | in situ hybridization |
| KO | Knockout |
| LRRC8A | Leucine rich repeat containing 8 VRAC-Subunit A |
| MOA | Mean object area |
| MOT | Mean object totalintensity |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MSV | Mean sphere volume |
| OCT | Organic cation transporter |
| OPSCC | Oropharyngeal squamous cell carcinoma |
| PARP | Poly-ADP-Ribose-Polymerase |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PD-L1 | Programmed cell death ligand 1 |

| | |
|-------|---|
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| RLU | Relative light unit |
| RPM | Revolutions per minute |
| RVD | Regulatory volume decrease |
| T(n) | Treatment (Nummer des Behandlungstags) |
| UICC | Union for International Cancer Control |
| VRAC | Volume regulated anion channels |
| VSOAC | Volume sensitive channels for organic osmolytes |
| WT | Wildtyp |
| Z.B. | Zum Beispiel |

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| ABBILDUNG 1: ENTSTEHUNGSRORTE DER KOPF-HALS-TUMORE UND DAS TYPISCHE HISTOLOGISCHE MUSTER DER HNSCCS [5]..... | 9 |
| ABBILDUNG 2: DARSTELLUNG DER VRAC-FUNKTION [42]. DIE ABBILDUNG ERLÄUTERT DIE PHYSIOLOGIE DER VRACS UND IHRE ROLLE BEI DER ZELLOVLUMENREGULATION. DER AUSSTROM DER KALIUM- UND CHLORIDIONEN ÜBER DIE AKTIVIERTE VOLUMEN-REGULIERTE KANÄLE FÜHRT ZU EINER APOPTISCHEN VOLUMENREDUKTION UND DAMIT ZUR ZELLSCHRUMPFUNG..... | 21 |
| ABBILDUNG 3: BIOPSIE EINES LARYNXKARZINOMS (LINKS OBEN). EINZELZELLEN AUS DERSELBEN CHIRURGISCHEN BIOPSIE (LINKS UNTEN) ZEIGEN EINE STARK POSITIVE EXPRESSION VON EPCAM. DIE PICA-ZELLINIE ALS MONOLAYER-ZELLEN IN KULTUR (RECHTS)..... | 25 |
| ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES AUFBAUS EINES SPHÄROIDS (VERÄNDERT NACH [60]). DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES QUERSCHNITTS IN EINEM SPHÄROID MIT SEINEN DREI SCHICHTEN. DER GRADIENT VON NÄHRSTOFFEN, SAUERSTOFF UND ATP SINKT VON DER PROLIFERATIONSZONE BIS ZUR NEKROTISCHEN ZONE, WAS DIE HÖHERE PROLIFERATIONSRATE IN DER ÄUßEREN SCHICHT BEGRÜNDET. DIE KONZENTRATION DES THERAPEUTIKUMS VERHÄLT SICH GENAUSO. | 26 |
| ABBILDUNG 5: THERMO SCIENTIFIC ARRAYSAN VTI, AUTOMATED HIGH CONTENT SCREENING MICROSCOPE. (BILD: THERMOFISHER.COM)..... | 39 |
| ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG EINES 2-WELLS-CULTURE-INSERT VON IBIDI. (BILD: IBIDI.COM) | 41 |
| ABBILDUNG 7: GRÖßENVARIANZ DER PICA-SPHÄROIDE ÜBER SIEBEN TAGE. D3 STEHT FÜR DEN DRITTEN, D5 FÜR DEN FÜNFTEN UND D7 FÜR DEN SIEBTEN WACHSTUMSTAG. | 46 |
| ABBILDUNG 8: WESTERNBLOT ZUR ANALYSE DES LRRC8A-KNOCKOUTS. DIE EXPRESSION DES LRRC8A-PROTEINS BEI DEN WT-ZELLEN WAR UNVERÄNDERT, WÄHREND SIE BEI DEN KO-ZELLEN FEHLTE. GAPDH DIENT ALS LADKOTROLLE. (ERWARTETES MOLEKULARGEWICHT IN KDA ANGEGEBEN). | 47 |
| ABBILDUNG 9: ZELLVIABILITÄT BEI CISPLATINBEHANDLUNG IN ZWEIDIMENSIONALER KULTUR. PICA WT4 UND KO36 ZELLEN WURDEN FÜR 48 STUNDEN MIT DEN ANGEGEBENEN CISPLATINKONZENTRATIONEN BEHANDELT UND FÜR DEN <i>CELL TITER GLO VIABILITÄTSASSAY</i> GENUTZT. A. LUMINESZENZSIGNALE (RELATIVE LIGHT UNITS, RLU) KORRELIEREN MIT INTRAZELLULÄREM ATP-GEHALT. B. DIE ZELLVIABILITÄT KORRELIERT MIT DEN CISPLATINKONZENTRATIONEN. | 49 |
| ABBILDUNG 11: ZELLVIABILITÄT BEI CARBOPLATINBEHANDLUNG IN ZWEIDIMENSIONALER KULTUR. PICA WT4 UND KO36 ZELLEN WURDEN FÜR 48 STUNDEN MIT DEN ANGEGEBENEN CARBOPLATINKONZENTRATIONEN BEHANDELT UND FÜR DEN <i>CELL TITER GLO VIABILITÄTSASSAY</i> GENUTZT. A. LUMINESZENZSIGNALE (RELATIVE LIGHT UNITS, RLU) KORRELIEREN MIT INTRAZELLULÄREM ATP-GEHALT. B. DIE ZELLVIABILITÄT KORRELIERT MIT DEN CARBOPLATINKONZENTRATIONEN..... | 52 |

| | |
|---|----|
| ABBILDUNG 12: ZELLVIABILITÄT BEI CARBOPLATINBEHANDLUNG IN DREIDIMENSIONALER KULTUR. PICA WT4- UND KO36-SPHÄROIDE WURDEN ÜBER 5 TAGE MIT DEN ANGEGEBENEN CARBOPLATINKONZENTRATIONEN BEHANDELT UND FÜR DEN LUMINESCENT CELL VIABILITY ASSAY GENUTZT. LUMINESZENZSIGNALE (RELATIVE LIGHT UNITS, RLU) KORRELIEREN MIT DER VIABILITÄT DER SPHÄROIDE. | 53 |
| ABBILDUNG 13: LINKS: SPHÄROID AUS PICA-KO-ZELLEN, RECHTS: ZERFALLENES SPHÄROID AUS PICA-WT-ZELLEN. BEIDE SPHÄROIDE WURDEN ÜBER 10 TAGE MIT 20 μ M CISPLATIN BEHANDELT. | 54 |
| ABBILDUNG 14: 48-STUNDEN-AUFNAHME DER WT UND KO-ZELLEN IM RAHMEN <i>DES WOUND HEALING ASSAYS</i> , AUSGEWERTET MITTELS IMAGEJ..... | 56 |
| ABBILDUNG 15: VERGLEICH ZWISCHEN DEN MIT CISPLATIN BEHANDELTEN ZELLEN UND KONTROLLZELLEN BEZÜGLICH DES MIGRATIONSVERHALTENS. DIE GRÖÖÖE DES WUNDESPALTS WURDE NACH 48 STUNDEN GEMESSEN..... | 57 |
| ABBILDUNG 16: DARSTELLUNG DER IC50-WERTE VON A. CISPLATIN UND B. CARBOPLATIN IN ZWEI- UND DREIDIMENSIONALER ZELLKULTUR. GEZEIGT SIND DIE MITTELWERTE AUS JEWEILS DREI WIEDERHOLUNGEN, DIE UNTER DENSELBEN BEDINGUNGEN DURCHGEFÜHRT WURDEN. DIE ZELLEN BZW. SPHÄROIDE WURDEN IN DEN DREI DURCHGÄNGEN MIT DENSELBEN KONZENTRATIONEN BEHANDELT. P= 0,071 (ZWEIDIMENSIONAL), P= 0,052 (DREIDIMENSIONAL) LAUT T-TEST. | 59 |

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| TABELLE 1: KLINISCHE TNM-KLASSIFIKATION [12]. TUMORAUSDEHNUNG (T FÜR TUMOR) AM BEISPIEL DER LIPPEN- UND MUNDHÖHLENKARZINOME..... | 11 |
| TABELLE 2 : KLINISCHE TNM-KLASSIFIKATION [12]. REGIONÄRER LYMPHKNOTENBEFALL (N FÜR NODUS): AM BEISPIEL DES P16-NEGITIVEN OROPHARYNXKARZINOMS..... | 12 |
| TABELLE 3: KLINISCHE TNM-KLASSIFIKATION [12]. REGIONÄRER LYMPHKNOTENBEFALL (N FÜR NODUS): AM BEISPIEL DES P16-POSITIVEN OROPHARYNXKARZINOMS | 12 |
| TABELLE 4: FERNMETASTASIERUNG | 13 |
| TABELLE 5: DAS UICC-STADIUM DER TUMORE ANHAND DER TNM-KLASSIFIKATION [13] | 13 |
| TABELLE 6: LISTE ALLGEMEINER VERBRAUCHSMATERIALIEN..... | 30 |
| TABELLE 7: LISTE DER VERWENDETEN GERÄTE..... | 30 |
| TABELLE 8: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN SOFTWARE-PROGRAMME | 32 |
| TABELLE 9: ZUSAMMENSTELLUNG DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN..... | 32 |
| TABELLE 10: LISTE DER VERWENDETEN PUFFER UND LÖSUNGEN | 34 |
| TABELLE 11: ÜBERSICHT DER KULTURMEDIEN | 34 |
| TABELLE 12: LISTE DER VERWENDETEN KULTURGEFÄßE..... | 34 |
| TABELLE 13: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ZELLINIEN..... | 35 |
| TABELLE 14: ZUSAMMENSTELLUNG DER VERWENDETEN PRIMÄRANTIKÖRPER..... | 35 |
| TABELLE 15: ZUSAMMENSTELLUNG DER VERWENDETEN SEKUNDÄRANTIKÖRPER..... | 35 |

10 Literaturverzeichnis

1. Quante, A.S., et al., *Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030*. *Cancer Med*, 2016. **5**(9): p. 2649-56.
2. Brakenhoff, R.H., S. Wagner, and J.P. Klussmann, *Molecular Patterns and Biology of HPV-Associated HNSCC*. *Recent Results Cancer Res*, 2017. **206**: p. 37-56.
3. Marur, S. and A.A. Forastiere, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment*. *Mayo Clin Proc*, 2016. **91**(3): p. 386-96.
4. Mao, L., *Focus on Head and Neck Cancer*, W.K. Hong, Editor. 2004.
5. Chow, L.Q.M., *Head and Neck Cancer*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(1): p. 60-72.
6. Jou, A. and J. Hess, *Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer*. *Oncol Res Treat*, 2017. **40**(6): p. 328-332.
7. Du, E., et al., *Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status*. *Laryngoscope*, 2019. **129**(11): p. 2506-2513.
8. Gunduz, M., et al., *Cancer Stem Cells in Oropharyngeal Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(15).
9. Jethwa, A.R. and S.S. Khariwala, *Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2017. **36**(3): p. 411-423.
10. McDermott, J.D. and D.W. Bowles, *Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies*. *Curr Treat Options Oncol*, 2019. **20**(5): p. 43.
11. Sheedy, T. and C. Heaton, *HPV-associated oropharyngeal cancer*. *Jaapa*, 2019. **32**(9): p. 26-31.
12. Osazuwa-Peters, N., et al., *Sexual behavior, HPV knowledge, and association with head and neck cancer among a high-risk group*. *Oral Oncol*, 2015. **51**(5): p. 452-6.
13. Tumban, E., *A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers*. *Viruses*, 2019. **11**(10).
14. Sarkola, M., et al., *Human papillomavirus DNA detected in breast milk*. *Pediatr Infect Dis J*, 2008. **27**(6): p. 557-8.
15. Yoshida, K., et al., *The possibility of vertical transmission of human papillomavirus through maternal milk*. *J Obstet Gynaecol*, 2011. **31**(6): p. 503-6.
16. Cramer, J.D., et al., *The changing therapeutic landscape of head and neck cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. **16**(11): p. 669-683.
17. Huang, S.H. and B. O'Sullivan, *Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer*. *Curr Treat Options Oncol*, 2017. **18**(7): p. 40.
18. *KLASSIFIKATION VON TUMOREN (TNM-SYSTEM & GRADING)*. 2015, Krebsgesellschaft.
19. AWMF e.V., D.e.V., DKH e.V., *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms*. 1.1.2019, AWMF-Registernummer: 017 - 076OL.
20. Lewis-Jones, H., S. Colley, and D. Gibson, *Imaging in head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines*. *J Laryngol Otol*, 2016. **130**(S2): p. S28-s31.
21. Lechner, M., et al., *Frequent HPV-independent p16/INK4A overexpression in head and neck cancer*. *Oral Oncol*, 2018. **83**: p. 32-37.
22. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **740**: p. 364-78.
23. Picon, H. and A.K. Guddati, *Mechanisms of resistance in head and neck cancer*. *Am J Cancer Res*, 2020. **10**(9): p. 2742-2751.
24. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cisplatin resistance*. *Oncogene*, 2012. **31**(15): p. 1869-83.

25. He, F., et al., *Regulation of ACSL4-Catalyzed Lipid Peroxidation Process Resists Cisplatin Ototoxicity*. *Oxid Med Cell Longev*, 2022. **2022**: p. 3080263.
 26. Ghosh, S., *Cisplatin: The first metal based anticancer drug*. *Bioorg Chem*, 2019. **88**: p. 102925.
 27. Fury, M.G. and D.G. Pfister, *Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2011. **9**(6): p. 681-9.
 28. Falco, A., et al., *First-line cisplatin, docetaxel, and cetuximab for patients with recurrent or metastatic head and neck cancer: A multicenter cohort study*. *World J Clin Oncol*, 2022. **13**(2): p. 147-158.
 29. Naruse, T., et al., *Multicenter Retrospective Study of Weekly Cetuximab Plus Paclitaxel for Recurrent or Metastatic Oral Squamous Cell Carcinoma*. *Anticancer Res*, 2021. **41**(11): p. 5785-5791.
 30. Dogan, V., et al., *Current studies of immunotherapy in head and neck cancer*. *Clin Otolaryngol*, 2018. **43**(1): p. 13-21.
 31. Postow, M.A., R. Sidlow, and M.D. Hellmann, *Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(2): p. 158-168.
 32. de Sousa, L.G. and R. Ferrarotto, *Pembrolizumab in the first-line treatment of advanced head and neck cancer*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2021. **21**(12): p. 1321-1331.
 33. Palmieri, V.E., et al., *Immune checkpoint inhibitor-induced neurologic toxicity: a case report and literature review*. *Immunotherapy*, 2022.
 34. Ghiani, L. and S. Chiocca, *High Risk-Human Papillomavirus in HNSCC: Present and Future Challenges for Epigenetic Therapies*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(7).
 35. Döscher, J., et al., *[Immunotherapy for HNSCC : Quo vadis?]*. *Hno*, 2016. **64**(10): p. 700-7.
 36. Hagemann, J., et al., *Spheroid-based 3D Cell Cultures Enable Personalized Therapy Testing and Drug Discovery in Head and Neck Cancer*. *Anticancer Res*, 2017. **37**(5): p. 2201-2210.
 37. Ortiz-Cuaran, S., et al., *Precision Medicine Approaches to Overcome Resistance to Therapy in Head and Neck Cancers*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 614332.
 38. Sacco, A.G. and E.E. Cohen, *Current Treatment Options for Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(29): p. 3305-13.
 39. Pedersen, S.F., T.K. Klausen, and B. Nilius, *The identification of a volume-regulated anion channel: an amazing Odyssey*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015. **213**(4): p. 868-81.
 40. Syeda, R., et al., *LRRC8 Proteins Form Volume-Regulated Anion Channels that Sense Ionic Strength*. *Cell*, 2016. **164**(3): p. 499-511.
 41. Pedersen, S.F., Y. Okada, and B. Nilius, *Biophysics and Physiology of the Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)/Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Anion Channel (VSOR)*. *Pflugers Arch*, 2016. **468**(3): p. 371-83.
 42. Chen, L., et al., *More than just a pressure relief valve: physiological roles of volume-regulated LRRC8 anion channels*. *Biol Chem*, 2019. **400**(11): p. 1481-1496.
 43. Planells-Cases, R., et al., *Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs*. *EMBO J*, 2015. **34**(24): p. 2993-3008.
 44. Zhou, P., M.M. Polovitskaya, and T.J. Jentsch, *LRRC8 N termini influence pore properties and gating of volume-regulated anion channels (VRACs)*. *J Biol Chem*, 2018. **293**(35): p. 13440-13451.
-

-
45. Chen, X., et al., *Regulation of Anion Channel LRRC8 Volume-Regulated Anion Channels in Transport of 2'3'-Cyclic GMP-AMP and Cisplatin under Steady State and Inflammation*. J Immunol, 2021. **206**(9): p. 2061-2074.
 46. Osei-Owusu, J., et al., *Molecular Biology and Physiology of Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)*. Curr Top Membr, 2018. **81**: p. 177-203.
 47. Friard, J., et al., *LRRC8/VRAC Channels and the Redox Balance: A Complex Relationship*. Cell Physiol Biochem, 2021. **55**(S1): p. 106-118.
 48. Xu, R., X. Wang, and C. Shi, *Volume-regulated anion channel as a novel cancer therapeutic target*. Int J Biol Macromol, 2020. **159**: p. 570-576.
 49. Jentsch, T.J., et al., *VRAC: molecular identification as LRRC8 heteromers with differential functions*. Pflugers Arch, 2016. **468**(3): p. 385-93.
 50. Bertelli, S., et al., *Mechanisms of Activation of LRRC8 Volume Regulated Anion Channels*. Cell Physiol Biochem, 2021. **55**(S1): p. 41-56.
 51. Wilczyński, B., et al., *The Role of Chloride Channels in the Multidrug Resistance*. Membranes (Basel), 2021. **12**(1).
 52. Maeno, E., T. Tsubata, and Y. Okada, *Apoptotic Volume Decrease (AVD) Is Independent of Mitochondrial Dysfunction and Initiator Caspase Activation*. Cells, 2012. **1**(4): p. 1156-67.
 53. Makovec, T., *Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy*. Radiol Oncol, 2019. **53**(2): p. 148-158.
 54. Sørensen, B.H., et al., *Dual role of LRRC8A-containing transporters on cisplatin resistance in human ovarian cancer cells*. J Inorg Biochem, 2016. **160**: p. 287-95.
 55. Hoffmann, E.K., et al., *Role of volume-regulated and calcium-activated anion channels in cell volume homeostasis, cancer and drug resistance*. Channels (Austin), 2015. **9**(6): p. 380-96.
 56. Hoffmann, E.K. and I.H. Lambert, *Ion channels and transporters in the development of drug resistance in cancer cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1638): p. 20130109.
 57. Mack, B., et al., *Rapid and non-enzymatic in vitro retrieval of tumour cells from surgical specimens*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55540.
 58. Redman, M., et al., *What is CRISPR/Cas9?* Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2016. **101**(4): p. 213-5.
 59. Gupta, D., et al., *CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing*. Life Sci, 2019. **232**: p. 116636.
 60. Amitai, G. and R. Sorek, *CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(2): p. 67-76.
 61. Philippeos, C., et al., *Introduction to cell culture*. Methods Mol Biol, 2012. **806**: p. 1-13.
 62. Haycock, J.W., *3D cell culture: a review of current approaches and techniques*. Methods Mol Biol, 2011. **695**: p. 1-15.
 63. Nunes, A.S., et al., *3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs*. Biotechnol Bioeng, 2019. **116**(1): p. 206-226.
 64. Koledova, Z., *3D Cell Culture: An Introduction*. Methods Mol Biol, 2017. **1612**: p. 1-11.
 65. Hoarau-Véchet, J., et al., *Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?* Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
 66. Costa, E.C., et al., *3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis*. Biotechnol Adv, 2016. **34**(8): p. 1427-1441.
-

67. Verjans, E.T., et al., *Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort?* J Cell Physiol, 2018. **233**(4): p. 2993-3003.
 68. Katt, M.E., et al., *In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform*. Front Bioeng Biotechnol, 2016. **4**: p. 12.
 69. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. Assay Drug Dev Technol, 2014. **12**(4): p. 207-18.
 70. Mack, B., *Rapid and Non-Enzymatic In Vitro Retrieval of Tumour Cells from Surgical Specimens* 2013, PLoS ONE p. 9.
 71. Siemer, S., et al., *Profiling Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer: A Critical Role of the VRAC Ion Channel for Chemoresistance*. Cancers (Basel), 2021. **13**(19).
 72. Siemer, S., et al., *Targeting Cancer Chemotherapy Resistance by Precision Medicine-Driven Nanoparticle-Formulated Cisplatin*. ACS Nano, 2021.
 73. Hannah, R., *CellTiter-Glo™ luminescent cell viability assay: A sensitive and rapid method for determining cell viability*. 2001.
 74. Voss, F.K., et al., *Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC*. Science, 2014. **344**(6184): p. 634-8.
 75. Shen, M.R., et al., *Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells*. J Physiol, 2000. **529 Pt 2**(Pt 2): p. 385-94.
 76. Rosendo-Pineda, M.J., C.M. Moreno, and L. Vaca, *Role of ion channels during cell division*. (1532-1991 (Electronic)).
 77. Zhang, H., et al., *High expression of leucine-rich repeat-containing 8A is indicative of a worse outcome of colon cancer patients by enhancing cancer cell growth and metastasis*. Oncol Rep, 2018. **40**(3): p. 1275-1286.
 78. Lu, P., et al., *SWELL1 promotes cell growth and metastasis of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo*. EBioMedicine, 2019. **48**: p. 100-116.
 79. Ho, G.Y., N. Woodward, and J.I. Coward, *Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **102**: p. 37-46.
 80. Karpińska, A., et al., *Quantitative analysis of biochemical processes in living cells at a single-molecule level: a case of olaparib-PARP1 (DNA repair protein) interactions*. Analyst, 2021. **146**(23): p. 7131-7143.
 81. Kapałczyńska, M., et al., *2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures*. Arch Med Sci, 2018. **14**(4): p. 910-919.
 82. Wang, H., et al., *3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration*. Clin Transl Sci, 2021. **14**(5): p. 1659-1680.
 83. Sarwar, M. and J.J. Evans, *Bioimprinting: bringing together 2D and 3D in dissecting cancer biology*. Biotechniques, 2021.
 84. Saeidnia, S., A. Manayi, and M. Abdollahi, *From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons*. Curr Drug Discov Technol, 2015. **12**(4): p. 218-24.
 85. Kumar, S., S. Bajaj, and R.B. Bodla, *Preclinical screening methods in cancer*. Indian J Pharmacol, 2016. **48**(5): p. 481-486.
 86. Alshafi, E., et al., *Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges*. Cell Death Dis, 2019. **10**(8): p. 540.
 87. Jaroch, K., A. Jaroch, and B. Bojko, *Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment*. J Pharm Biomed Anal, 2018. **147**: p. 297-312.
 88. Jensen, C., C. Shay, and Y. Teng, *The New Frontier of Three-Dimensional Culture Models to Scale-Up Cancer Research*. Methods Mol Biol, 2022. **2343**: p. 3-18.
-

-
89. Shannon, A.E., C.E. Boos, and A.B. Hummon, *Co-culturing multicellular tumor models: Modeling the tumor microenvironment and analysis techniques*. *Proteomics*, 2021. **21**(9): p. e2000103.
 90. Falco, A., et al., *Ibero-American Expert Consensus on Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treatment in Patients Unable to Receive Cisplatin: Recommendations for Clinical Practice*. *Cancer Manag Res*, 2021. **13**: p. 6689-6703.
 91. Riera, P. and D. Páez, *Elucidating the role of pharmacogenetics in irinotecan efficacy and adverse events in metastatic colorectal cancer patients*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2021: p. 1-7.
 92. Badea, M.A., et al., *Influence of Matrigel on Single- and Multiple-Spheroid Cultures in Breast Cancer Research*. *SLAS Discov*, 2019. **24**(5): p. 563-578.
 93. Farah, C.S., *Molecular landscape of head and neck cancer and implications for therapy*. *Ann Transl Med*, 2021. **9**(10): p. 915.
 94. Klapper, L., et al., *NR2F6 as a Prognostic Biomarker in HNSCC*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(15).
 95. Botticelli, A., et al., *The Role of Soluble LAG3 and Soluble Immune Checkpoints Profile in Advanced Head and Neck Cancer: A Pilot Study*. *J Pers Med*, 2021. **11**(7).
 96. Bhat, G.R., R.G. Hyole, and J. Li, *Head and neck cancer: Current challenges and future perspectives*. *Adv Cancer Res*, 2021. **152**: p. 67-102.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich sämtliche Experimente und Versuche gemäß meines besten Wissens durchgeführt und die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe.

Die gesamten Experimente wurden nach Anleitung durch Fachpersonal in Eigenarbeit durchgeführt.

Alle Inhalte und bildliche Darstellungen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Publikationen übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht worden. Das Kapitel „Literaturverzeichnisse“ gibt Auskunft über die von mir genutzten Literatur und Quellen.

Mainz, 20.02.2023
