

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Claus Belka

**Inhärente zelluläre Strahlenresistenz von
Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen:
Strahleninduzierte zelluläre Seneszenz als entscheidender
Faktor**

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

vorgelegt von
Seyd Shnayien

aus
Bagdad

2019

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

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires

Prof. Dr. rer. nat. Horst Zitzelsberger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Linda Kinzel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 2019

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann unterstützt.

Für meine Familie und Freunde

لحائتي وأصدقائي

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	7
2	Abbildungsverzeichnis	10
3	Tabellenverzeichnis.....	11
4	Abkürzungsverzeichnis	12
4.1	Einheiten	12
4.2	Weitere Abkürzungen.....	12
5	Einführung.....	17
5.1	Tumoren	17
5.2	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome	17
5.3	Molekularbiologie der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome	18
5.4	Strahlentherapie und Strahlenresistenz	20
5.5	DNA-Schadensreparaturantwort.....	21
5.6	Zelltodmechanismen	23
5.6.1	Apoptose.....	24
5.6.2	Mitotische Katastrophe.....	25
5.6.3	Nekrose	26
5.6.4	Seneszenz.....	26
5.7	Linear-quadratisches Modell	27
6	Fragestellung	29
7	Material.....	30
7.1	Zelllinien.....	30
7.2	Kits	31
7.3	Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	32
7.4	Einwegmaterialien	33
7.5	Laborgerätschaften	34
7.6	Oligonukleotidprimer für qRT-PCR.....	35
7.7	Software.....	38
8	Methoden	39
8.1	Routinearbeiten in der Zellkultur.....	39
8.1.1	Zellhaltung	39
8.1.2	Mediumwechsel.....	39

8.1.3	Passagieren.....	39
8.1.4	Kryokonservierung	40
8.1.5	Zellzahlbestimmung	40
8.2	Zellbestrahlung	40
8.3	Aufbereitung der pharmakologische Wirkstoffe.....	41
8.3.1	Metformin.....	41
8.3.2	Olaparib und z-VAD-fmk	41
8.4	Zellbiologische Methoden	41
8.4.1	Messung des klonogenen Überlebens	41
8.4.2	Detektion von strahlungsinduzierter Apoptose.....	43
8.4.3	Detektion von strahlungsinduzierter Seneszenz	45
8.5	Konditioniertes Medium seneszenten Zellen	47
8.6	Molekularbiologische Methoden	48
8.6.1	RNA-Extraktion.....	48
8.6.2	RNA-Quantifizierung	49
8.6.3	Reverse Transkription zur cDNA-Synthese.....	50
8.6.4	qRT-PCR zur Genexpressionsanalyse.....	51
8.6.5	PCR zur Bestimmung des HPV-Status	52
8.6.6	RT-PCR zur Bestimmung des <i>TP53</i> -Status	53
8.7	Statistische Grundlagen	53
8.7.1	Hauptkomponentenanalyse	53
8.7.2	Statistische Signifikanz	54
8.8	In-vivo-Experimente	54
9	Ergebnisse.....	55
9.1	HPV- und <i>TP53</i> -Status der HNSCC-Zelllinien	55
9.2	Klonogenes Überleben und die Berechnung des Strahlenresistenzindex	56
9.3	Genexpressionslevels verschiedener DNA-Schadensreparaturantwort-Regulatoren korrelieren nicht mit der Strahlenresistenz	61
9.4	Strahlungsinduzierte Apoptose korreliert nicht mit der Strahlenresistenz.....	64
9.5	Strahlungsinduzierte Seneszenz korreliert mit der Strahlenresistenz	67
10	Diskussion.....	71
10.1	Die Vorteile des Strahlenresistenzindex gegenüber dem LQ-Modell	71
10.2	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp: die andere Seite der Seneszenz.....	73

10.3	Metformin: ein vielversprechender Ansatz für die multimodale HNSCC-Strahlentherapie	75
10.4	Offene Fragen und Ausblick	76
11	Zusammenfassung	78
12	Literaturverzeichnis.....	80
13	Eidesstattliche Erklärung: Seyd Shnayien.....	85
14	Danksagung.....	86
15	Lebenslauf	87

2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genotoxischer Stress führt zu einer Vielzahl von DNA-Schäden.....	22
Abb. 2: IR induziert unterschiedliche Zelltodmechanismen	24
Abb. 3: Visualisierung der Zellkolonien nach Färbung	42
Abb. 4: Exemplarische FACS-Plots der verschiedenen Zellzyklus-Phasen nach PI-Färbung	45
Abb. 5: Exemplarische FACS-Plots der C12-FDG-Messung zur Identifikation der seneszenten Zellpopulation	47
Abb. 6: Klonogenes Überleben und die Berechnung des Strahlenresistenzindex	56
Abb. 7: Genexpressionslevels verschiedener DDR-Regulatoren korrelieren nicht mit der Strahlenresistenz.....	61
Abb. 8: Strahlungsinduzierte Apoptose korreliert nicht mit der Strahlenresistenz.....	64
Abb. 9: Strahlungsinduzierte Seneszenz korreliert mit der Strahlenresistenz ..	67
Abb. 10: Die limitierte Aussagekraft des α/β-Werts	71
Abb. 11: Die verschiedenen Auswirkungen des SASP.....	74

3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zelllinien.....	30
Tab. 2: Kits.....	31
Tab. 3: Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	32
Tab. 4: Einwegmaterialien	33
Tab. 5: Laborgerätschaften	34
Tab. 6: Oligonukleotidprimer für qRT-PCR.....	35
Tab. 7: Zusammensetzung des PI-Färbepuffers.....	44
Tab. 8: Zusammensetzung der Reagenzien für die RNA-Denaturierung	50
Tab. 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT	50
Tab. 10: Thermocycler Programm für die RT.....	50
Tab. 11: Zusammensetzung der Reagenzien für die qRT-PCR	51
Tab. 12: qRT-PCR-Programm zur Genexpressionsanalyse	51
Tab. 13: Zusammensetzung der Reagenzien für die PCR zur Bestimmung des HPV-Status.....	52
Tab. 14: PCR-Programm zur Bestimmung des HPV-Status.....	52
Tab. 15: RT-PCR-Thermocycler Programm zur Bestimmung des <i>TP53</i> -Status	53
Tab. 16: Wertebereich des Pearson-Korrelationskoeffizienten	54
Tab. 17: HPV- und <i>TP53</i> -Status der HNSCC-Zelllinien.....	55

4 Abkürzungsverzeichnis

4.1 Einheiten

c	Centi (10^{-2})
°C	Grad Celsius
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde
l	Liter
min	Minuten
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
m ³	Kubikmeter
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
rpm	Umdrehung pro Minute
s	Sekunde

4.2 Weitere Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM and Rad3-related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist killer</i>
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell-Lymphoma 2 protein</i>
BER	Basenexzisionsreparatur

BLM	<i>Bloom syndrome RecQ like helicase</i>
BPE	Rinderhypophysenextrakt
BRCA1/-2	<i>Breast cancer type 1/-2 susceptibility protein</i>
BRIP1	<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
β2M	β-2-Mikroglobulin
ca.	Circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	Komplementäre DNA
CDK4/-6	Zyclin-abhängige-Kinase 4/-6
cGAS	GMP-AMP-Synthase
CHK1/-2	<i>Checkpoint kinase 1/-2</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C12-FDG	5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCLRE1C	<i>DNA cross-link repair 1C</i>
DDR	DNA-Schadensreparaturantwort <i>DNA Damage Response</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DNA-SSB	DNA-Einzelstrangbruch
DNA-PKCS	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DNA2	<i>DNA replication helicase/nuclease 2</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dT	Desoxythymidin
δ-ALAS	δ-Aminolävulinatsynthase
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
et al.	Et alii
ERCC1/-2	<i>Excision repair cross-complementation group 1/-2</i>
EXO1	<i>Exonuclease 1</i>
Fa.	Firma
FACS	Durchflusszytometer
FANCA	<i>Fanconi anemia complementation group A</i>
FBS	Fötale Kälberserum
FEN1	<i>Flap endonuclease 1</i>
Fig.	<i>Figure</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
gDNA	genomische DNA
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HNSCC	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom <i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	Humane Papillomviren
HR	Homologe Rekombination
HUS1	<i>Checkpoint protein HUS1</i>
IFN	Typ-I-Interferon
IκB	Inhibitor des kappaB
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IR	Ionisierende Strahlung

IRF3	Interferon-Regulator-Faktor-3
KFM	<i>Keratinocyte full medium</i>
KU70/-80	Ku-Protein 70/-80
LIG4	DNA Ligase 4
LQ-Modell	Linear-quadratische-Modell
MRE11	<i>Double-strand break repair protein MRE11</i>
MOMP	Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran
MTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NBS1	Nibrin
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PARP1/-2	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1/-2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PE	Plattierungseffizienz
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKB	Protein-Kinase-B
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RAD1/-9	<i>Cell cycle checkpoint control protein RAD1/-9</i>
RB	Retinoblastom-Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PS	Penicillin-Streptomycin
p21/-53/-63/-73	Protein 21/-53/-63/-73
RBBP8	<i>Retinoblastoma binding protein 8</i>
rEGF	Rekombinanter-epidermaler-Wachstumsfaktor

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPA1	<i>Replication protein A1</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SCM	Konditioniertes Medium seneszenten Zellen
SF	Überlebensfraktion
SFx	Überlebensfraktion nach x Gy
SSC	Seitwärtsstreulicht
SFM	Serumfreies Kulturmedium
SSBR	Einzelstrangreparatur
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	Tumor Protein 53
U	Einheit
VEGF	Vaskulärer-Endothelialer-Wachstumsfaktor
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC1/-2/-3/-4	<i>X-Ray repair cross-complementing 1/-2/-3/-4</i>
z.B.	zum Beispiel
z-VAD-fmk	Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-methyl]-Fluoromethylketone
18S rRNA	18S ribosomale RNA

5 Einführung

5.1 Tumoren

Der Begriff Tumor entspringt dem Lateinischen und bedeutet sowohl Schwellung als auch Geschwulst. In der Medizin versteht man darunter eine benigne (gutartige) oder maligne (bösartige) Neoplasie von Körpergewebe, die durch eine Mutation oder Virusinfektion verursachte Fehlregulation des Zellwachstums entsteht. Bösartige Tumoren werden umgangssprachlich als Krebs bezeichnet.

In den Industriestaaten stellt die Erkrankung an malignen Tumoren mit rund 14 Millionen Neuerkrankungen und 8 Millionen Todesfällen im Jahr 2012 die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislaufkrankungen dar (Stewart et al. 2014). In Deutschland hat die Inzidenz der Tumorerkrankungen zwischen 1980 und 2013 stark zugenommen. Während im Jahr 1980 rund 124.000 Männer neu an Krebs erkrankten, erhöhte sich die Inzidenz im Jahr 2013 auf rund 253.000. Bei Frauen erhöhte sich die Inzidenz im gleichen Zeitraum von 145.000 auf rund 223.000. Ein großer Teil des Inzidenzanstiegs wird auf die steigende Lebenserwartung der deutschen Gesellschaft zurückgeführt (Barnes et al. 2016; Bertz et al. 2010).

5.2 Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome

HNSCCs (Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome, *Head and neck squamous cell carcinomas*) entstehen in der Mundhöhle, Oropharynx, Nasopharynx, Hypopharynx oder Larynx und stellen weltweit die sechsthäufigste Tumorerkrankung mit rund 600.000 neuen Fällen pro Jahr dar. Die derzeitige 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 40%. Zu den wichtigsten Risikofaktoren für Mutationen im Hinblick auf die HNSCC-Karzinogenese zählen der Tabak- und der Alkoholkonsum. Im Bereich des Oropharynx ist die Infektion mit Hochrisiko-humanen Papillomviren (HPV16, -18, -31, -33 und -35) ein weiterer wichtiger Risikofaktor (Pannone et al. 2011). In der westlichen Welt ist die Inzidenz in den letzten zehn Jahren zurückgegangen, was auf eine Abnahme der Prävalenz des Tabakkonsums zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu wurde eine

Zunahme der HPV-assoziierten Untergruppe berichtet (Leemans et al. 2011).

Die chirurgische Resektion mit anschließender Radiochemotherapie ist die wichtigste Option in der Behandlung von HNSCCs. In lokal fortgeschrittenen HNSCCs ist eine Resektion jedoch aufgrund der komplexen Anatomie, der Radikalität der Operation und dem damit verbundenen Verlust an Funktion und Lebensqualität, sowie der äußerlichen Stigmatisierung nur eingeschränkt möglich. Daher ist die definitive Strahlentherapie, in der Regel in Form einer kombinierten Radiochemotherapie, von zentraler Bedeutung (Seiwert et al. 2007). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren zielgerichtete molekulare Therapiestrategien entwickelt, die zu einer Verbesserung der lokalen Kontrolle und des Gesamtüberlebens beigetragen haben und vor allem für nicht Chemotherapie-fähige Patienten von Bedeutung sind. Zu nennen ist hier die Kombination der Strahlentherapie mit dem EGFR (epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor) Inhibitor Cetuximab, die zu einer Verlängerung des mittleren Gesamtüberlebens um 20 Monate im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie führte (Bonner et al. 2006). Nichtsdestotrotz lag das 5-Jahres-Überleben in der Strahlentherapie/Cetuximab-Gruppe der Bonner-Studie bei nur 45,6% (im Vergleich zu 36,4% in der Strahlentherapie-Gruppe). Zudem zeigten mehr als 50% der Patienten mit Radiochemotherapie einen Relaps mit Lokalrezidiven und/oder Fernmetastasen (Bonner et al. 2010). Es gibt also weiterhin großen Optimierungsbedarf. Ein zentraler Punkt in dieser Hinsicht ist die inhärente zelluläre Resistenz vieler HNSCCs gegenüber Strahlen- und/oder Chemotherapie, die eine häufige Ursache für ein Tumorrezidiv und der damit verbundenen schlechten Prognose ist (Weichselbaum et al. 1988).

5.3 Molekularbiologie der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome

Da 95% der Kopf-Hals-Tumoren Plattenepithelkarzinome sind, lässt sich irrtümlicherweise vermuten, dass HNSCCs relativ homogen sind. Tatsächlich handelt es sich bei HNSCCs jedoch um eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren (Leemans et al. 2011).

Der prominenteste Unterschied in der Molekularbiologie der HNSCCs ist die Differenzierung zwischen HPV-assoziierten und nicht HPV-assoziierten HNSCCs. HPV ist ein Virus mit mehr als 100 Subtypen, von denen insbesondere Typ 16 an der

Entwicklung von oropharyngealen Tumoren beteiligt ist und für ungefähr 20% der HNSCCs verantwortlich ist. Das HP-Virus enthält die zwei Onkogene E6 und E7, deren Expression zu einer Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 (Protein 53) und RB (Retinoblastom-Protein) führt. Diese Inaktivierungen haben eine Störung der Zellzyklusregulation der infizierten Zellen zur Folge und stellen das auslösende Moment für die HPV-vermittelte Karzinogenese dar. HPV-assoziierte HNSCCs haben eine günstigere Prognose als HNSCCs, die aufgrund somatischer Mutationen entstanden sind (Leemans et al. 2011).

Die häufigste somatische Mutation nicht HPV-assoziiierter HNSCCs, die in 60–80% aller Patienten gefunden wird, ist die Mutation des *TP53* (Tumor Protein 53) Gens, das für das Tumorsuppressorprotein p53 codiert (Leemans et al. 2011). p53 spielt eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl kritischer zellulärer Funktionen, einschließlich der Induktion des Zellzyklusstillstands nach DNA-Schäden sowie der Einleitung der Apoptose oder Seneszenz, wenn DNA-Schäden über die Zellreparaturkapazität hinausgehen. Obwohl angenommen wird, dass die Aufhebung der p53-Funktion durch somatische Mutationen oder HPV-bedingte E6-Expression einen der ersten Schritte in der HNSCC-Karzinogenese darstellt, zeigen ungefähr 20% der HNSCCs keine p53-Inaktivierung. Diese Zellen unterliegen einer p53-unabhängigen malignen Progression (Leemans et al. 2011).

Ein weiteres Merkmal der HNSCC-Molekularbiologie ist die Überexpression und/oder Mutation des *EGFR*-Gens. Das EGFR-Protein ist ein Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität, der insbesondere in epithelialen Zellen vorkommt und in zahlreichen Tumorarten verändert ist. Die Bindung eines Liganden an EGFR führt durch die Aktivierung des MAP (*Mitogen-activated protein*) oder des PI3K/PKB (Phosphoinositid-3-Kinase, Protein-Kinase-B) Signalwegs zur Regulation der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums, der Proliferation, Invasion und Metastasierung (Leemans et al. 2011; Riaz et al. 2014). Die häufigste Art der EGFR-Mutation, die in 42% aller HNSCCs gefunden wird, ist als EGFR-Variante III bekannt. Diese Mutation ist Folge einer Deletion der Exonen 2–7 des *EGFR*-Gens, was zur Folge hat, dass mutierte EGFR-Proteine unfähig sind Liganden zu binden und auch ohne Ligation den nachgeschalteten Signalweg aktivieren können (Leemans et al. 2011).

Der NF- κ B (*Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Signalweg ist ein weiterer Mediator, der in der HNSCC-Karzinogenese häufig hochreguliert ist.

Bei NF- κ B handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der in den meisten Zellen als Reaktion auf eine Vielzahl von Stimuli induziert wird und die Transkription von Genen moduliert, deren Produkte unter anderem die maligne Progression fördern, einschließlich der Zytokine TNF (Tumornekrosefaktor), IL-1 und -6 (Interleukin-1 und -6), sowie der Wachstumsfaktoren EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) und HGF (Hepatozyten-Wachstumsfaktor) (Cohen et al. 2010).

5.4 Strahlentherapie und Strahlenresistenz

Die Strahlentherapie ist die medizinische Anwendung von IR (ionisierender Strahlung) zur kurativen oder palliativen Tumortherapie, indem sie sich die Eigenschaft der IR, die Klonogenität maligner Zellen zu abrogieren, zu Nutze macht. Ungefähr 50% aller Krebspatienten erhalten eine Strahlentherapie, entweder allein oder in Kombination mit anderen Behandlungsmodalitäten wie einer Operation oder Chemotherapie (Begg et al. 2011). Die Strahlung kann entweder durch eine äußere Strahlenquelle perkutan verabreicht werden (Teletherapie) oder die Strahlenquelle wird in natürliche bzw. künstliche Körperhöhlen zur in-situ-Bestrahlung eingebracht (Brachytherapie).

Auf molekularer Ebene beeinflusst die IR das Tumorstadium durch eine Schädigung der DNA entweder durch direkte Wechselwirkungen oder indirekt durch Hydrolyse und Erzeugung von Radikalspezies, die den Ionisationseffekt indirekt vermitteln. In sauerstoffhaltiger Umgebung wird dies durch die Reaktion der Primärradikale mit Sauerstoff und die Bildung verschiedener ROS (reaktiver Sauerstoffspezies) noch weiter verstärkt.

In lokal fortgeschrittenen HNSCCs ist die Strahlentherapie in der Regel in Form einer kombinierten Radiochemotherapie im adjuvanten (nach Tumorresektion) oder definitiven, primären Setting (ohne vorherige Operation) ein wesentliches Behandlungsinstrument. Trotz guter Ansprechraten treten häufig Rezidive auf, wobei die inhärente Strahlenresistenz als zentrale Ursache hierfür angesehen wird (Perri et al. 2015).

Unter den verschiedenen Mechanismen, die als mögliche Ursache für die Strahlenresistenz in Betracht kommen, wurden intrazelluläre Regulatoren, die primär

an der DDR (DNA-Schadensreparaturantwort) beteiligt sind, identifiziert (Perri et al. 2015). Beispiele sind PARP1 und 2 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 und 2) oder RAD51, die wichtige Vermittler in der Reparatur von DNA-DSBs (DNA-Doppelstrangbrüchen) und im Falle von PARP1/-2 außerdem des BER-Mechanismus (Basen-Exzisionsreparatur-Mechanismus) sind. Die Überexpression solcher DDR-Regulatoren wird in vielen Tumoren beobachtet und korreliert mit einer erhöhten Strahlenresistenz (Kim et al. 2015).

Abgesehen von Mutationen und der Überexpression verschiedener DDR-Regulatoren hat sich die parakrine tumorfördernde Wirkung Seneszenz-assoziiierter Faktoren herauskristallisiert. Die Seneszenz ist ein biologischer Zelltodmechanismus, der das Wachstum von Zellen irreversibel hemmt und zu einem permanenten Austritt aus dem Zellzyklus führt. Dabei bleiben senescente Zellen metabolisch aktiv und sind in der Lage ein großes Repertoire an Faktoren zu sezernieren, die pleiotrope Effekte auf umliegende Nachbarzellen haben. Man spricht vom SASP (Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp). Er umfasst Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und andere Faktoren und kann Proliferation, Invasivität, Angiogenese und Immunantworten maßgeblich beeinflussen (Coppé et al. 2010).

5.5 DNA-Schadensreparaturantwort

Alle Organismen sind im Laufe ihrer Existenz genotoxischem Stress, wie DNA-Replikationsfehlern, Onkogenaktivierung und/oder IR, ausgesetzt. Die resultierenden DNA-Schäden umfassen unter anderem Basenschäden, DNA-SSBs (DNA-Einzelstrangbrüche) und DNA-DSBs (siehe Abb. 1). Um die Information, die das Erbgut jeder einzelnen Zelle enthält, zu bewahren und zu reparieren, aktivieren gesunde Zellen wie auch Tumorzellen – wenn möglich – Reparatursysteme, wie BER für Basenschäden, SSBR (Einzelstrangreparatur) für DNA-SSBs, HR (Homologe Rekombination) und NHEJ (*Non-homologous end joining*) für DNA-DSBs. Gemeinsam mit Signalkaskaden, die Zellzyklusprogression und Zelltodmechanismen regulieren, wird dies als DDR bezeichnet.

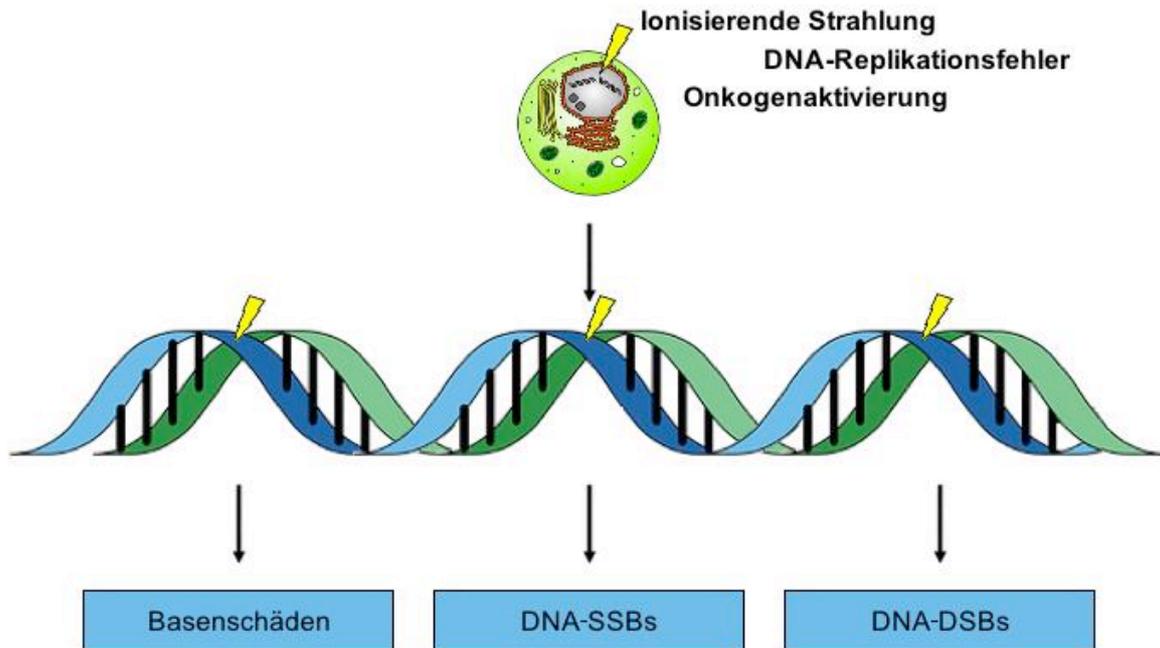


Abbildung 1: Genotoxischer Stress führt zu einer Vielzahl von DNA-Schäden

Zu den verschiedenen Arten von DNA-Schäden, die durch genotoxischen Stress erzeugt werden, gehören beschädigte Nukleinbasen, DNA-Einzelstrangbrüche (DNA-SSBs) und DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs).

Im Rahmen der schadensvermittelten Signalkaskaden der DNA-Reparatur, müssen DNA-Schaden zunächst erkannt werden. Der ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) Signalweg spielen dabei eine entscheidende Rolle. Die Sensorproteine für die Einleitung des ATM-Signalwegs sind der MRN-Komplex, bestehend aus MRE11-RAD50-NBS1 (*Double-strand break repair protein MRE11, DNA repair protein RAD50, Nibrin*). An der Aktivierung des ATR-Signalwegs sind ATRIP (*ATR interacting protein*) und die 9-1-1-Klammer, bestehend aus RAD9-RAD1-HUS1 (*Cell cycle checkpoint control protein RAD9, Cell cycle checkpoint protein RAD1, Checkpoint protein HUS1*) maßgeblich beteiligt. ATM und ATR phosphorylieren und aktivieren anschließend die jeweiligen Effektorproteine, CHK1 (*Checkpoint kinase 1*) und CHK2 (*Checkpoint kinase 2*). Gemeinsam initiieren diese vier Proteinkinasen verschiedene Signalkaskaden die in nachgeschalteten Effektoren wie p53 und CDC25 (*Cell division cycle 25*) münden und abhängig von Zellzyklusphase sowie Typ und Ausmaß der DNA-Schäden in DDR, transienten oder permanenten Zellzyklus-Arrest und/oder Zelltod gipfeln (Delacroix et al. 2007; Jackson et al. 2009).

DNA-DSBs sind die schwerwiegendste Form von DNA-Schäden (Begg et al. 2011).

Aufgrund der hohen Relevanz der DNA-DSBs für die Integrität des zellulären Genoms existieren eine Reihe an komplexen DNA-Reparaturmechanismen, bei denen der HR- und NHEJ-Mechanismus zentrale Rollen einnehmen (Mahaney et al. 2009; Morgan et al. 2015). NHEJ und HR sind zwei mechanistisch fundamental unterschiedliche Prozesse. NHEJ ist im gesamten Zellzyklus aktiv und gilt als der wichtigste Mechanismus für die Reparatur von strahleninduzierten DNA-DSBs in menschlichen Zellen. Im einfachsten Sinne führt NHEJ zu der direkten Verknüpfung von DNA-Enden. Dies beginnt nach der Erkennung von DNA-DSBs durch ATM-CHK2 und ATR-CHK1 mit der Bindung der KU70- und KU80-Heterodimere (Ku-Protein), was zu der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Regulatoren, wie DNA-PKCS (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), XLF (*XRCC4-like factor*) und des XRCC4/LIG4-Komplexes (*X-Ray repair cross-complementing 4, DNA Ligase 4*), führt. Da jedoch strahleninduzierte DNA-Schäden komplex sind und häufig nicht-ligierbare Endgruppen enthalten, kann dies zum Verlust von Nukleotiden führen, wodurch NHEJ sehr fehleranfällig ist.

Im Gegensatz zu NHEJ ist HR die genauere Form der DNA-DSBs Reparatur die nur in der späten S/G2-Phase möglich ist und eine unbeschädigte Schwesterchromatide als DNA-Vorlage benötigt (Mahaney et al. 2009). Diese Schwesterchromatide wird durch RPA1 (*Replication protein A1*) gebunden. Von BRCA2 (*Breast cancer type 2 susceptibility protein*) initiiert, verdrängt RAD51 RPA1 und vermittelt nachfolgend die Reparatur des DNA-Schadens (Morgan et al. 2015; Nowsheen et al. 2012).

5.6 Zelltodmechanismen

Wenn DNA-Schäden über die Zellreparaturkapazität hinausgehen, aktivieren verschiedene Signalkaskaden zum Fortbestand des Organismus den Tod bzw. die Inaktivierung der beschädigten Zellen. Zu den unterschiedlichen strahleninduzierten Zelltodmechanismen gehören Apoptose, mitotische Katastrophe, Nekrose und Seneszenz (siehe Abb. 2) (Eriksson et al. 2010; Kim et al. 2015).

Zum Verständnis dieser Arbeit ist es wichtig zu verstehen, was in der Strahlenbiologie unter Zelltod verstanden wird. In dieser Hinsicht konzentriert sich die Forschung auf

die Bewertung des klonogenen Überlebens, das als die Fähigkeit einer Zelle nach Bestrahlung sich unbegrenzt zu proliferieren definiert wird. Folglich wird der Zelltod im Zusammenhang mit der Strahlenbiologie im Allgemeinen mit dem dauerhaften Verlust des klonogenen Potentials gleichgesetzt (Joiner et al. 2009).

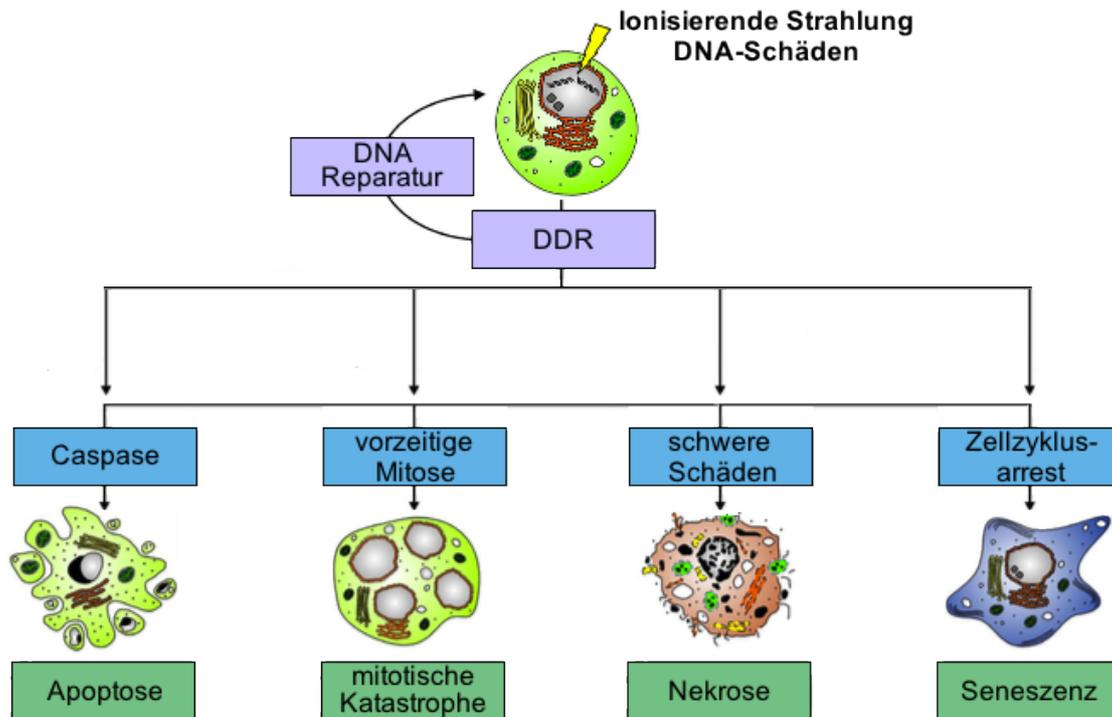


Abbildung 2: IR induziert unterschiedliche Zelltodmechanismen

Wenn DNA-Schäden über die Zellreparaturkapazität der DNA-Schadensreparaturantwort (DDR) hinausgehen, aktivieren verschiedene Signalkaskaden den Tod der beschädigten Zellen mittels Apoptose, mitotischer Katastrophe, Nekrose oder Seneszenz. Modifiziert nach Lauber et al. 2012.

5.6.1 Apoptose

Apoptose wird allgemein als die vorherrschende Form des Zelltods angesehen, die der täglichen Geweberegeneration und -erneuerung zugrunde liegt. Apoptose als Reaktion auf eine Strahlentherapie wird überwiegend in Zellen des hämatopoetischen Systems beobachtet (Eriksson et al. 2010; Rudner et al. 2001). Morphologisch sind apoptotische Zellen durch Größenabnahme, Chromatinkondensation, Kernfragmentierung und Membran-Blebbing charakterisiert (Abb. 2) (Thompson, 1995).

Die Initiationsphase der Apoptose kann auf dem extrinsischen oder dem intrinsischen

(mitochondrialen) Signalweg verlaufen. Beide Wege werden aktiv eingeleitet und sind ein natürlicher Bestandteil des Stoffwechsels. Sie unterliegen strengen Kontrollen, damit es zu keiner Schädigung und Entzündungsreaktion des Nachbargewebes kommt (Childs et al. 2014). Das entscheidende Ereignis der apoptotischen Signalwege ist die MOMP (Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran) und die damit verbundene Freisetzung verschiedener Proteine, wie Zytochrom-c in das Zytosol, wodurch die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung von Procaspase-9 stimuliert werden. Aktivierte Caspase-9 lösen wiederum kaskadenartige Aktivierungen weiterer Effektor-Caspasen aus, die die Endstadien der Apoptose und die Desintegration der Zelle einleiten. Hauptakteure der Permeabilisierung und Zytochrom-c-Freisetzung sind Proteine der BCL-2 (*B-cell-Lymphoma 2 protein*) Familie, einschließlich pro-apoptotischer (z.B. BAX, *BCL-2-associated X protein*) und anti-apoptotischer (z.B. BCL-2) Familienmitglieder die die MOMP über ihren Einfluss auf die Oligomerisierung der Effektor-Mitglieder BAX und BAK (*BCL-2 homologous antagonist killer*) kontrollieren (Youle et al. 2008). p53 bindet diese Signalwege an strahleninduzierte DNA-Schäden durch Transaktivierung der Expression proapoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie wie PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) und NOXA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) (Sengupta et al. 2005). Obwohl p53 im Wesentlichen die Expression verschiedener Schlüsselregulatoren der Apoptose steuert, sind p53-unabhängige Signalwege bei defekter p53-Funktion im Rahmen der strahleninduzierten Apoptose gut dokumentiert (Kim et al. 2015). Hierzu wurde beispielsweise die p63-/p73-abhängige Induktion von pro-apoptotischen BCL-2-Familienmitgliedern beschrieben (Afshar et al. 2006; Wakatsuki et al. 2008).

5.6.2 Mitotische Katastrophe

Innerhalb des Zellzyklus gibt es verschiedene Zellzyklus-Kontrollpunkte (Checkpoints), die die Phasenübergänge kontrollieren und die DNA-Integrität überwachen. Dazu gehören beispielsweise der G1-Kontrollpunkt am Phasenübergang von G1- auf S-Phase und der G2-Kontrollpunkt am Phasenübergang von G2- auf M-Phase (Castedo et al. 2004). Die mitotische Katastrophe ist der vorrangige Zelltodmechanismus bei unkoordiniertem und unsachgemäßem Eintritt einer Zelle in die Mitose nach strahleninduzierten DNA-Schäden mit

Zellzyklus-Kontrollpunkt-Defekten und beeinträchtigten DNA-Reparaturmechanismen. Im Verlauf der mitotischen Katastrophe kommt es zur Bildung von Riesenzellen, die entweder tagelang überleben, in die Seneszenz übergehen oder durch verzögerte Apoptose oder Nekrose sterben (Eriksson et al. 2010).

5.6.3 Nekrose

Wenn die Apoptose den programmierten Zelltod durch „Selbstmord“ darstellt, dann ist die Nekrose der ungeplante und chaotische Zelltod durch Verletzung bzw. Schädigung der Zellstruktur (Joiner et al. 2009). Sie ist die Folge von äußerst schweren Schäden, die nicht vereinbar mit einem normalen physiologischen Prozess sind, z.B. extreme pH-Veränderungen, Ischämie, Hypothermie, mechanische Verletzungen oder Kontakt mit Toxinen. Die Nekrose als Antwort auf strahleninduzierte Schäden ist selten, aber nicht unbekannt. Besonders hohe Bestrahlungsdosen haben einen nekrotischen Zelltod zur Folge (Kim et al. 2015).

5.6.4 Seneszenz

Seneszenz ist ein permanenter Zellzyklusarrest, bei dem seneszente Zellen irreversibel aus dem Pool sich aktiv teilender Zellen eliminiert werden. Zu den Kennzeichen der zellulären Seneszenz gehören eine vergrößerte und abgeflachte zelluläre Morphologie, eine erhöhte Granularität sowie die Hochregulierung der SA- β -Gal (Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase) (Eriksson et al. 2010; Nardella et al. 2011).

Es wird zwischen zwei Arten zellulärer Seneszenz unterschieden: die intrinsische, replikative Seneszenz und die extrinsische, prämaturne Seneszenz. Das molekularbiologische Korrelat der intrinsischen Seneszenz liegt in der sukzessiven Telomerverkürzung als Folge des End-Replikationsproblems. Infolgedessen tritt die betroffene Zelle in die Seneszenz ein, bevor eine zu kurze Telomerlänge die DNA-Integrität gefährden könnte. Die extrinsische Variante der zellulären Seneszenz ist hingegen dadurch charakterisiert, dass sie unabhängig der Telomerlänge akut durch extrinsische Stressfaktoren wie ionisierender Strahlung induzierbar ist

(Campisi, 2013; Eriksson et al. 2010; Rodier et al. 2011).

Sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Seneszenz besitzen einen gemeinsamen Ursprung ihrer Signalkaskaden. Es ist mittlerweile bekannt, dass die Seneszenz über die Wechselwirkung von Tumorsuppressoren wie z.B. p53 und RB (Retinoblastom-Protein) und Zellzyklusmodulatoren wie z.B. p16 und p21 gesteuert wird. p53 induziert das Protein p21, dessen Expression in seneszenten Zellen hochreguliert ist. p21 inhibiert im Zellzyklus wiederum verschiedene CDKs (Zyclin-abhängige-Kinasen), welche maßgeblich an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind, und wirkt somit direkt auf den Verlauf des Zellzyklus ein. Dadurch wird die Phosphorylierung von RB verhindert, was zu einem Arrest des Zellzyklus führt. In unphosphorylierter Form bindet RB an regulatorische Proteine, die für die Zellproliferation verantwortlich sind und inaktiviert sie. Somit kann der Verlauf des Zellzyklus nicht mehr induziert werden. Neben p21 wird die Aktivität von RB zudem durch den Zellzyklusinhibitor p16 reguliert, der in seneszenten Zellen stark hochreguliert ist (Campisi, 2005; Campisi, 2013; Coppé et al. 2010; Inoue et al. 2007; Itahana et al. 2004; Rodier et al. 2011; Semczuk et al. 2004; Smith et al. 2010).

Die zelluläre Seneszenz verhindert durch den Zustand des permanenten Zellzyklusarrests die Weitergabe von DNA-Schäden an die nächste Zellgeneration und schließt somit potentielle maligne Transformation aus. Diese Eigenschaft macht die Seneszenz zu einem bekannten tumorsuppressiven Mechanismus. Interessanterweise hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass seneszente Zellen trotz ihres irreversiblen Arrests durch ihre metabolische Aktivität ein großes Repertoire an Faktoren sezernieren können, die pleiotrope Effekte auf umliegende Nachbarzellen haben. Man spricht vom SASP (Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp). Er umfasst unter anderem Zytokine, Chemokine sowie Wachstumsfaktoren und besitzt die Fähigkeit das Gewebemilieu zu verändern und dadurch die Tumorentstehung und Tumorprogression zu fördern (Coppé et al. 2010).

5.7 Linear-quadratisches Modell

Um das Zellüberleben nach Bestrahlung beurteilen zu können, wird das LQ-Modell (linear-quadratische-Modell) verwendet. Hierbei wird die SF (Überlebensfraktion) nach

der Formel $SF = e^{-(\alpha D - \beta D^2)}$ in logarithmischer Form gegen die applizierte Dosis gefittet, um sogenannte Überlebenskurven zu erhalten, in der sich zwei Kurvenanteile unterscheiden lassen: die lineare Komponente ($-\alpha D$) beschreibt die Anfangskrümmung (auch Schulter genannt), die quadratische Komponente ($-\beta D^2$) den weiteren Krümmungsverlauf. Dabei entsteht die lineare Komponente ($-\alpha D$) auf dem Boden letaler und schlecht reparabler Wirkung direkt erzeugter DNA-DSBs, während der quadratische Term βD^2 den Einfluss synergistischer DNA-SSBs, die zeitgleich und räumlich hinreichend dicht auftreten um sich als DNA-DSBs auszuwirken, quantifiziert. α und β sind demnach Konstanten, die die Krümmung der Kurve beschreiben (Bartkowiak et al. 2001; Unkel et al., 2016).

Um Aussagen bezüglich der Schulter der Überlebenskurven zu treffen, ist der α/β -Wert von großer Bedeutung. Dieser Wert gibt diejenige Dosis an, bei der die lineare und quadratische Komponente gleichermaßen zum Zelltod beitragen. Ist der α/β -Wert hoch, so ist die Schulter der Zellüberlebenskurven schwach ausgeprägt und die Reparaturfähigkeit gering (und umgekehrt) (Herrmann et al. 2006).

6 Fragestellung

Die erworbene und/oder inhärente Strahlenresistenz stellt insbesondere bei HNSCCs eine häufige Ursache für Rezidive und eine schlechte Prognose dar. Zudem wird berichtet, dass Rezidive nach einer Strahlentherapie strahlenresistenter sind als vor der Therapie. Obwohl verschiedene potenzielle Mechanismen der Strahlenresistenz vorgeschlagen und umfassend untersucht wurden, bleiben die zugrundeliegenden Faktoren weitgehend unbekannt. Es gilt folglich weitere Faktoren und molekulare Signalwege zu identifizieren, die für die Tumorbilogie der HNSCCs von Bedeutung sind und sowohl als Biomarker als auch als potentielle Zielstrukturen für eine Therapie in Frage kommen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Faktoren der Strahlenresistenz von HNSCC-Zelllinien zu charakterisieren, um Wege zu finden, den Erfolg der Strahlentherapie in HNSCCs zu verbessern. Dafür sollte die Strahlenresistenz verschiedener HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu immortalisierten Mundschleimhaut-Keratinocyten (OKF6) mittels Klonogenitätsassays untersucht werden und mit Hilfe von multivariaten Verfahren Strahlenresistenzindizes extrahiert werden. Diese sollten anschließend mit anderen Datenqualitäten in Form von qRT-PCR-Profilings-Daten verschiedener Regulatoren der DNA-Schadensreparaturantwort sowie funktionellen Daten zu Zelltod- und Seneszenz-Induktion korreliert werden, um potentielle Marker der Strahlenresistenz bzw. molekulare Zielstrukturen für zukünftige multimodale Therapieansätze zu identifizieren.

7 Material

7.1 Zelllinien

Im Zuge dieser Arbeit wurde mit sieben verschiedenen humanen HNSCC-Zelllinien und einer Zelllinie humaner immortalisierter Mundschleimhaut-Keratinocyten gearbeitet. Informationen zu Ursprung und Herkunft sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Dickson et al. 2000; Leibniz-Institut DSMZ; Lin et al. 2007). Eine Authentifizierung der Zelllinien wurde mittels STR-Analyse (*Short tandem repeat*) durchgeführt.

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Körperregion	Weitere Information
UD-SCC-2	Hypopharynx	Isoliert aus einem männlichen Patienten im Stadium T1N2M0. Prof. Dr. med. Thomas Hoffmann des Universitätsklinikums Ulm stellte diese Zelllinie freundlicherweise zur Verfügung.
CAL-27	Zunge (Mundhöhle)	Im Jahr 1982 aus einem chirurgisch entfernten Fragment eines schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinoms der Zunge eines 56-jährigen, kaukasischen Mannes isoliert. Die Ziellinie wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben (DSMZ-Nummer: ACC 446).
CAL-33	Zunge (Mundhöhle)	Im Jahr 1983 aus einem chirurgisch entfernten Fragment eines mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinoms der Zunge eines 69-jährigen Mannes isoliert. Die Ziellinie wurde von der DSMZ erworben (DSMZ-Nummer: ACC 447).
UPCI:SCC-040	Mundhöhle	Isoliert aus einem 50-jährigen kaukasischen Mannes. Die Ziellinie wurde von der DSMZ erworben (DSMZ-Nummer: ACC 660).

UPCI:SCC-099	Mundhöhle	Isoliert aus einem 52-jährigen kaukasischen Mannes. Die Ziellinie wurde von der DSMZ erworben (DSMZ-Nummer: ACC 665).
UPCI:SCC-131	Mundhöhle	Isoliert aus einem 73-jährigen kaukasischen Mannes. Die Ziellinie wurde von der DSMZ erworben (DSMZ-Nummer: ACC 668).
UPCI:SCC-154	Mundhöhle	Isoliert aus einem 54-jährigen kaukasischen Mannes. Die Ziellinie wurde von der DSMZ erworben (DSMZ-Nummer: ACC 669).
OKF6	Mundhöhle	Immortalisierte Mundschleimhaut-Keratinocyten isoliert aus einem 57-jährigen Mann. Die Ziellinie wurde im Rheinwald Laboratory (Brigham and Woman's Hospital, Boston, USA) hergestellt.

7.2 Kits

Tabelle 2: Kits

Bezeichnung	Hersteller
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
2x SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland

7.3 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	Lonza, Köln, Deutschland
Bafilomycin A1	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich
BPM	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
C12-FDG	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FBS	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
F12	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
KSFM	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Metformin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methylenblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Olaparib	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
PI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PS	Lonza, Köln, Deutschland
rEGF	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
RNase A	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
TrypLE Express	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
z-VAD-fmk	Bachem, Bubendorf, Schweiz

7.4 Einwegmaterialien

Tabelle 4: Einwegmaterialien

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Hersteller
FACS-Röhrchen	Röhrchen mit Rundboden	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kryoröhrchen	Nunc™ Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Multiwell-Platten	Tissue Culture Plate (6-well, 24-well)	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Blaubrand-Zählkammer	BRAND, Wertheim, Deutschland
PCR-Gefäße	PCR Kombi 8er SoftStrips 0,2ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR-Platten	LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche, Penzberg, Deutschland
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. Standard/Bulk	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	epT.I.P.S. Dualfilter	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stepperspitzen	Combitips advanced	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	Stripette	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Minisart NML 0,2µl	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflaschen	Corning Zellkulturflaschen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

7.5 Laborgerätschaften

Tabelle 5: Laborgerätschaften

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heracell 240i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Durchflusszytometer	LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage	Analysenwaage ABJ- NM	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Lichtmikroskop	Primo Vert	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge	Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Analysesystem	LightCycler 480 II	Roche, Penzberg, Deutschland
Pipetten	Research plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy	INTEGRA Biosciences, Fernwald, Deutschland
Röntgenröhrengeräte	RT250	Philips Medizin Systeme, Hamburg, Deutschland
	RS225	Xstrahl Medical & Life Sciences, Essen, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler pro	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Maxisafe 2020	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Stepper	Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stickstoff Zelltank	LS6000	Taylor-Wharton, Mildstedt, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus Oven Function Line UT20	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Vortexmischer	Reagenzglasmixer Vortex 7-2020	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Inkubations- /Inaktivierungsbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Universalzentrifuge	Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
UV/Vis- Spektralphotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland

7.6 Oligonukleotidprimer für qRT-PCR

Alle Primer wurden in lyophilisierter Form geliefert (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

Tabelle 6: Oligonukleotidprimer für qRT-PCR

Bezeichnung		Sequenz 5'–3'
β2M	Forward	TGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC
	Reverse	TCTCTGCTGGATGACGTGAGTAAAC
δ-ALAS	Forward	TCCACTGCAGCAGTACACTACCA
	Reverse	ACGGAAGCTGTGTGCCATCT
18S rRNA	Forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
	Reverse	GCTGGAATTACCGCGGCT
ATM	Forward	CTGGAAGAAGCACAAGTATTCTG
	Reverse	TGGGATTGTTGCTGCACA
ATR	Forward	GGTCACCACCAGACAGCCTAC
	Reverse	GAACATCACCCCTTGACCAGA
BLM	Forward	ATGGACATCGCCAGCTGAAG
	Reverse	GCAAAGTAGTGGGAAGATACGGG
BRCA1	Forward	GCTATTTCTGGGTGACCCAGTC
	Reverse	GATTCTCTTGCTCGCTTTGGA
BRCA2	Forward	GTTTGTGAAGGGTTCGTCAGACA
	Reverse	AACTAAGGGTGGGTGGTGTAGCT
BRIP1	Forward	GTGTGCTGTAGCCTCATTAAATTG
	Reverse	GTTAAGAGCATTTCATTTCCACT
CHK1	Forward	ATGCCTGAACCAGATGCTCAG
	Reverse	GAGGTTATCCCTTTCATCCAACA
CHK2	Forward	CTCTTGGAAAGTGCTGCCTGTG
	Reverse	GGGTCTGCCTCTCTTGCTGA
DCLRE1C	Forward	CGGAGCCAAAGTATAAACCCTG
	Reverse	TCATCTTCCTCCTCTGAGTCT
DNA-PKcs	Forward	AACAACCTTTATGGTGGCCATGG
	Reverse	ACTGGCAGAACTGTGTGTAGCGG

MATERIAL

DNA2	Forward	TTCCTTAATACAGACAAGGTTCC
	Reverse	CATCCAGCCTTAACAAAAATGGA
EXO1	Forward	AGCTACGCTGGGCAATATGTTG
	Reverse	AATGGGCAGGCATAGCAGTG
FANCA	Forward	CAGTTGACAGAGAGTGACCTCAG
	Reverse	GAAGTAGGAGAGAAGACTGTAAAAAG
FEN1	Forward	GTGTCCCAAAGGCCAGTCATC
	Reverse	GGGCCACATCAGCAATTAGTTT
HPV	GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
	GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC
KU70	Forward	GGGCTCCTTGGTGGATGAGT
	Reverse	GCTTCCAGAACCTTCATTATCGT
KU80	Forward	GAGCATAGACTGCATCCGAGC
	Reverse	CTGAAAACCTTAATGGCTTCTTCC
LIG4	Forward	AAGCCTTGGAGCTTCGGTTT
	Reverse	TCTGCAACACGACTATGATCTTC
MRE11	Forward	TGGAGAAGATTGAAGAAATGCTT
	Reverse	CCACTATAGTCCACTCGCAGTCG
NBS1	Forward	CAGGAAAACCTCCACAATCATT
	Reverse	TTTGTACCTCCATTTCTGCCTT
PALB2	Forward	TGTATAATCTCGTGTGTGTAGCT
	Reverse	CAATGCCCTGATCTCTCTGATTT
PARP1	Forward	GCCCGTGACAGGCTACATGT
	Reverse	TTGGGTCTCCCTGAGACGTATG
PARP2	Forward	TGGGTGGGAATCTTGAGCC
	Reverse	CTTTCCCAAACATGTAACCTGTG
p53	Forward	ATGGAGGAGCCGCAGTCAG
	Reverse	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCT
RAD50	Forward	CGAAGTACCTATCGTGGACAAGA
	Reverse	TCGGCATCAGACCGTATTTCTAT
RAD51	Forward	GCAGTGGCTGAGAGGTATGGTC
	Reverse	TGGTGGTCTGTGTTGAACGC
RAD52	Forward	CAGCAGAAGAGTACCAGGCCAT
	Reverse	TCAATGTAGCACACCTTCTGGC

MATERIAL

RAD54	Forward	GAGTATGAAGCAGAGAAGAAGGG
	Reverse	CCAGTTGGTATGTTGAAACGCAT
KU70	Forward	GGGCTCCTTGGTGGATGAGT
	Reverse	GCTTCCAGAACCTTCATTATCGT
KU80	Forward	GAGCATAGACTGCATCCGAGC
	Reverse	CTGAAAACCTTAATGGCTTCTTCC
LIG4	Forward	AAGCCTTGGAGCTTCGGTTT
	Reverse	TCTGCAACACGACTATGATCTTC
MRE11	Forward	TGGAGAAGATTGAAGAAATGCTT
	Reverse	CCACTATAGTCCACTCGCAGTCG
NBS1	Forward	CAGGAAAACCTCCACAATCATT
	Reverse	TTTGTACCTCCATTTCTGCCTT
PALB2	Forward	TGTATAATCTCGTGTGTGTAGCT
	Reverse	CAATGCCCTGATCTCTCTGATTT
PARP1	Forward	GCCCGTGACAGGCTACATGT
	Reverse	TTGGGTCTCCCTGAGACGTATG
PARP2	Forward	TGGGTGGGAATCTTGAGCC
	Reverse	CTTCCCAAACATGTAACCTGTG
p53	Forward	ATGGAGGAGCCGCAGTCAG
	Reverse	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCT
RAD50	Forward	CGAAGTACCTATCGTGGACAAGA
	Reverse	TCGGCATCAGACCGTATTTCTAT
RAD51	Forward	GCAGTGGCTGAGAGGTATGGTC
	Reverse	TGGTGGTCTGTGTTGAACGC
RAD52	Forward	CAGCAGAAGAGTACCAGGCCAT
	Reverse	TCAATGTAGCACACCTTCTGGC
RAD54	Forward	GAGTATGAAGCAGAGAAGAAGGG
	Reverse	CCAGTTGGTATGTTGAAACGCAT
RBBP8	Forward	CTGTAATAGATACAAAGGATGGC
	Reverse	AACCAATGTACAGTCCATGTCCA
RPA1	Forward	AGGCGACAAGCCGGACTAC
	Reverse	AGGCTTGGTACATGCAGTTCTCT
XLF	Forward	AGCTAGTCCTTCCCTGGTCTCC
	Reverse	CCCATCAGAGGACGAATCAAAT

XRCC1	Forward	GAGCTGAGGAGGGTGGCAG
	Reverse	CGTGTTCTCATCCGTGGAGC
XRCC2	Forward	AAGATTCACCTGTGCATGGTGAT
	Reverse	ACATCGTGCTGTTAGGTGATAAA
XRCC3	Forward	CCGAGGTCTGGCACTTGCT
	Reverse	GCTGCAGTGCTGTAAGGATGC
XRCC4	Forward	GGACATCAAACAAGAAGGGGAA
	Reverse	GGATCTCGGTCAGCAGTCATTT

7.7 Software

Die Daten der FACS-Analysen wurden mit Hilfe von FACSDiva (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) und FlowJo 7.6.3 (Fa. Tree Star, Ashland, USA) analysiert. OriginPro 9.1 (Fa. OriginLab Corporation, Northampton, USA) wurde für die Linear-quadratische Regressionsanalyse der klonogenen Überlebensdaten, der Ermittlung der jeweiligen α/β -Werte, der PCA (Hauptkomponentenanalyse) und Korrelationsanalysen genutzt. Hierarchische Clusteranalysen wurde unter Verwendung der GENE-E 3.0-Software (Fa. Broad Institute, Cambridge, USA) durchgeführt.

8 Methoden

8.1 Routinearbeiten in der Zellkultur

8.1.1 Zellhaltung

HNSCC-Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ (Kohlenstoffdioxid) unter Wasserdampfsättigung in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² kultiviert. OKF6-Zellen wurden bis auf einen CO₂-Gehalt von 5,0% ebenso kultiviert. Um eine weitgehende Keimfreiheit zu gewähren, wurden Zellkulturflaschen und Zellmedien nur unter der Sicherheitswerkbank geöffnet.

8.1.2 Mediumwechsel

Als Zellmedium für HNSCC Zelllinien wurde DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FBS (fötales Kälberserum) sowie 1% PS (Penicillin-Streptomycin) verwendet. Als Zellmedium für OKF6-Zellen wurde ein 2:1:1 Keratinozyten-SFM (serumfreies Kulturmedium) / DMEM / F12-Medium ergänzt mit 0,3 ng/ml rEGF (rekombinanter-epidermaler-Wachstumsfaktor), 35 mg/ml BPE (Rinderhypophysenextrakt), 2,4 mM CaCl₂ (Calciumchlorid), 1 mM Glutamin und 55 mg/ml PS verwendet.

8.1.3 Passagieren

Zur Aufrechterhaltung des exponentiellen Wachstums wurden die Zellen regelmäßig bei Erreichen von 80%iger Konfluenz passagiert. Zum Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden diente nach zweimaliger Spülung mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), Accutase oder TrypLE Express. Nach einigen Minuten wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, ob sich alle Zellen gelöst haben. Anschließend wurde der Ablösevorgang durch Zugabe von FBS gestoppt. Durch wiederholtes Resuspendieren wurden die abgelösten Zellen vereinzelt und mit einer

1:3 bis 1:10 Verdünnung in frischem Kulturmedium in frische Kulturflaschen überführt. Im Fall von OKF6-Zellen wurde das Trypsinat zur Entfernung des FBS vor dem Transfer in eine neue Kulturflasche zunächst mit PBS gewaschen. Für die Versuche wurden Zellen der 1.–20. Passage verwendet.

8.1.4 Kryokonservierung

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen nach zweimaliger Spülung mit PBS durch Accutase oder TrypLE Express vom Zellkulturflaschenboden abgelöst, in einer eiskalten Lösung aus 90% FBS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert, in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen langsam weggefroren und in einem Lagerungstank mit Flüssigstickstoff bei -196°C gelagert.

Für die Reaktivierung wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut und sofort nach Auftauen in 20 ml vorgewärmten Nährmedium suspendiert. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (1200 rpm, 5 min), das Pellet erneut in frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 4–6 h wurden die Vitalität und die Konfluenz der Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt, um restliches DMSO zu entfernen.

8.1.5 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl diente eine Neubauer-Zählkammer. Hierbei handelt es sich um eine 30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte mit vier Großquadraten die Zählgitter enthält. 10 μl der auszuzählenden Zellsuspension wurde bei aufgelegtem Deckglas von der Seite in die Zählkammer pipettiert und verteilt. Aus der Anzahl der Zellen in den vier Großquadraten wurde ein Mittelwert errechnet. Multiplizierte man diesen mit dem Faktor 10,000 ergab sich die Zellzahl pro ml.

8.2 Zellbestrahlung

Zur Bestrahlung der Zellen wurden zwei Röntgenröhrengeräte (beide mit Thoräusfilter) genutzt. Die Bestrahlung erfolgte bei Raumtemperatur in Multiwell-Platten oder in

Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm².

8.3 Aufbereitung der pharmakologischen Wirkstoffe

8.3.1 Metformin

Das in Pulverform gelieferte Metformin wurde in PBS aufgelöst, zu einer 500 mM Vorratslösung verdünnt und durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert. Für den Gebrauchstag wurde die Vorratslösung in Nährmedium zu einer 5 mM Arbeitskonzentrationen verdünnt und die Zellen mit einer Metformin-Dauerinkubation behandelt.

8.3.2 Olaparib und z-VAD-fmk

Die in Pulverform gelieferten Substanzen Olaparib und z-VAD-fmk (Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-methyl]-Fluoromethylketone) wurden mit DMSO aufgelöst und bei -20°C bis zur Anwendung gelagert. An jedem Gebrauchstag wurde Olaparib in Nährmedium zu einer 100 nM Arbeitskonzentration und z-VAD-fmk zu einer 50 µM Arbeitskonzentration frisch verdünnt. Die Zellen wurden mit einer Olaparib-/z-VAD-fmk-Dauerinkubation behandelt.

8.4 Zellbiologische Methoden

8.4.1 Messung des klonogenen Überlebens

Durch Koloniebildungstests kann das klonogene Überleben von Zellen nach IR und/oder bei Inkubation mit löslichen Substanzen bestimmt werden. Der Test bemisst die Fähigkeit von Einzelzellen, nach der Bestrahlung/Behandlung zu Kolonien mit mindestens 50 Zellen heranzuwachsen. Zellkolonien mit weniger als 50 Zellen werden hingegen als teilungsunfähig oder inaktiv betrachtet und nicht berücksichtigt

(Franken et al., 2006; Puck et al., 1956).

Für die Ausführung des Koloniebildungstests wurden in jede Vertiefung einer 6-well-Platte 100–100.000 Zellen in Zwei- oder Dreifachwerten ausgesät. Nach einer Adhärenzzeit von 4 h im Brutschrank mit anschließendem Mediumwechsel (2 ml pro Vertiefung) wurden die Platten mit Dosen von 1, 2, 4, 6 und 8 Gy bestrahlt und/oder behandelt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 14–19 Tagen wurden die Zellkolonien mit 0,3%iger Methylenblaulösung in 80%igem Ethanol für 1 h gefärbt, anschließend wurde überschüssige Farbe mit Leitungswasser ausgewaschen und die Platten im Trockenschrank getrocknet.

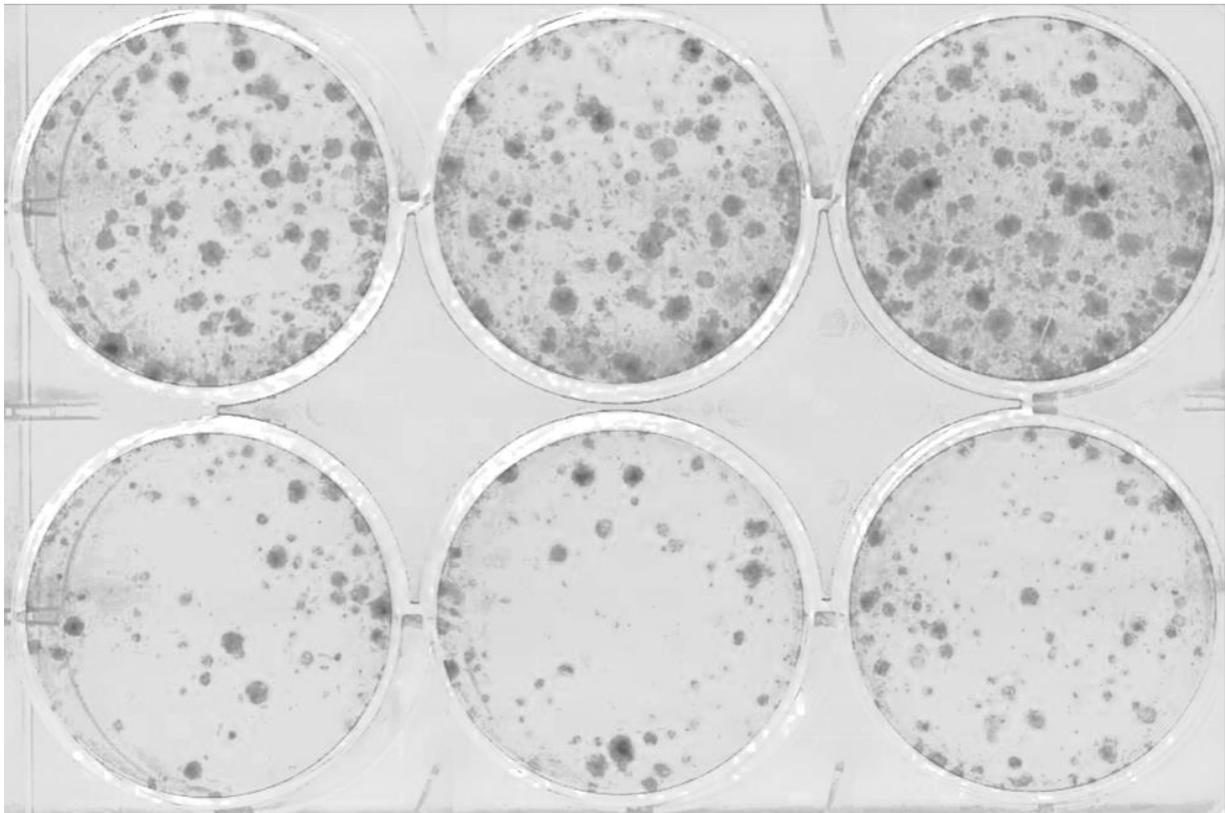


Abbildung 3: Visualisierung der Zellkolonien nach Färbung

Nach 14–19 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die auf den 6-well-Zellkulturplatten gewachsenen Kolonien mittels 0,3%iger Methylenblaulösung in 80%igem Ethanol sichtbar gemacht und unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Kolonien wurden ausgezählt und dabei die PE (Plattierungseffizienz) und SF wie folgt ermittelt:

$$\text{PE [\%]} = \frac{\text{ausgezählte Kolonien auf unbehandelter Platte} \times 100}{\text{ausgesäte Zellen auf unbehandelter Platte}}$$

Die SF errechnet sich aus der Anzahl der Kolonien auf einer bestrahlten und/oder behandelten Platte dividiert durch die Zahl der auf dieser Platte ausgesäten Zellen dividiert durch die Plattierungseffizienz:

$$\text{SF} = \frac{\text{ausgezählte Kolonien}}{\text{ausgesäte Zellen}} \times \frac{100 \%}{\text{PE [\%]}}$$

Die Ergebnisse der Koloniebildungstests wurden mittels Überlebenskurven graphisch dargestellt und anhand des LQ-Modells gefittet.

8.4.2 Detektion von strahlungsinduzierter Apoptose

Der eukaryotische Zellzyklus ist charakterisiert durch eine Interphase, die aus der Phase der DNA-Replikation (S-Phase) und zwei Zwischenphasen (genannt G1- und G2-Phase) besteht, sowie durch die Phase der Zellteilung (genannt M-Phase oder Mitose). Während der Replikation in der S-Phase wird der Chromosomensatz der Zelle verdoppelt; der genomische Gesamtgehalt der Zelle erhöht sich damit von 2n auf 2×2n. Nach fehlerfreier Replikation des Genoms in der S-Phase bzw. nach vollendeter Reparatur von DNA-Schäden in der G2-Phase, leitet die Zelle ihre Teilung (und damit die M-Phase) ein.

Apoptotische Zellen sind grundsätzlich durch einen erhöhten Grad der Kondensation ihres Chromatins, durch die Fragmentierung ihrer DNA sowie durch die Abschnürung apoptotischer Zellfragmente (sogenannter „blebs“) charakterisiert (Thompson, 1995). Aufgrund der Abschnürung entsprechender Zellfragmente, welche unter anderem fragmentierte DNA enthalten, weisen Zellkerne apoptotischer Zellen einen niedrigeren DNA-Gehalt auf als viable Zellen. Mittels einer Färbung mit PI (Propidiumjodid), einem fluoreszierenden Stoff, der in die DNA interkaliert, lässt sich durchflusszytometrisch bestimmen, in welchem Zellzyklusstadium sich eine Zelle befindet und ob ein sub-diploider (subG1) DNA-Gehalt vorliegt (Riccardi et al. 2006).

Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen durch 70%igem Ethanol und dem Verdau nicht-genomischer Nukleinsäuren wie beispielsweise RNA durch RNase

(Ribonuklease), bindet PI an die DNA. Die Bindung von PI kann im FACS (Durchflusszytometer) durch die Anregung der PI-Eigenfluoreszenz gemessen werden; die Stärke des gemessenen Signals ist dabei proportional zum DNA-Gehalt der Zelle. Da es im Verlauf der Apoptose zur Degradierung der genomischen DNA der Zelle kommt, kann weniger PI interkalieren, weshalb die gemessene PI-Eigenfluoreszenz abnimmt. Hieraus resultiert dann eine Häufung von Signalen mit einer Fluoreszenzintensität, die unter der von G1-Zellen liegt, weshalb diese Zellpopulation als subG1-Population bezeichnet wird (siehe Abb. 4).

Jeweils 50.000 Zellen wurden in 500 µl Medium pro Kavität in 24-well-Platten ausgesät. Nach einer Adhärenz von 4 h mit anschließendem Mediumwechsel wurden die Platten mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (1, 2, 4, 6 und 8 Gy) bestrahlt und für 24 h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. An festgelegten Tagen nach Bestrahlung (Tag 1, 2, 4, 6 und 8) wurde die Apoptose gemessen. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen, die zu analysierenden Zellen mittels 200 µl Accutase oder TrypLE Express abgelöst und zusammen mit dem davor abgenommenen Medium sowie mit 100 µl FBS in FACS-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (1.200 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und die Zellen mittels eiskaltem 70%igem Ethanol für mindestens 20 Minuten fixiert. Nach erneuter Zentrifugation (1.200 rpm, 5 min, 4°C) wurde das Pellet in 200 µl PBS mit 0,1% BSA (Rinderserumalbumin) gewaschen, der Überstand abgenommen und das Pellet in 200 µl des PI-Färbepuffers (siehe Tab. 7) aufgenommen.

Tabelle 7: Zusammensetzung des PI-Färbepuffers

Natriumcitrat	38 mM
Propidiumjodid	69 µM
RNase A	100 µg/ml

Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wurde die PI-Fluoreszenz der Zellkerne analysiert. Alle Kerne mit einem DNA-Gehalt unterhalb der G1-Population wurden als apoptotisch angesehen. Zur quantitativen Bewertung der Apoptose-Induktion durch Bestrahlung wurde der prozentuale Anteil der subG1-Zellen verwendet.

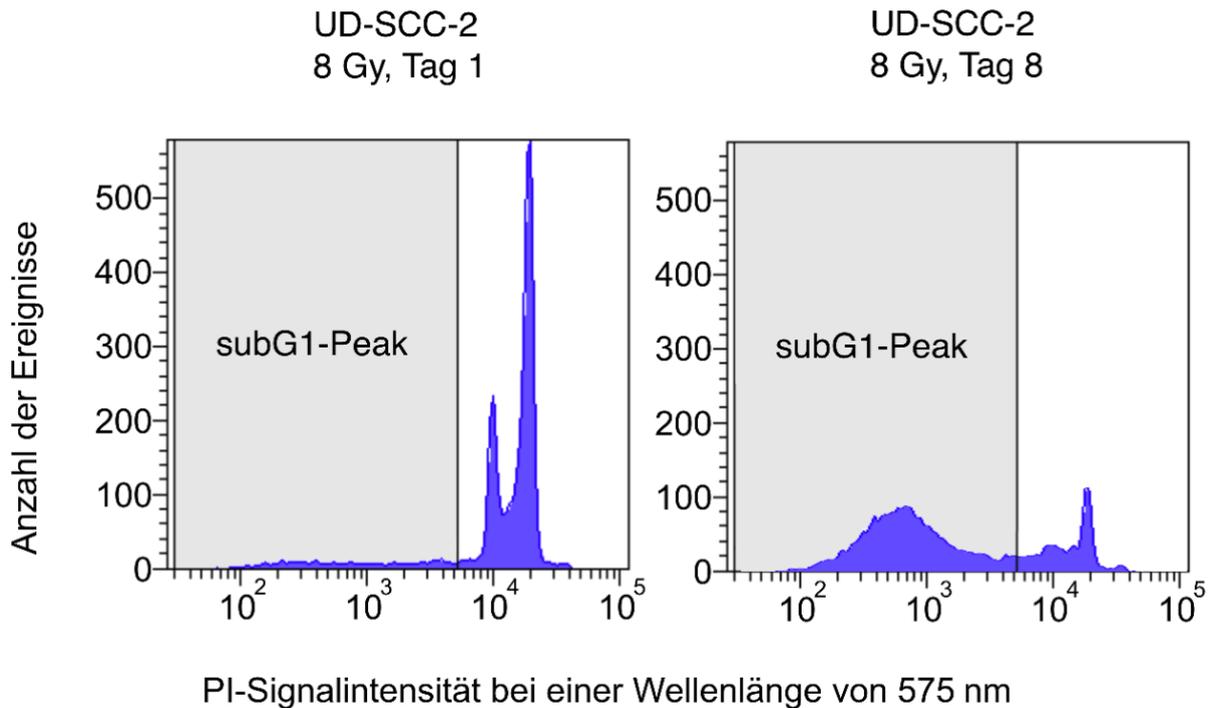


Abbildung 4: Exemplarische FACS-Plots der verschiedenen Zellzyklus-Phasen nach PI-Färbung

Dargestellt sind PI-Histogramme (Verteilung der PI-Signalintensität bei einer Wellenlänge von 575 nm) der UD-SCC-2-Zelllinie nach Bestrahlung mit 8 Gy und einer Inkubationszeit von 1 (linker Plot) sowie von 8 Tagen (rechter Plot). An Tag 1 nach Bestrahlung zeigten UD-SCC-2 noch ein typisches FACS-Profil gesunder Zellen mit einem niedrigen subG1-Peak und dem charakteristischen Doppelpeak, der den Phasen des Zellzyklus entspricht. An Tag 8 nach Bestrahlung sind die Peaks der viablen Zellen aufgrund von fortschreitender Degradierung der DNA im Zuge der Apoptose nahezu nicht mehr detektierbar und die Populationen apoptotischer Zellen erscheint als subG1-Peak.

8.4.3 Detektion von strahlungsinduzierter Seneszenz

Neben der Zunahme der Granularität ist die Hochregulierung der SA- β -Gal eines der charakteristischen Merkmale seneszenten Zellen. Zur Identifikation seneszenten Zellen nach Bestrahlung wurde in dieser Arbeit sowohl die Zell-Granularität, als auch die Aktivität der SA- β -Gal im FACS analysiert. Die SA- β -Gal Aktivität wurde durch die Umsetzung des fluorogenen β -Gal-Substrats C12-FDG (5-dodecanoylamino-fluorescein-di- β -galactopyranosid) bestimmt. Das dabei entstehende Produkt emittiert grüne Fluoreszenz und akkumuliert in der Zelle. Somit verbleibt der Farbstoff nur in seneszenten Zellen und lässt sich mittels Durchflusszytometrie messen. Um falsch positive Signale zu unterdrücken, muss die in Zellen zusätzlich vorkommende lysosomale β -Gal inhibiert werden. Dies geschieht durch eine Erhöhung des lysosomalen pH-Werts (Dimri et al. 1995) mit Hilfe

des H⁺-ATPase-Inhibitors Bafilomycin A1 (Debacq-Chainiaux et al. 2009).

Jeweils 50.000 Zellen wurden in 500 µl Medium pro Kavität für die Analysetage 1, 2 und 4 und 37.500 Zellen in 500 µl Medium pro Kavität für die Analysetage 6 und 8 in 24-well-Platten ausgesät. Nach einer Adhärenz von 4 h wurde das Kulturmedium erneuert und die Platten mit unterschiedlichen Dosen (1, 2, 4, 6 und 8 Gy) bestrahlt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. An festgelegten Tagen nach Bestrahlung (Tag 1, 2, 4, 6 und 8) wurde der Anteil seneszenten Zellen bestimmt. Dafür wurde das Kulturmedium aus den Kavitäten in FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (320 g, 5 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl 100 nM Bafilomycin A1 in SFM resuspendiert und zurück auf die ursprünglichen Kavitäten der 24-well-Platte gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden 100 µl C12-FDG in SFM mit einer Endkonzentration von 50 µM in jede der Vertiefungen hinzugefügt und die Platten erneut für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Kulturmedium abgenommen, in FACS-Röhrchen überführt, zentrifugiert (320 g, 5 min, 4°C) und das Pellet mit PBS gewaschen. Gleichzeitig wurden die zu analysierenden Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Accutase oder TrypLE Express abgelöst. Der Ablösevorgang wurde durch Zugabe von FBS abgestoppt und die Zellsuspensionen mit den jeweiligen gelösten Pellets vereint. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (320 g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, die Zellen in eiskaltem PBS resuspendiert und sofort im FACS analysiert. Zellen mit einer starken grünen Fluoreszenz (hohes Signal im FITC-Kanal) und hohem SSC-Signal wurden hierbei als seneszent gewertet (siehe Abb. 5).

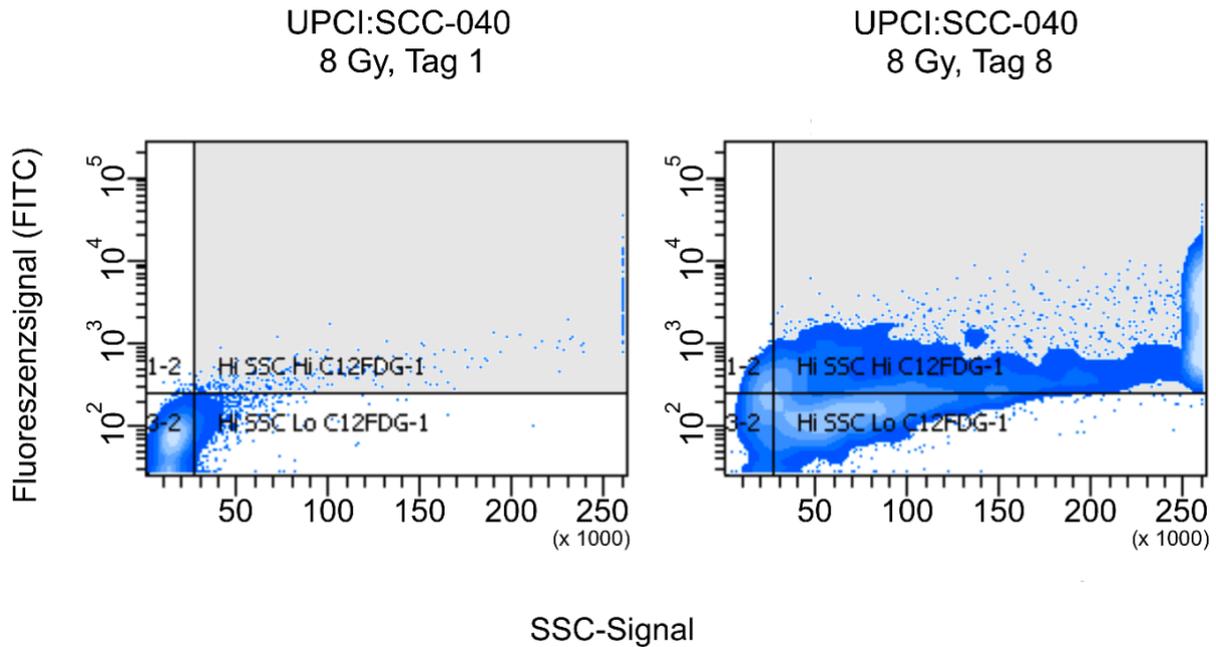


Abbildung 5: Exemplarische FACS-Plots der C12-FDG-Messung zur Identifikation der seneszenten Zellpopulation

Dargestellt ist die FACS-Analyse der UPCI:SCC-044 Zelllinie nach Bestrahlung mit 8 Gy und einer Inkubationszeit von 1 (linker Plot) und 8 Tagen (rechter Plot). Im FACS wurden Zellen mit einem starken FITC- und SSC-Signal (grau markierter Bereich) als seneszent gewertet. Am Beispiel der UPCI:SCC-044-Zelllinie zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine deutliche Zunahme des Anteils der seneszenten Zellpopulation (Hi SSC - Hi C12FDG-FITC).

8.5 Konditioniertes Medium seneszenten Zellen

Bei konditionierten Medien handelt es sich um Nährmedien, in denen Zellen für eine gewisse Zeit kultiviert wurden. Das konditionierte Medium enthält die abgesonderten Faktoren der Zellen und kann zur Kultur bzw. Stimulation weiterer Zellen verwendet werden. In dieser Arbeit wurden folgende konditionierte Medien verwendet:

- UPCI:SCC-040 bestrahlt
- UPCI:SCC-040 unbestrahlt
- UPCI:SCC-040 bestrahlt mit Metformin-Dauerinkubation

Zur Herstellung von konditioniertem Medium bestrahlter Zellen wurden 2×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm^2 ausgesät, um 80%ige Konfluenz zu gewähren. Nach 4-stündiger Adhärenz und Mediumwechsel mit 10 ml frischem Nährmedium pro Zellkulturflasche wurden die Zellkulturflaschen mit 8 Gy bestrahlt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden die Medien

entnommen, vereinigt und durch einen 0,2 µl Spritzenvorsatzfilter gefiltert, um einen Zelltransfer zu verhindern. Die Herstellung des konditioniertem Medium bestrahlter Zellen mit Metformin-Inkubation erfolgte nach dem gleichen Prinzip, mit der Ausnahme, dass 5 mM Metformin noch vor Bestrahlung in die Zellkulturflaschen gegeben wurde. Als Kontrolle in diesen Experimenten wurde konditioniertes Medium von nicht bestrahlten Zellen verwendet. Zur Herstellung dessen wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 10 ml Kulturmedium ausgesät (um an Tag 6 80%ige Konfluenz zu erzielen). Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden die Medien entnommen, vereinigt und durch einen 0,2 µl Spritzenvorsatzfilter gefiltert.

Für die Langzeitlagerung, wurden die gefilterten Medien in 50 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bei -80°C gelagert. Die Medien wurden nach einmaligem Auftauen nicht wieder eingefroren. Konditioniertes Medium bestrahlter UPCI:SCC-040 mit Metformin-Dauerinkubation wurde nicht langzeitgelagert, sondern sofort verwendet.

8.6 Molekularbiologische Methoden

8.6.1 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das NucleoSpin RNA Kit (vormals NucleoSpin RNA Kit II) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Methodik dieses Kits basiert auf der reversiblen Bindung der RNA an eine Silikamembran nach vorgeschalteter Guanidiniumthiocyanat-basierter Zellyse. Zusammengefasst wurden dafür 1×10^6 unbestrahlte und unbehandelte Zellen aller HNSCC-Zelllinien und der OKF6-Zelllinie mit β-Mercaptoethanol und einem Lyse-Puffer (Guanidinthiocyanat-haltig) homogenisiert um grobe Bestandteile zu entfernen und genomische DNA (gDNA) zu scheren. Dieser Vorgang inaktiviert ubiquitär vorkommende Ribonukleasen und schafft so die Bedingungen für die RNA-Bindung an die Silikamembran. Zelluläre DNA wurde mittels rekombinanter Desoxyribonuklease enzymatisch verdaut und die RNA nach einer Reihe an Wasch- und Zentrifugierschritten von der Silikamembran eluiert.

8.6.2 RNA-Quantifizierung

Die RNA-Konzentration im Eluat wurde in einem UV/Vis-Spektralphotometer anhand der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Verunreinigte Proteine absorbieren bei 280 nm, wodurch sich das A260/A280-Verhältnis verringert. Für reine RNA-Proben definierten wir ein A260/A280-Verhältnis im Bereich zwischen 1,7 und 2,0. RNA, die diesen qualitativen Merkmalen entsprach, wurde aliquotiert und für die Langzeitlagerung bei -80°C eingefroren oder zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

8.6.3 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Durch die RT (Reverse Transkriptase) wurde die zuvor extrahierte RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Dafür wurden Reagenzien des RevertAid RT Reverse Transcription Kits genutzt. Die Reaktionsansätze zur RNA-Denaturierung und RT wurden auf Eis wie folgt in 0,2-ml-PCR-Gefäßen gemischt:

Tabelle 8: Zusammensetzung der Reagenzien für die RNA-Denaturierung

Random-Hexamere (200ng/µL)	1 µl
Oligo(dT)18 Primer (500ng/µL)	1 µl
dNTP Mix, 10mM	1 µl
RNA (1 µg) in Nuklease-freiem Wasser verdünnt	9 µl

Bei der RNA-Denaturierung für 15 min bei 65°C wurden ungewollte Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst. Anschließend wurden weitere Reagenzien hinzugefügt (Tab. 9) und die reverse Transkription im Thermocycler mit einem Standardprotokoll (Tab. 10) gestartet. Synthetisierte cDNA wurde anschließend direkt zur qRT-PCR (quantitativen-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) bei -20°C langzeitgelagert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT

Nuklease-freies Wasser	2,5 µl
5x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock RNase-Inhibitor	0,5 µl
RevertAid H Minus M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl

Tabelle 10: Thermocycler-Programm für die RT

Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
25	10:00
42	60:00
72	10:00
4	∞

8.6.4 qRT-PCR zur Genexpressionsanalyse

Genexpressionsanalysen verschiedener DDR-Regulatoren unbestrahlter und unbehandelter Zellen wurden mittels qRT-PCR durchgeführt. Dafür wurde der 2x SYBR Green PCR Master Mix, 4 ng und 20 ng der vorher extrahierten cDNA und 300 nM Primerpaare (Sequenzen sind Tab. 6 aufgeführt) genutzt. Die Komponenten wurden in einer Ansatzgröße von insgesamt 20 µl pro Kavität in 96-Well-PCR-Platten zusammengesetzt (Tab. 11), die Platten mit einer hitzebeständigen, durchsichtigen Folie versiegelt und die qRT-PCR im PCR-Analysesystem mit einem Standardprotokoll (Tab. 12) gestartet.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qRT-PCR

2x SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
Vorwärtsprimer, 300 nM	3 µl
Rückwärtsprimer, 300 nM	3 µl
cDNA (4 ng und 20 ng) in Nuklease- freiem Wasser verdünnt	2 µl
Nuklease-freies Wasser	2 µl

Tabelle 12: qRT-PCR-Programm zur Genexpressionsanalyse

Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Anzahl des Zyklus
95	10:00	1x
95	00:15	45x
60	00:30	

Die relative Quantifizierung der Genexpressionsniveaus wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode durchgeführt. Die Effizienzkorrektur erfolgte unter Verwendung der zwei verschiedenen cDNA-Konzentrationen (4 und 20 ng cDNA pro Reaktion). Eine Matrix aus $\beta 2M$ (β -2-Mikroglobulin), δ -ALAS (δ -Aminolävulinatsynthase) und 18S rRNA (18S ribosomale RNA) diente zur Normalisierung, und die mittleren Genexpressionsniveaus der jeweiligen Zielgene über alle Zelllinien wurden als Kalibrator verwendet.

8.6.5 PCR zur Bestimmung des HPV-Status

Für die Bestimmung des HPV-Status wurde gDNA der verschiedenen Zelllinien extrahiert. Dafür wurde das NucleoSpin Tissue Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Methodik dieses Kits basiert auf der reversiblen Bindung der gDNA an eine Silikamembran nach vorgeschalteter mit Guanidinhydrochlorid-basierter Zelllyse. Anschließend wurde der 2x SYBR Green PCR Master Mix, 20 ng der vorher extrahierten gDNA und HPV-spezifische Primer (Sequenzen sind Tab. 6 aufgeführt) genutzt. Die Komponenten wurden in einer Ansatzgröße von insgesamt 20 µl pro Kavität in 96-Well-PCR-Platten zusammengesetzt (Tab. 13), die Platten mit einer hitzebeständigen, durchsichtigen Folie versiegelt und die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) im PCR-Analysesystem mit einem Standardprotokoll (Tab. 14) gestartet.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Reagenzien für die PCR zur Bestimmung des HPV-Status

2x SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
GP5+ Primer, 10 µM	1,8 µl
GP6+ Primer, 10 µM	1,8 µl
gDNA (20 ng) in Nuklease-freiem Wasser verdünnt	2 µl
Nuklease-freies Wasser	4,4 µl

Tabelle 14: PCR-Programm zur Bestimmung des HPV-Status

Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Anzahl des Zyklus
95	10:00	1
95	00:15	45
54	00:30	
72	00:15	
95	00:05	
65	01:00	1
97		
40	00:30	1

8.6.6 RT-PCR zur Bestimmung des *TP53*-Status

Der *TP53*-Status aller Zelllinien wurde durch cDNA-Sequenzierung mit Hilfe des HotStar HiFidelity Polymerase Kits bestimmt. Dafür wurden 80 ng cDNA pro Reaktion mit 1 μ M p53-Vorwärtsprimer und 1 μ M p53-Rückwärtsprimer mit 5 U HotStar HiFidelity DNA-Polymerase in 1xHotStar HiFidelity Reaktionspuffer und 1xQ-Lösung in ein Volumen von 100 μ l gegeben. Die PCR wurde unter folgendem Programm gestartet:

Tabelle 15: RT-PCR-Thermocycler Programm zur Bestimmung des *TP53*-Status

Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Anzahl des Zyklus
95	05:00	1
95	00:15	40
60	01:00	
72	01:30	
72	10:00	1
10	∞	

Daraufhin erfolgte die Reinigung des PCR-Produkts mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kit nach Herstellerangaben. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. SeqLab, Göttingen, Deutschland.

8.7 Statistische Grundlagen

8.7.1 Hauptkomponentenanalyse

Bei der PCA (Hauptkomponentenanalyse) handelt es sich um eine statistische Methode mit dem Ziel einer umfassenden Reproduktion eines umfangreichen Datensatzes durch eine möglichst kleine Anzahl von Hauptkomponenten. Somit dient die PCA dazu umfangreiche Datensätze zu strukturieren, zu vereinfachen und zu veranschaulichen (Müller, 2009).

Das Berechnen der Hauptkomponenten wurde freundlicherweise von

Priv.-Doz. Dr. Steffen Unkel des Instituts für Medizinische Statistik der Universität Göttingen durchgeführt.

8.7.2 Statistische Signifikanz

Die Schwelle der statistischen Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Korrelationen wurden nach Pearson berechnet und sich an folgendem Wertebereich für den Pearson-Korrelationskoeffizienten orientieren:

Tabelle 16: Wertebereich des Pearson-Korrelationskoeffizienten

Korrelationskoeffizient	Einstufung
$R \leq 0,2$	Sehr geringe Korrelation
$0,2 < R \leq 0,5$	Geringe Korrelation
$0,5 < R \leq 0,7$	Mittlere Korrelation
$0,7 < R \leq 0,9$	Hohe Korrelation
$0,9 < R \leq 1,0$	Sehr hohe Korrelation

8.8 In-vivo-Experimente

In-vivo-Daten des UPCI:SCC-040- und UD-SCC-2-Zellwachstums in athymischen nu/nu Mäusen nach fraktionierter Bestrahlung mit 10×2 Gy wurden freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Verena Jendrossek und Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Diana Klein des Instituts für Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen zur Verfügung gestellt.

9 Ergebnisse

9.1 HPV- und *TP53*-Status der HNSCC-Zelllinien

Um die Fragestellung angemessen zu beantworten, wurde eine repräsentative Sammlung von HNSCC-Zelllinien mit unterschiedlichen genetischen Variationen untersucht. Diese wurden zunächst auf ihren HPV- und *TP53*-Status analysiert.

Tabelle 17: HPV- und *TP53*-Status der HNSCC-Zelllinien

Zelllinie	HPV-Status	<i>TP53</i> -Status
UD-SCC-2	Positiv	Wildtyp
CAL-27	Negativ	H193L
CAL-33	Negativ	R175H
UPCI:SCC-040	Negativ	<i>TP53</i> cDNA nicht nachweisbar
UPCI:SCC-099	Negativ	P177R
UPCI:SCC-131	Negativ	Deletion 58 Frameshift (200 Nukleotide)
UPCI:SCC-154	Positiv	Wildtyp

Hierbei zeigten sich die UD-SCC-2 und UPCI:SCC-154 HPV-positiv mit Wildtyp *TP53*, wogegen alle anderen Zelllinien HPV-negativ waren und bekannte Mutationen in *TP53* hatten. Letztlich verfügt also keine der verwendeten Zelllinien über ein funktionelles p53-Protein, da die mit der HPV-Infektion verbundene Expression des Onkogenprodukts E6 zu einer p53-Inaktivierung führt (Leemans et al. 2011). Erwähnt sei hier, dass der *TP53*-Status der UPCI:SCC-040-Zelllinie in der Literatur umstritten ist. Es finden sich unterschiedliche Aussagen von Wildtyp *TP53* zu mutiertem *TP53* (Telmer et al. 2003; Gollin et al. 2012).

9.2 Klonogenes Überleben und die Berechnung des Strahlenresistenzindex

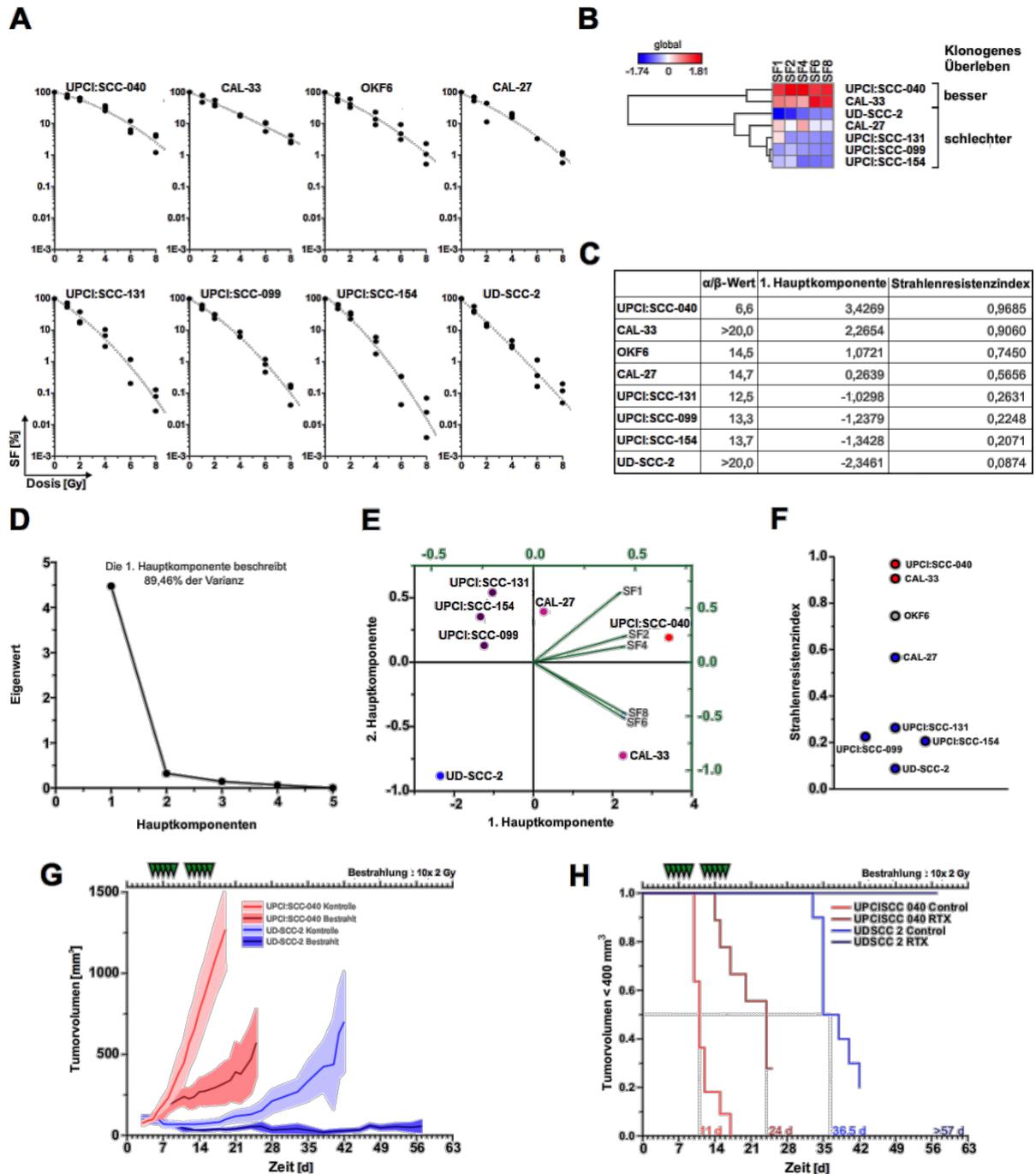


Abbildung 6: Klonogenes Überleben und die Berechnung des Strahlenresistenzindex

A) Die Überlebensfraktion (SF) klonogener Zellen nach Bestrahlung wurden mittels Überlebenskurven graphisch dargestellt und anhand des linear-quadratischen-Modells gefittet. **B)** SF-Mittelwerte in (A) wurden standardisiert und einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen. **C–F)** PCA der standardisierten klonogenen Überlebensdaten **C)** Strahlenresistenzindizes wurden durch Transformation der Scores der 1. Hauptkomponente ermittelt. α/β -Werte des LQ-Modells stehen im Vergleich. **D)** Das Eigenwertdiagramm zeigt die Eigenwerte der extrahierten Hauptkomponenten. **E)** Der Biplot macht die Beziehungen zwischen den Beobachtungen (Zelllinien) und den Variablen (SF1–SF8) im Raum der ersten beiden Hauptkomponenten deutlich. Die grüne Achse beschreibt die Ladungskoeffizienten der Input-Variablen. Die schwarze Skala beschreibt die Hauptkomponenten-Scores der Beobachtungen (Zelllinien). **F)** Rangfolge der Zelllinien nach Strahlenresistenzindex.

G–H) UPCI:SCC-040 und UD-SCC-2 wurden in die Flanke von athymischen Mäusen implantiert, unbehandelt gelassen oder 10x mit 2 Gy bestrahlt (grüne Pfeile), und das Tumorgrößenwachstum wurde beobachtet. **G)** Durchschnittliches Tumolvolumen im Zeitverlauf. Das umgebende Areal stellt das 95%-Konfidenzintervall dar. **H)** Kaplan-Meier-Analyse des Tumorwachstums mit Endpunkt Tumolvolumen < 400 mm³. Die mediane Zeit zum Erreichen des Endpunkt-Kriteriums ist für alle Tiergruppen angegeben (wird in der Bestrahlungsgruppe der UD-SCC-2-Zellen nicht erreicht).

In Abb. 6A sind die SF-Mittelwerte drei voneinander unabhängiger Wiederholungen für jede Strahlendosis mittels des LQ-Modells halblogarithmisch gefittet (Unkel et al. 2016). Die Reihenfolge der Zelllinien in der Abbildung folgt dem Überleben der Zellen; demnach zeigten UPCI:SCC-040 das beste klonogene Überleben und die HPV-positiven UPCI:SCC-154- und UD-SCC-2-Zelllinien das schlechteste klonogene Überleben nach Bestrahlung. Diese Ergebnisse entsprechen den Erfahrungen aus der Literatur in dem Sinne, dass HPV-positive Tumoren eine eigene Untergruppe innerhalb der HNSCCs bilden, die sich in Ätiologie, auf molekularer Ebene und im klinischen Ergebnis klar von den HPV-negativen Tumoren unterscheidet; HPV-positive HNSCCs haben im Allgemeinen eine günstigere Prognose (was sich in den Ergebnissen des Koloniebildungstests durch die niedrigere Strahlenresistenz äußert) (Leemans et al. 2011). Im Hinblick auf den *TP53*-Status wird in der Literatur eine positive Korrelation zwischen Mutation und Strahlenresistenz beschrieben (Perri et al. 2015). Bis auf die HPV-positiven Zelllinien sind alle weiteren Zellen *TP53*-mutiert oder *TP53*-negativ, also entsprechen auch diese Ergebnisse den Erwartungen. Allerdings tragen voraussichtlich auch andere, *TP53*-unabhängige Mechanismen zur beobachteten Strahlenresistenz der HPV-negativen HNSCC-Zelllinien mit defektem und/oder fehlendem *TP53* bei.

Um Ähnlichkeiten in der Strahlenresistenz der Zelllinien zu identifizieren bzw. um Gruppen zu bilden, wurde anschließend eine hierarchische Clusteranalyse der klonogenen Überlebensdaten durchgeführt und diese in Abb. 6B mittels Heatmap und Dendrogramm dargestellt. Eine hierarchische Clusteranalyse gruppiert verwandte Werte, die zueinander eine geringe Distanz bzw. eine hohe Ähnlichkeit aufweisen, miteinander. Die so gefundenen Gruppen werden als Cluster bezeichnet. Eine Heatmap ist eine graphische Methode, um eine Zahlenmatrix darzustellen, wobei graduelle Farben verwendet werden, um numerische Werte auszudrücken. Um zu vermeiden, dass es zu einer unterschiedlichen Gewichtung der Ergebnisse kommt, wurden die SF-Mittelwerte einer statistischen Standardisierung unterzogen. Dafür

wurde ein Gesamtmittelwert aus allen SF-Mittelwerten für jede Strahlendosis errechnet, dieser von den einzelnen SF-Mittelwerten subtrahiert und das Ergebnis nachfolgend durch die Standardabweichung des Gesamtmittelwerts dividiert:

$$\frac{X - Y}{Z}$$

X; SFx-Mittelwert der einzelnen Zelllinien, Y; SFx-Gesamtmittelwert, Z; Standardabweichung für den Gesamtmittelwert.

Die hierarchische Clusteranalyse der klonogenen Überlebensdaten identifizierte zwei Cluster von HNSCC-Zelllinien: 1) strahlenresistente Zelllinien mit einem, im Vergleich zu den nicht-malignen OKF6-Zellen, besserem klonogenen Überleben nach Bestrahlung (UPCI:SCC-040 und CAL-33) und 2) strahlensensible Zelllinien mit einem schlechteren klonogenen Überleben im Vergleich zu OKF6 (CAL-27, UPCI:SCC-099, UPCI:SCC-131 und die HPV-positiven UD-SCC-2 und UPCI:SCC-154) (Abb. 6B). Diese Einteilung lässt sich auch in der Heatmap nachvollziehen, in der sich UPCI:SCC-040 und CAL-33 rot im Vergleich zu den restlichen Zelllinien darstellten.

Anschließend wurden die individuellen α/β -Werte der Zelllinien aus den verschiedenen Zellüberlebenskurvenverläufen durch linear-quadratische Regression bestimmt (Abb. 6D). Ist der α/β -Wert hoch, so ist die Schulter der Zellüberlebenskurven schwach ausgeprägt und die Reparaturfähigkeit bzw. Strahlenresistenz gering (und umgekehrt) (Herrmann et al. 2006). In Hinblick auf die Ergebnisse ließ sich in unseren Zelllinien kein derartiges Verhältnis bestätigen. Beispielsweise zeigten CAL-33 und UD-SCC-2 α/β -Werte von > 20 , obwohl die Zelllinien sehr unterschiedlich auf Bestrahlung reagierten und in unterschiedliche Cluster fielen. Außerdem waren die α/β -Werte von UPCI:SCC-131, UPCI:SCC-099 und UPCI:SCC-154 niedriger als der α/β -Wert von OKF6, obwohl die OKF6-Zelllinie das bessere klonogene Überleben nach Bestrahlung zeigte. Tatsächlich hat der α/β -Wert aufgrund der Formel aus der er berechnet wird eine große Einschränkung: er erkennt es, die Steigung der Überlebenskurven in ihrer Gesamtheit zu beurteilen. Dies ist für die inhärente Strahlenresistenz von großer Bedeutung (Unkel et al. 2016). Besitzen Zellüberlebenskurven vergleichbare Krümmungen, aber unterschiedliche Steigungen (wie die beinahe linearen Zellüberlebenskurven von CAL-33 und UD-SCC-2), so ist der α/β -Wert nicht aussagefähig.

Daraufhin stellte sich die Frage, ob es möglich ist, einen zuverlässigeren Wert zu erstellen, der diese Einschränkung überwinden kann und die Unterschiede in der inhärenten Strahlenresistenz besser quantifizieren kann. Zu diesem Zweck wurden die standardisierten klonogenen Überlebensdaten zur Dimensionalitätsreduktion einer PCA unterzogen. Im Wesentlichen handelt es sich bei der PCA um eine statistische Methode mit dem Ziel einer umfassenden Reproduktion eines umfangreichen Datensatzes durch eine möglichst kleine Anzahl von Hauptkomponenten. Somit dient die PCA dazu umfangreiche Datensätze zu strukturieren, vereinfachen und veranschaulichen (Müller, 2009). Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass alle Variablen in die Dimensionsreduktion miteinbezogen werden. Dies führt zu einer Hierarchie der einzelnen Hauptkomponenten, wodurch das resultierende Modell auf eine beliebige Anzahl von Dimensionen reduziert werden kann. Jedoch werden Hauptkomponenten deren Eigenwert kleiner als 1 ist für unbedeutend gehalten, da sie wegen der geringen Varianzaufklärung nicht mehr zur Datenreduktion beitragen. Demzufolge besagt das Kaiser-Guttman-Kriterium, dass ausschließlich Hauptkomponenten mit einem Eigenwert > 1 beibehalten werden sollen (Jolliffe et al. 1992). In der PCA der standardisierten klonogenen Überlebensdaten entspricht nur die 1. Hauptkomponente, die bereits 89,46% der Varianz des Originaldatensatzes beschreibt, diesen Anforderungen (Abb. 6D). Zudem ist im Biplot (Abb. 6E) deutlich zu erkennen, dass die 1. Hauptkomponente von allen Input-Variablen nahezu gleichstark beladen wird. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die 1. Hauptkomponente ein ausgewogenes Maß aller standardisierten klonogenen Überlebensdaten erfasst. Dementsprechend wurde die 1. Hauptkomponente transformiert um einen Strahlenresistenzindex zu ermitteln.

In der Tat spiegelte der Vergleich der Strahlenresistenzindizes in Abb. 6F die Gruppierung der hierarchischen Clusteranalyse wieder. UPCI:SCC-040 und CAL-33 verfügten über einen höheren Strahlenresistenzindex als die nicht-maligne OKF6-Zelllinie. CAL-27, UPCI:SCC-099, UPCI:SCC-131 sowie die HPV-positiven UD-SCC-2 und UPCI:SCC-154 zeigten hingegen einen niedrigeren Strahlenresistenzindex als OKF6. Demnach überwindete der Strahlenresistenzindex die Limitation des α/β -Wertes und wurde als quantifizierbarer Faktor der Strahlenresistenz gewertet.

Im Anschluss stellte sich die Frage, ob sich die Ergebnisse der in-vitro-Versuche auch

in-vivo reproduzieren lassen. Dafür wurden die strahlenresistenten UPCI:SCC-040 und die strahlensensiblen UD-SCC-2 in die Flanke von athymischen nu/nu Mäusen implantiert (heterotopes, immunkompromittiertes Flankentumor Modell) (Abb. 6G–H). Drei Tage nach Tumorimplantation erhielten die Mäuse eine fraktionierte Bestrahlung von 10x 2 Gy. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Mäuse. Die Ergebnisse zeigten, dass die strahlenresistenten UPCI:SCC-040 ohne Bestrahlung nach 11 Tagen ein Tumolvolumen von 400 mm³ erreichten, während die strahlensensiblen, HPV-positiven UD-SCC-2 dasselbe Volumen erst nach 36,5 Tagen erreichten. Nach fraktionierter Bestrahlung wuchsen die UPCI:SCC-040 nach 24 Tagen (13 Tage später) auf dasselbe Tumolvolumen heran, während das Wachstum der UD-SCC-2 nach 57 Tagen nicht weiter verfolgt wurde, da es zu keiner weiteren signifikanten Größenzunahme kam. Diese Ergebnisse bestätigten im Wesentlichen die in-vitro-Daten und zeigten, dass es klare Unterschiede in der inhärenten Strahlenresistenz der HNSCC-Zelllinien gibt.

9.3 Genexpressionslevels verschiedener DNA-Schadensreparaturantwort-Regulatoren korrelieren nicht mit der Strahlenresistenz

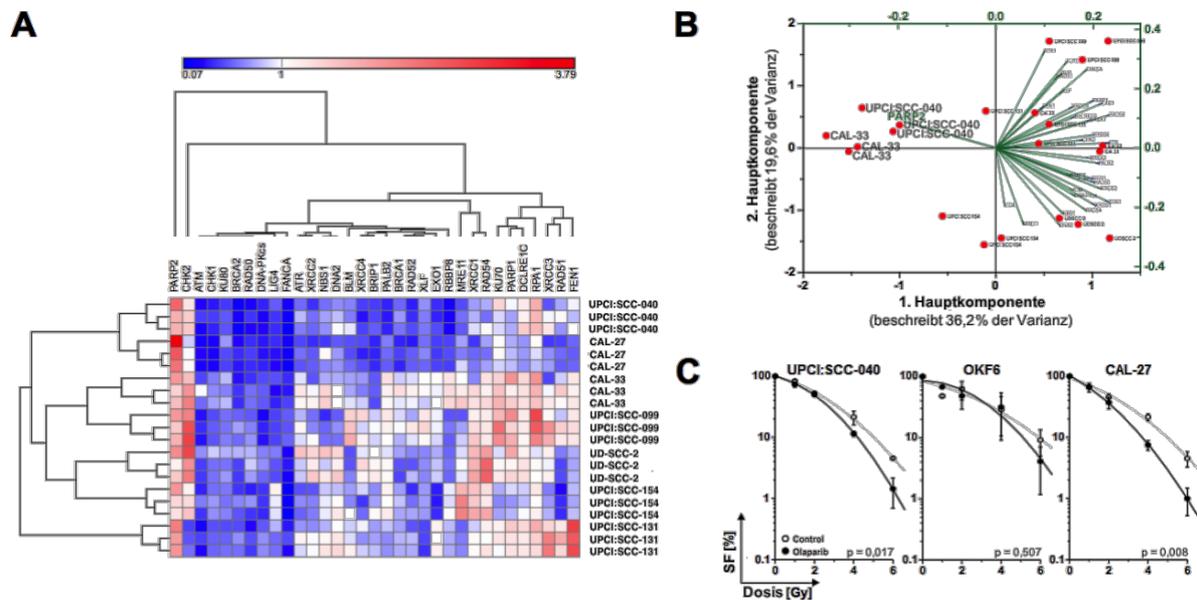


Abbildung 7: Genexpressionslevels verschiedener DDR-Regulatoren korrelieren nicht mit der Strahlenresistenz

A) Genexpressionsniveaus verschiedener DNA-Schadensreparaturantwort-Regulatoren wurden mit Hilfe der qRT-PCR relativ zu OKF6 Genexpressionsniveaus ermittelt. Drei voneinander unabhängiger Wiederholungen wurden einer hierarchischen Clusteranalyse unterworfen. **B)** Der Biplot macht die Beziehungen zwischen den Variablen im Raum der ersten beiden Hauptkomponenten deutlich. Die grüne Achse beschreibt die Beladung der Einzelwerte der Genexpressionsniveaus. Die schwarze Skala beschreibt die ersten beiden Hauptkomponenten der einzelnen Genexpressionswerte. **C)** Das klonogene Überleben der UPCI:SCC-040-, OKF6- und CAL-27-Zellen wurde nach Bestrahlung und Behandlung mit 100 nM Olaparib mittels Koloniebildungstest bestimmt.

Die Mechanismen, die einer Strahlenresistenz einer Tumorzelle zugrunde liegen, sind vielfältig. Eine effektive DNA-Schadensreparaturantwort ist von entscheidender Bedeutung (Begg et al. 2011). Um prädiktive Marker für die Strahlenresistenz der HNSCC-Zelllinien zu finden, führten wir mittels qRT-PCR Profiling Genexpressionsanalysen zentraler DNA-Schadensreparaturantwort-Regulatoren der Zellen (ohne Bestrahlung) durch. Wir griffen auf eine repräsentative Sammlung von DNA-Schadensreparaturantwort-Regulatoren – insbesondere mit Beteiligung in der DNA-DSB-Reparatur – zurück, da DNA-DSBs als die schwerste Form der Photonen-induzierten DNA-Schäden zur angestrebten Tumorzelltötung angesehen werden (Begg et al. 2011). Das Genexpressionsniveau der nicht-malignen OKF6-Zellen diente als Kalibrator (Basiswert = 1). Demnach bedeuten Werte > 1, dass die jeweilige Zelllinie eine höhere Genexpression relativ zu OKF6 aufwies und

Werte < 1 , dass die jeweilige Zelllinie eine geringere Genexpression relativ zu OKF6 aufwies. Die erhaltenen Mittelwerte drei unabhängiger Wiederholungen wurden einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen und die Ergebnisse durch eine Heatmap mit Dendrogramm dargestellt. Die Heatmap stellte eine Überexpression rot und eine Unterexpression blau dar.

Die hierarchische Clusteranalyse der Ergebnisse in Abb. 7A konnte das Cluster der Zellen wie aus den klonogenen Überlebensdaten (Abb. 6B) nicht widerspiegeln. Anstatt dass UPCI:SCC-040 und CAL-33 eine gemeinsame Gruppe bildeten, gruppierte die hierarchische Clusteranalyse der Genexpressionsniveaus die strahlenresistenten UPCI:SCC-040 mit den strahlensensiblen CAL-27 und die strahlenresistenten CAL-33 mit den strahlensensiblen UPCI:SCC-099. Die HPV-positiven UD-SCC-2 sowie UPCI:SCC-154 bildeten ihren eigenen Cluster und UPCI:SCC-131 isolierten sich von allen weiteren Zelllinien. Zusätzlich zum Clustering nach Genexpressionsniveaus findet sich in Abb. 7A eine Clusteranalyse der untersuchten DDR-Regulatoren. Hier isolierten sich die Gene des PARP2- und CHK1-Proteins von allen anderen Regulatoren. Die Heatmap veranschaulicht demnach, dass PARP2 und CHK1 als einzige DDR-Regulatoren relativ zu OKF6 in allen untersuchten HNSCC-Zelllinien überexprimiert waren.

Anschließend wurde die gesamte Matrix in Abb. 7A einer PCA unterzogen und die Ergebnisse in einem Biplot dargestellt (Abb. 7B). Da sich die Matrix der Genexpressionsniveaus in ihrem Datengehalt viel komplexer darstellte, deckte die 1. Hauptkomponente der Genexpressionsanalyse nur 36,20% der Gesamtvarianz ab, während die 1. Hauptkomponente der klonogenen Überlebensdaten 89,46% der Gesamtvarianz entsprach (Abb. 6E). Dennoch zeigte der Biplot, dass der Ladungsvektor von PARP2 sich von allen weiteren DDR-Regulatoren isolierte. Zudem wies die Richtung des Ladungsvektoren in den Bereich der Zelllinien UPCI:SCC-044 und CAL-27, d.h. die PARP2-Überexpression war am dominantesten in diesen beiden Zelllinien. Ob dies ursächlich zur beobachteten Strahlenresistenz dieser beiden Zelllinien beitrug, sollte im Folgenden geklärt werden.

PARP1 und -2 binden als Antwort auf strahleninduzierte DNA-Schäden insbesondere an DNA-DSBs, was zur quantitativen Synthese einer Poly(ADP-Ribose)-Kette führt und die Dekondensation des Chromatins induziert und weitere DNA-Reparaturgene rekrutiert. Obwohl PARP1 und PARP2 keine direkten Reparaturfunktionen haben, sind

sie für die BER und NHEJ erforderlich (Kim et al. 2015). Um aufzuklären, ob die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen und PCA tatsächlich darauf hinwiesen, dass PARP2 eine mechanistische und funktionelle Rolle in der Strahlenresistenz von UPCI:SCC-040 und CAL-27 spielte, wurde die Funktion des PARP2 durch den etablierten PARP-Inhibitor Olaparib inhibiert. Dafür wurden Koloniebildungstests der beiden Zelllinien unter Behandlung mit 100 nM Olaparib durchgeführt. Als Kontrolle dienten Koloniebildungstests derselben Zelllinien ohne Olaparib sowie Koloniebildungstests der OKF6 mit und ohne Olaparib. Wie in Abb. 7C zu erkennen ist, führte Olaparib in der Tat zu einer signifikanten Minderung der Klonogenität von UPCI:SCC-040 und CAL-27, während bei OKF6 keine signifikante Veränderungen zu beobachten waren.

Zusammenfassend lassen sich aus der Genexpressionsanalyse mehrere Schlussfolgerungen ziehen: 1) die hierarchische Clusteranalyse ergibt keine Assoziation zwischen den Strahlenresistenzindizes und den Genexpressionslevels der DDR-Faktoren. 2) Die Heatmap zeigt, dass bis auf PARP2 und CHK2 alle zentralen DDR-Regulatoren in den HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu OKF6-Keratinocyten unterexprimiert sind. 3) PARP2 besitzt in UPCI:SCC-040 und CAL-27 einen Anteil an der inhärenten Resistenz gegenüber Bestrahlung. 4) Dieser Effekt lässt sich durch eine Inhibition mit Olaparib signifikant reduzieren.

Dass es uns möglich war, mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse PARP2 von den anderen DDR-Regulatoren zu isolieren und mittels PCA und Biplot diejenigen Zelllinien zu identifizieren, deren Strahlenresistenz zum Teil durch verstärkte PARP2-Expression vermittelt wird, ist als ein bedeutendes Ergebnis dieser Art von Analysen zu werten.

9.4 Strahlungsinduzierte Apoptose korreliert nicht mit der Strahlenresistenz

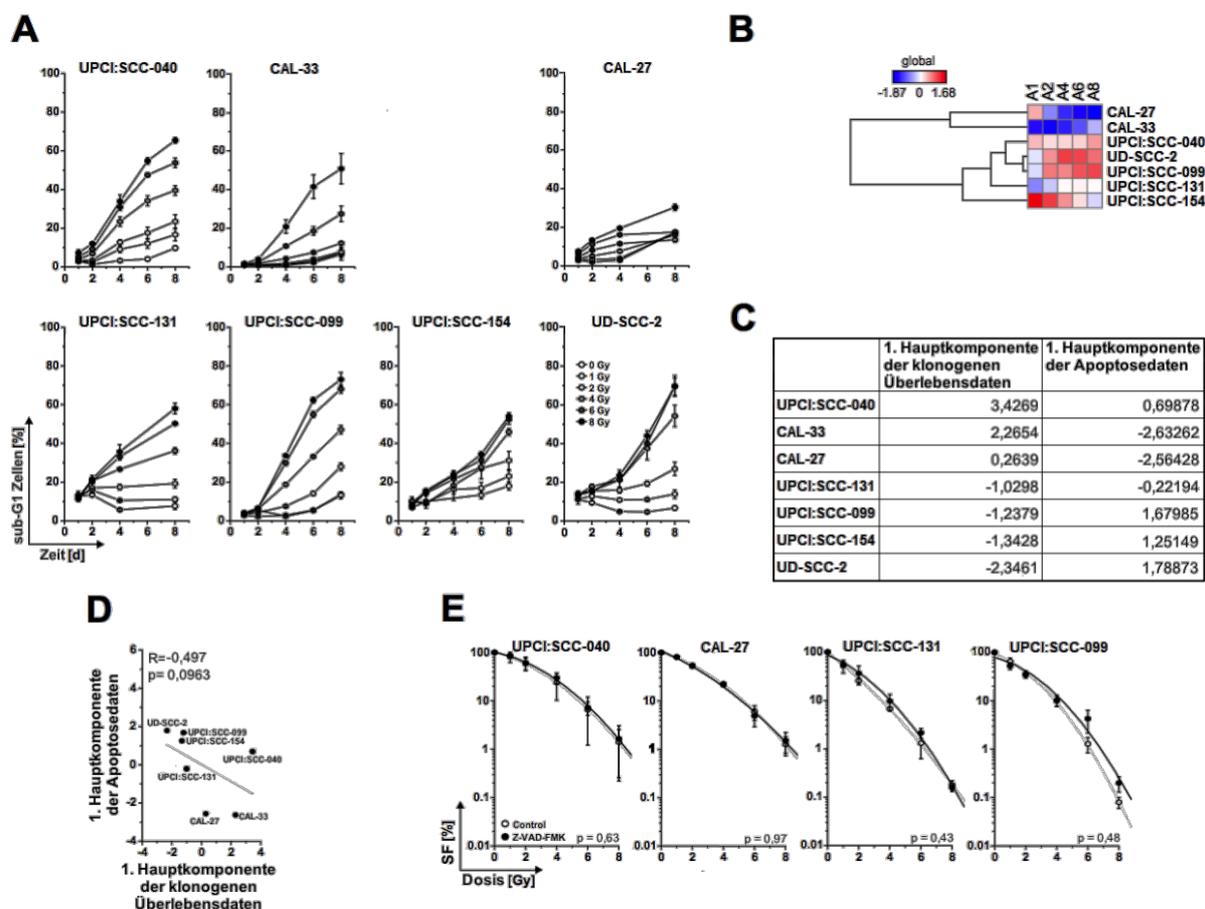


Abbildung 8: Strahlungsinduzierte Apoptose korreliert nicht mit der Strahlenresistenz

A) Der Anteil apoptotischer Zellen wurde nach Bestrahlung der Zelllinien als Prozentsatz von subG1-Zellen im FACS bestimmt. Mittelwerte aus Dreifachwerten sind dargestellt. **B)** Die Mittelwerte des Anteils apoptotischer Zellen wurden standardisiert und einer hierarchischen Clusteranalyse unterworfen. **C)** PCA der standardisierten Apoptose-Mittelwerte. Die Scores der 1. Hauptkomponente der klonogenen Überlebensdaten stehen im Vergleich zu den Scores der 1. Hauptkomponente der Apoptose-Daten. **D)** Pearson-Korrelation der beiden Hauptkomponenten in (C). **E)** Das klonogene Überleben der UPCI:SCC-040-, CAL-27-, UPCI:SCC-131- und UPCI:SCC-099-Zellen wurde nach Bestrahlung und Behandlung mit 50 μ M z-VAD-fmk mittels Koloniebildungstest bestimmt.

Die inhärente Strahlenresistenz hängt unter anderem davon ab, wie effektiv bestrahlte Tumorzellen den Zelltod einleiten. Als einer der wichtigsten Zelltodmechanismen trägt die Apoptose maßgeblich zu der strahlenvermittelten Zytotoxizität bei (Eriksson et al. 2010; Rudner et al. 2001). Um die Unterschiede in der Apoptose-Induktion nach Bestrahlung mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy beurteilen zu können, wurden die Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 6 und 8 Tagen wurde der Prozentsatz der apoptotischen Zellen, die sich

im FACS im subG1-Peak im Vergleich zum charakteristischen Doppelpeak nicht-apoptotischer Zellen kennzeichnen, bestimmt. Zellübergreifend ließen sich unterschiedliche Ergebnisse beobachten. Im Allgemeinen zeigten UPCI:SCC-040, CAL-33, UPCI:SCC-099 und UPCI:SCC-154 eine dosis- und zeitabhängige Steigerung im Anteil apoptotischer subG1-Zellen. UPCI:SCC-131 und UD-SCC-2 reagierten erst bei hohen Bestrahlungsdosen mit einer Apoptose-Antwort. CAL-27 wiesen den geringsten Anteil apoptotischer Zellen auf. UPCI:SCC-040 zeigten von allen Zelllinien den höchsten Anteil apoptotischer Zellen nach Bestrahlung (Abb. 8A).

Um die Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurde eine hierarchische Clusteranalyse der Apoptose-Daten durchgeführt und diese mittels einer Heatmap mit Dendrogramm dargestellt (Abb. 8B). Dafür wurden die Mittelwerte des Anteils apoptotischer Zellen an Tag 8 nach Bestrahlung mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy einer statistischen Standardisierung unterzogen. A1 steht demnach für den standardisierten Mittelwert apoptotischer Zellen an Tag 8 nach Bestrahlung mit 1 Gy. Wie die hierarchische Clusteranalyse der Genexpressionsniveaus (Abb. 7A) zeigte auch dieses Dendrogramm eine unterschiedliche Gruppierung der Zelllinien im Vergleich zu den klonogenen Überlebensdaten (Abb. 6B). Beispielsweise zeigten die Zellen mit der höchsten Strahlenresistenz, UPCI:SCC-040, und die Zellen mit der niedrigsten Strahlenresistenz, UD-SCC-2, beide ein hohes Maß an Apoptose-Induktion nach Bestrahlung. Die Ähnlichkeit drückte sich im Dendrogramm durch das gemeinsame Clustern der zwei Zelllinien aus. Diese Daten waren die ersten Hinweise darauf, dass die Apoptose als Zelltodmechanismus nicht der entscheidende Faktor zu sein scheint, der die inhärente Strahlenresistenz der HNSCCs beeinflusst.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde mit den standardisierten Mittelwerten der Apoptose eine PCA durchgeführt und die Scores der 1. Hauptkomponente der Apoptose-Induktion mit den Scores der 1. Hauptkomponente der klonogenen Überlebensdaten einer Korrelationsanalyse nach Pearson unterzogen (Abb. 8C und 8D). Bei dem Pearson-Korrelationskoeffizient handelt es sich um ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen. Zeigen diese Merkmale eine vollständige Korrelation (alle Messwerte liegen in einer 2-dimensionalen Graphik auf einer Geraden) so ist $R = 1$. Zwischen den Apoptose-Daten nach Bestrahlung und der Klonogenität ergab sich eine negative, nicht-signifikante Korrelation ($R = -0,497$; $p = 0,0963$).

Es stellte sich also die Frage, ob eine Inhibition der Apoptose-Induktion das klonogene Überleben der Zellen beeinflussen würde. Mit der Hypothese, dass die Apoptose für die inhärente Strahlenresistenz der Zellen von nachgeordneter Bedeutung ist, sollte eine Inhibition zu keiner verbesserten Klonogenität der Zelllinien führen. Dafür wurde der zellpermeable Breitspektrum-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk verwendet, der als Suicide-Substrat irreversibel ins aktive Zentrum von aktivierten Caspasen bindet und damit zu einer irreversiblen Hemmung führt. Caspasen gehören zu den Haupt-Effektormolekülen der Apoptose. Ihre Inhibition führt zu einer starken Verlangsamung bzw. zu einer Blockierung der Apoptose-Induktion. Demnach wurden Koloniebildungstests der strahlenresistenten und stark in Apoptose gehenden UPCI:SCC-040 und der strahlensensiblen CAL-27, UPCI:SCC-099 und UPCI:SCC-131 unter Dauerinkubation mit 50 μ M z-VAD-fmk durchgeführt. Als Kontrolle dienten Koloniebildungstests derselben Zelllinien ohne z-VAD-fmk. Wie in Abb. 8E zu erkennen ist, führte die Behandlung mit z-VAD-fmk in keiner der Zelllinien zu einer signifikanten Veränderung des klonogenen Überlebens. Die Tatsache, dass die Inhibition der Apoptose keinen Einfluss auf das klonogene Überleben der HNSCC-Zellen hatte, zeigte dass die Apoptose für die inhärente Strahlenresistenz von nachgeordneter Bedeutung ist.

9.5 Strahlungsinduzierte Seneszenz korreliert mit der Strahlenresistenz

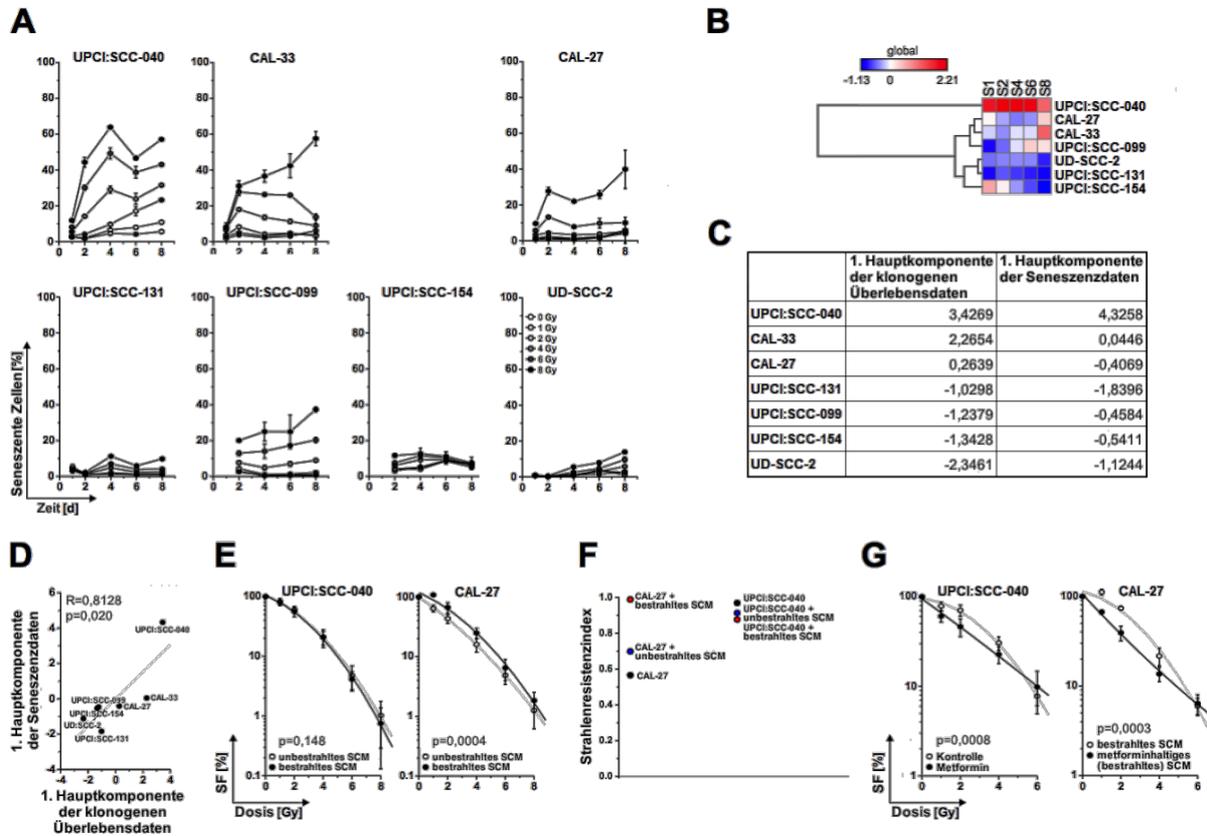


Abbildung 9: Strahlungsinduzierte Seneszenz korreliert mit der Strahlenresistenz

A) Der Anteil seneszenten Zellen wurde nach Bestrahlung der Zelllinien im FACS als Prozentsatz von Zellen mit hohem FITC- und SSC- Signal bestimmt. Mittelwerte aus Dreifachwerten sind dargestellt. **B)** Die Mittelwerte des Anteils seneszenten Zellen wurden standardisiert und einer hierarchischen Clusteranalyse unterworfen. **C)** PCA der standardisierten Seneszenz-Mittelwerte. Die Scores der 1. Hauptkomponente der klonogenen Überlebensdaten steht im Vergleich zu den Scores der 1. Hauptkomponente der Seneszenz-Daten. **D)** Pearson-Korrelation der beiden Hauptkomponenten in (C). **E)** Das klonogene Überleben der UPCI:SCC-040- und CAL-27-Zelllinien wurde nach Bestrahlung und Dauerinkubation mit konditioniertem Medium bestrahlter UPCI:SCC-040-Zellen („bestrahtes SCM“) mittels Koloniebildungstest bestimmt. Als Kontrolle diente die Dauerinkubation mit konditioniertem Medium unbestrahlter UPCI:SCC-040-Zellen („unbestrahtes SCM“). **F)** Konditionierte Medien unbestrahlter und bestrahlter UPCI:SCC-040 führte zu einem signifikanten Anstieg des Strahlenresistenzindex der CAL-27. **G)** Das klonogene Überleben der UPCI:SCC-040 wurde nach Bestrahlung und Behandlung mit 5 mM Metformin mittels Koloniebildungstests bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Das klonogene Überleben der CAL-27 wurde nach Bestrahlung und Dauerinkubation mit konditioniertem Medium bestrahlter UPCI:SCC-040-Zellen (generiert in Ab- und Anwesenheit von Metformin („metforminhaltiges bestrahtes SCM“)) verglichen.

Die zelluläre Seneszenz gilt als ein bekannter tumorsuppressiver Mechanismus. Paradoxerweise haben seneszente Zellen durch ihre metabolische Aktivität parakrine Wirkungen die pleiotrope Effekte auf umliegende Nachbarzellen und das Gewebemilieu besitzen (Coppé et al. 2010). Da sich keine prädiktiven

DNA-Schadensreparaturantwort-Regulatoren fanden und keine Korrelation zwischen der Apoptose und der Strahlenresistenz zeigte, stellte sich die Frage nach dem Einfluss der Seneszenz auf die inhärente Strahlenresistenz. Um Seneszenz-Induktion nach Bestrahlung mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy beurteilen zu können, wurden die Umsetzung des fluoreszierenden β -Gal-Substrats C12-FDG in allen Zelllinien gemessen und im FACS analysiert. Nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 6 und 8 Tagen wurde der Prozentsatz seneszenten Zellen, die sich im FACS durch ein hohes FITC- und SSC-Signal auszeichnen, bestimmt. Zellübergreifend zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Überraschenderweise zeigten sich die strahlenresistenten UPCI:SCC-040 als die Zelllinie mit dem höchsten Anteil seneszenten Zellen nach Bestrahlung. Diese erreichten ihr Maximum an strahlungsinduzierter Seneszenz nach Bestrahlung mit 4, 6 und 8 Gy bereits nach 4 Tagen und nach Bestrahlung mit 1 und 2 Gy nach 8 Tagen. CAL-33 wiesen ebenfalls ein hohes Maß an Seneszenz-Induktion nach Bestrahlung auf. Diese erreichten ihr Maximum an strahlungsinduzierter Seneszenz nach Bestrahlung mit 1, 2, 4 und 6 Gy bereits nach 2 Tagen, während eine Bestrahlung mit 8 Gy zu einem konstanten Anstieg der seneszenten Zellpopulation im Zeitverlauf führte. Die CAL-27-, CAL-33 und UPCI:SCC-090-Zellen reagierten nach Bestrahlung mit 8 Gy ebenso mit einem Anstieg der seneszenten Zellpopulation. UPCI:SCC-131, UPCI:SCC-154 und UD-SCC-2 reagierten nach Bestrahlung nur mit einer geringen Seneszenz-Induktion (Abb. 9A).

Anschließend wurde eine hierarchische Clusteranalyse der Daten durchgeführt und diese mittels einer Heatmap mit Dendrogramm dargestellt (Abb. 9B). Dafür wurden die Mittelwerte des Anteils seneszenten Zellen an Tag 8 nach Bestrahlung mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy einer statistischen Standardisierung unterzogen. S1 steht demnach für den standardisierten Mittelwert seneszenten Zellen an Tag 8 nach Bestrahlung mit 1 Gy. Im Unterschied zur hierarchischen Clusteranalyse der Genexpressionsniveaus (Abb. 7A) und den standardisierten Apoptosedaten (Abb. 8B) clusterten die strahlenresistenten CAL-33 anhand der standardisierten Seneszenz-Daten mit den CAL-27, UPCI:SCC-131, UPCI:SCC-099, UPCI:SCC-154 und UD-SCC-2. Die strahlenresistenten UPCI:SCC-040 bildeten ihren eigenen Cluster. Dementsprechend wies diese Gruppierung Ähnlichkeiten zur hierarchischen Clusteranalyse der klonogenen Überlebensdaten (Abb. 6B) auf, jedoch entsprach sie ihr nicht vollumfänglich.

Daraufhin wurde mit den standardisierten Mittelwerten der Seneszenz eine PCA durchgeführt und die Scores der 1. Hauptkomponente der Seneszenz-Induktion mit den Scores der 1. Hauptkomponente der klonogenen Überlebensdaten einer Korrelationsanalyse nach Pearson unterzogen (Abb. 9C und 9D). Hier ergab sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen den Seneszenz-Daten nach Bestrahlung und der Klonogenität ($R = 0,8126$; $p = 0,026$). Demnach zeigten die HNSCC-Zelllinien, die eine starke Seneszenz-Antwort nach Bestrahlung aufweisen, das beste klonogene Überleben. Da seneszente Zellen irreversibel im Zellzyklus arretiert sind und demnach nicht mehr klonogen sind, war dies zunächst ein überraschender Befund. Es ist aber bekannt, dass seneszente Zellen ein großes Repertoire an Faktoren sezernieren können, die pleiotrope Effekte auf umliegende Nachbarzellen besitzen (Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp, SASP). Die signifikante Korrelation zwischen der Seneszenz und der Strahlenresistenz lässt vermuten, dass insbesondere der Anteil seneszenter UPCI:SCC-040-Zellen solche parakrine Wirkungen besitzen könnte.

Um die Existenz parakriner SASP-Faktoren und ihren Beitrag zur Strahlenresistenz weiter aufzuklären, wurden Koloniebildungstests der strahlensensiblen CAL-27-Zelllinie mit konditioniertem Medium bestrahlter UPCI:SCC-040-Zellen ausgeführt. Als Kontrolle dienten CAL-27 Koloniebildungstests mit konditioniertem Medium unbestrahlter UPCI:SCC-040. Da der SASP sich nicht unmittelbar nach einer DNA-Schädigung entwickelt sondern vielmehr eine langsame und anhaltende Reaktion auf schwere oder irreparable Schäden von ausreichender Größe ist um die Seneszenz einzuleiten, verwendeten wir zur Herstellung der konditionierten Medien die Medien der seneszenten UPCI:SCC-040 6 Tage nach Bestrahlung mit 8 Gy. Mit der Annahme, dass der Anteil seneszenter UPCI:SCC-040 spezielle SASP-Faktoren sezerniert und diese Faktoren durch Medien übertragbar sind, sollte die Inkubation von CAL-27 mit konditioniertem Medium bestrahlter UPCI:SCC-040-Zellen zu einer besseren Klonogenität dieser Zellen führen.

Wie in Abb. 9F zu erkennen ist, zeigten CAL-27-Zellen nach Inkubation mit konditioniertem Medium bestrahlter UPCI:SCC-040 in der Tat ein signifikant besseres klonogenes Überleben nach Bestrahlung ($p = 0,0004$). UPCI:SCC-040 wiesen hingegen in konditioniertem, bestrahltem Medium keine signifikante Veränderung in der Klonogenität auf ($p = 0,148$). Wie in Abb. 9G zu erkennen ist, stellten die

CAL-27-Zellen durch Inkubation mit konditioniertem, bestrahltem Medium sogar einen höheren Strahlenresistenzindex als die UPCI:SCC-040 auf. Zudem zeigte die Kombination aus CAL-27 und konditioniertem Medium unbestrahlter UPCI:SCC-040 ebenfalls eine Erhöhung des Strahlenresistenzindex. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Anteil seneszenten UPCI:SCC-040-Zellen in der Tat spezielle Faktoren sezerniert, die einen Effekt auf nicht-seneszente, klonogene Zellen in der Umgebung haben. Zudem wiesen sich diese Faktoren und die Eigenschaften, die sie verleihen, als übertragbar aus.

Es stellte sich also die Frage, ob es mit verschiedenen Targeting-Strategien möglich ist, durch eine SASP-Blockade die Strahlenresistenz von HNSCCs zu durchbrechen. Obwohl es nach aktuellem Stand der Forschung keinen spezifischen pharmakologischen Inhibitor der Seneszenz bzw. des SASP gibt, wurde das Antidiabetikum Metformin als ein Inhibitor der Expressionen von SASP-Faktoren durch die Störung des NF- κ B Signalwegs identifiziert (Moiseeva et al. 2013). Bei NF- κ B handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Genen verstärkt, deren Produkte die maligne Progression fördern, einschließlich der Zytokine TNF- α und IL-1, der Wachstumsfaktoren EGF und HGF (Cohen et al. 2010). Demnach wurden Koloniebildungstests der strahlenresistenten und stark in Seneszenz gehenden UPCI:SCC-040 unter Dauerinkubation mit 5 mM Metformin durchgeführt. Als Kontrolle dienten Koloniebildungstests derselben Zelllinien ohne Metformin. Wie in Abb. 9G zu erkennen ist, hatte die Behandlung mit Metformin eine signifikante ($p = 0,0008$) Verschlechterung des klonogenen Überlebens der strahlenresistenten UPCI:SCC-040 zur Folge. Zudem zeigte sich ein Verlust der Schulter der Zellüberlebenskurve, was als ein Zeichen für eine verminderte Reparaturfähigkeit zu werten ist. Metformin sensibilisierte die UPCI:SCC-040-Zellen demnach signifikant gegenüber der Bestrahlung. Zudem zeigten Koloniebildungstests der CAL-27-Zellen, die mit konditioniertem Medium bestrahlter UPCI:SCC-040-Zellen generiert wurden, in Anwesenheit von Metformin, dass der strahlenresistenz-induzierende Einfluss der konditionierten Medien durch Metformin signifikant ($p = 0,0003$) unterbrochen wird. Metformin führte demnach nicht nur zum Verlust der Strahlenresistenz in den UPCI:SCC-040, sondern unterbricht zusätzlich den Strahlenresistenz-induzierenden Einfluss der übertragbaren Faktoren in den konditionierten Medien.

10 Diskussion

10.1 Die Vorteile des Strahlenresistenzindex gegenüber dem LQ-Modell

Das am häufigsten angewandte Verfahren zur Quantifizierung des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung ist das Linear-quadratische-Modell (Unkel et al. 2016). Dabei werden Überlebensfraktion der Zellen nach Bestrahlung und/oder Behandlung in logarithmischer Form gegen die applizierte Dosis gefittet, um Überlebenskurven nach der Formel $SF = e^{-(\alpha D - \beta D^2)}$ zu erhalten. α und β sind hierbei Parameter der Strahlensensibilität (Georgantzoglou et al. 2016). Der Quotient dieser Komponenten (α/β -Wert) stellt die Dosis dar, bei der beide Komponenten bei der Aufhebung des klonogenen Überlebens das gleiche Gewicht haben. Ist der α/β -Wert hoch, so ist die Schulter der Zellüberlebenskurven schwach ausgeprägt und die Reparaturfähigkeit gering (und umgekehrt) (Herrmann et al. 2006). Es gibt jedoch Szenarien, bei denen der α/β -Wert die Unterschiede zwischen Zellüberlebenskurven verschiedener Zelllinien nicht ausreichend widerspiegelt, z.B. wenn Kurven mit unterschiedlicher Kurvensteigung verglichen werden. In solchen Situationen ist die Interpretation des LQ-Modells und des α/β -Werts stark eingeschränkt (Unkel et al. 2016) (siehe Abb. 10).

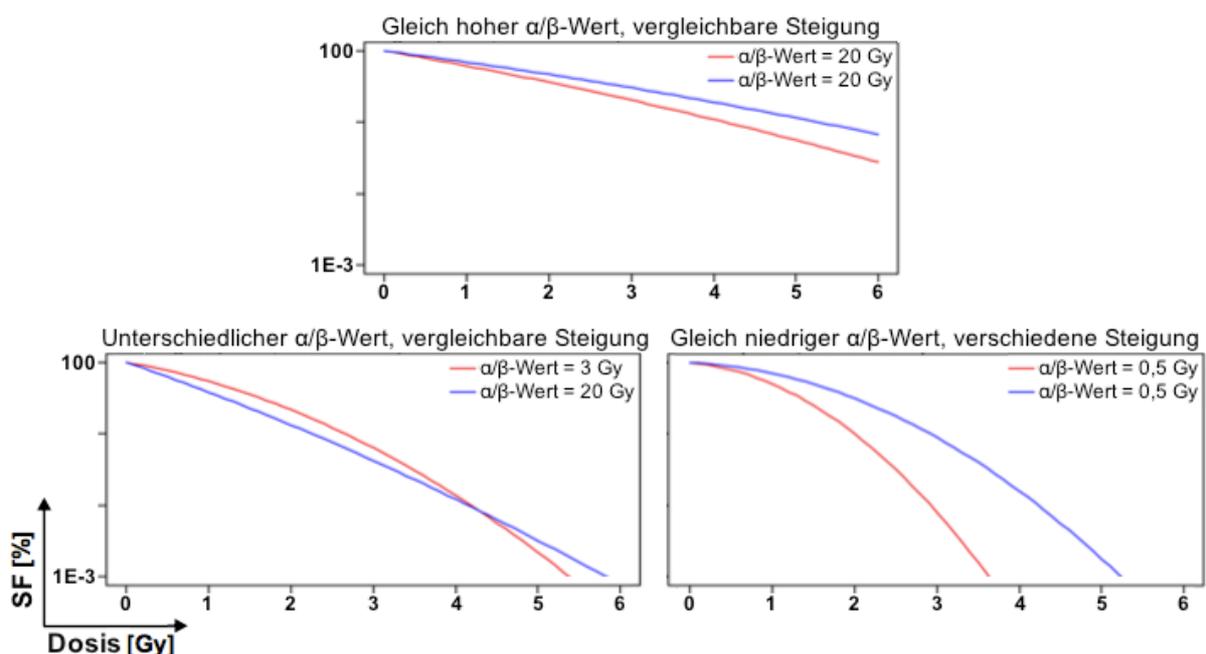


Abbildung 10: Die limitierte Aussagekraft des α/β -Werts

Das LQ-Modell und der α/β -Wert können Zellüberlebenskurven mit unterschiedlichen linearen und quadratischen Komponenten unterscheiden, spiegeln jedoch nicht die Kurvensteigung in ihrer Gesamtheit wider. Die schematischen Zellüberlebenskurven dieser Abbildung mit „gleich hohen α/β -Werten aber ähnlicher Steigungen,“ „unterschiedlichen α/β -Werten aber vergleichbarer Steigung“ und „gleich niedrigen α/β -Werten aber unterschiedlicher Steigung“ zeigen drei Szenarien, die die limitierte Aussagekraft des α/β -Werts darstellt. Modifiziert nach Unkel et al. 2016.

Der α/β -Wert scheiterte darüber hinaus in dieser Arbeit an seiner limitierten Aussagekraft. Während UPCI:SCC-131 (α/β -Wert = 12,5 Gy), UPCI:SCC-099 (α/β -Wert = 13,3 Gy) und UPCI:SCC-154 (α/β -Wert = 13,7 Gy) einen niedrigeren α/β -Wert als die nicht-malignen OKF6-Zellen (α/β -Wert = 14,5 Gy) besaßen (was traditionell dafür sprechen würde, dass die Zelllinien der UPCI:SCC-Serie strahlenresistenter sind als OKF6), wiesen die OKF6-Zellen ein besseres klonogenes Überleben nach Bestrahlung, d.h. eine Überlebenskurve mit flacherer Steigung auf. Parallel dazu zeigten CAL-33 und UD:SCC-2 beide einen α/β -Wert > 20 , obwohl die Kurvensteigung der Zellüberlebenskurven und somit die Überlebensfähigkeit der Zellen nach Bestrahlung sehr unterschiedlich sind. Zwar wird der α/β -Wert regelmäßig als Maß für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung verwendet, jedoch fehlt es ihm offensichtlich an biologischer Interpretationsfähigkeit zur Bestimmung der inhärenten Strahlenresistenz (Unkel et al. 2016).

Für die Aussagekraft von Klonogenitätstests wäre es von großem Vorteil parametrische Informationen und quantitative Werte zu besitzen, die die gesamte Steigung einer Zellüberlebenskurve widerspiegeln. Darüber hinaus wäre die Einteilung von Zellen als strahlenresistent und strahlensensibel bei der Untersuchung der zellulären Reaktionen auf Bestrahlung sowie deren zugrundeliegende Mechanismen sehr hilfreich (Unkel et al. 2016). Zu diesem Zweck haben wir neben dem traditionellen LQ-Modell zwei Methoden zur Dimensionsreduktion der klonogenen Überlebensdaten eingesetzt: die hierarchische Clusteranalyse zur Klassifizierung von strahlenresistenten und strahlensensiblen Zelllinien sowie die PCA zur Extraktion eines Strahlenresistenzindex. Anders als der α/β -Wert spiegelt der Strahlenresistenzindex den Zellüberlebenskurvenverlauf in seiner Gesamtheit wider und kann unterschiedliche Kurvensteigungen differenzieren. Im Hinblick auf CAL-33 und UD:SCC-2 zeigte der Strahlenresistenzindex, anders als der α/β -Wert, einen deutlichen Unterschied zwischen den strahlenresistenten CAL-33-Zellen (mit einem hohen Strahlenresistenzindex: 0,9060) und den strahlensensiblen UD:SCC-2-Zellen

(mit einem niedrigen Strahlenresistenzindex: 0,0874). Darüber hinaus wurde die Strahlenresistenz der OKF6-Zellen (Strahlenresistenzindex: 0,7450) gegenüber UPCI:SCC-131-Zellen (Strahlenresistenzindex: 0,2631), UPCI:SCC-099-Zellen (Strahlenresistenzindex: 0,2248) und UPCI:SCC-154-Zellen (Strahlenresistenzindex: 0,2071) sichtbar.

Zusätzlich zur besseren Differenzierung der Zelllinien anhand der Strahlenresistenz konnten wir durch Korrelation des Strahlenresistenzindex mit Daten der Genexpressionsanalyse verschiedener DNA-Schadensreparaturantwort-Regulatoren, strahleninduzierten Apoptose und strahleninduzierten Seneszenz, die Seneszenz als potentiell verantwortlichen Kandidaten für die inhärente Strahlenresistenz unserer HNSCC-Zelllinien isolieren und für eine gezielte Strahlensensibilisierung durch Metformin identifizieren. Insofern zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Kombination der hierarchischen Clusteranalyse und PCA einen vielversprechenden Ansatz zur Identifikation der Faktoren, die für die inhärente Strahlenresistenz verantwortlich sind, darstellen könnte.

10.2 Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp: die andere Seite der Seneszenz

Die Identifikation der strahlungsinduzierten Seneszenz als entscheidenden Faktor für die inhärente Strahlenresistenz durch die hierarchische Cluster- und Korrelationsanalyse war zunächst ein überraschender Befund. Schließlich sind seneszenten Zellen irreversibel im Zellzyklus arretiert. Jedoch korrelierte weder die Genexpressionsanalyse verschiedener DDR-Regulatoren noch die strahlungsinduzierte Apoptose mit der Strahlenresistenz. Ferner hatte die Inhibition der Apoptose durch z-VAD-fmk keinen Einfluss auf das klonogene Überleben der Zelllinien. Im Gegensatz dazu war eine Übertragung der Strahlenresistenz der UPCI:SCC-040 auf die strahlensensibleren CAL-27 durch Seneszenz-konditionierte Medien möglich. Von daher darf angenommen werden, dass spezielle Seneszenz-assoziierte (übertragbare) Faktoren die Strahlenresistenz der HNSCCs fördern.

In der Tat ist diese andere Seite der Seneszenz nicht unbekannt. Seneszenten Zellen

sind zwar teilungsunfähig, bleiben aber metabolisch aktiv und produzieren eine Vielzahl an Signalmolekülen, die pleiotrope Wirkungen auf umliegende Nachbarzellen besitzen und dadurch tumorfördernde Prozesse fördern können. Diese parakrine Eigenschaft seneszenten Zellen wird als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp beschrieben und betrifft insbesondere Zellen die nach Bestrahlung oder chemotherapeutischer Behandlung in Seneszenz gehen (Campisi, 2013; Coppé et al. 2008; Coppé et al. 2010; Eriksson et al. 2010; Kim et al. 2015).

Im Rahmen des SASP sezernieren seneszente Zellen eine große Anzahl an Wachstumsfaktoren, inflammatorischer Zytokine, Chemokinen und Proteasen, welche den Seneszenz-assoziierten Zellwacharrest fördern. So kann der SASP beispielsweise über die Sekretion von Amphiregulin, einem Mitglied der EGF-Familie, Zellen durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors zur Proliferation anregen. Zusätzlich ist VEGF (Vaskulärer-Endothelialer-Wachstumsfaktor), ein wichtiges Protein für die endotheliale Zellmigration, Invasion und tumorinitiierte Angiogenese, ebenfalls ein Bestandteil des SASP. Gemeinsam mit den Zytokinen IL-6 und IL-8, die in der Lage sind prä-maligne und maligne Epithelzellen zu stimulieren die Basalmembran zu durchwandern, können diese Faktoren zur Entstehung und zur Progression von Tumoren beitragen (Coppé et al. 2008; Coppé et al. 2010; Ruiz de Galarreta et al. 2017; Kim et al. 2015; Rodier et al. 2011).

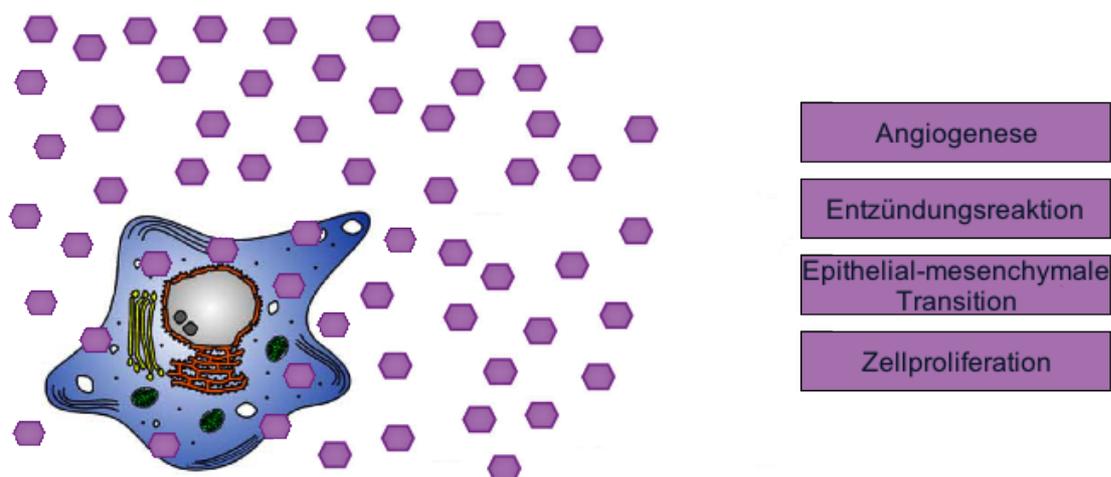


Abbildung 11: Die verschiedenen Auswirkungen des SASP

Die unterschiedlichen Faktoren die den SASP ausmachen, besitzen zahlreiche biologische Funktionen, die alle stark vom physiologischen Kontext abhängig sind. Zu diesen Funktionen gehören die Stimulation der Angiogenese, die Entwicklung chronischer Entzündungen, die Stimulation der epithelialen-mesenchymalen Transition sowie die Stimulation und Inhibition der Zellproliferation

(Campisi, 2013). Die Sechsecke repräsentieren die SASP-Faktoren, die innerhalb sowie außerhalb der seneszenten Zelle wirken. Modifiziert nach Campisi, 2013.

Während bereits eine Reihe an SASP-Faktoren identifiziert wurden, sind die genauen regulatorischen Mechanismen, welche die Produktion des SASP kontrollieren, weniger bekannt. Aktuelle Studien haben jedoch gezeigt, dass der SASP über eine cGAS-STING Signalkaskade reguliert wird. Hierbei erkennt cGAS (GMP-AMP-Synthase) Chromatinfragmente im Zytosol seneszenten Zellen und löst wiederum die Produktion von STING (*Stimulator of interferon genes*) aus. Die Aktivierung von cGAS-STING führt anschließend zu zwei Signalwegen über welche die Transkription und dadurch die Expression von Zielgenen, die für die Sekretion verschiedener SASP-Faktoren verantwortlich sind, kontrolliert werden: 1) IFN (Typ-I-Interferon) durch IRF3 (Interferon-Regulator-Faktor-3) und 2) NF- κ B. Die Schlüsselrolle bei der Regulation des SASP nimmt dabei NF- κ B ein (Chien et al. 2011; de Galarreta et al. 2017; Dou et al. 2017; Glück et al. 2017; Moiseeva et al. 2013; Salminen et al. 2012; Yu et al. 2015).

10.3 Metformin: ein vielversprechender Ansatz für die multimodale HNSCC-Strahlentherapie

Durch die Erkenntnisse über die tumorfördernden Einflüsse des SASP identifizierte sich die Blockade der SASP-Signalkaskade als eine neue und attraktive Therapiemöglichkeit bei Tumoren (Childs et al. 2015; Coppé et al. 2010).

Der NF- κ B-Signalweg ist an mehreren kritischen Reaktionen des Immunsystems beteiligt; von der Entwicklung von Immunzellen bis hin zur reibungslosen Funktion der angeborenen und adaptiven Immunität. Die Rolle in der Tumorbilogie ist allerdings weniger gut definiert und manchmal paradox (Chien et al. 2011). Nichtsdestotrotz wird NF- κ B die Rolle des Schlüsselregulators der SASP-Induktion zugeschrieben (Chien et al. 2011; Salminen et al. 2012). In der Tat wurde bereits gezeigt, dass NF- κ B in Mutations- und HPV-assoziierten HNSCCs exprimiert wird und dort als entscheidender Modulator des Genexpressionsprogramms, das mit der Erhaltung des malignen Phänotyps, der Invasivität und der Metastasierung assoziiert ist, fungiert (Boscolo-Rizzo et al. 2016; Chen et al. 2008).

In seiner inaktiven Form ist NF- κ B an den zytoplasmatischen Inhibitor I κ B (Inhibitor des kappaB) gebunden. Daher ist das Schlüsselereignis zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges die Phosphorylierung des I κ B durch die I κ B-Kinase, einem Komplex aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK α und IKK β) und einer regulatorischen Untereinheit (IKK γ). Nach aktuellem Stand der Forschung gibt es keinen spezifischen Inhibitor des SASP. Allerdings konnten Moiseeva et al. in ihrer Arbeit zeigen, dass das als Antidiabetikum zugelassene Medikament Metformin die Produktion multipler inflammatorischer Zytokine in seneszenten Zellen vermindert, indem es die Translokation von NF- κ B in den Zellkern verhindert und die Phosphorylierung von I κ B und IKK α /IKK β hemmt. Diese Ereignisse sind für die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs erforderlich (Moiseeva et al. 2013).

Tatsächlich konnten wir beobachten, dass die Behandlung der Zellen mit Metformin eine signifikante Radiosensibilisierung zur Folge hat. Die Zellüberlebenskurve der UPCI:SCC-040-Zellen zeigte nach Behandlung mit Metformin einen deutlichen Verlust der Schulter im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle, was als ein Zeichen für eine verminderte Reparaturfähigkeit gewertet werden kann. Außerdem zeigte sich, dass Metformin die Strahlenresistenz-induzierenden Effekte der Seneszenz-konditionierten Medien aufhebt. Dies kann als der Anhaltspunkt angesehen werden, dass Metformin die Konzentration der SASP-Faktoren verringert.

Somit bestätigen diese Ergebnisse die Hypothese, dass Metformin die Seneszenz-assoziierte Strahlenresistenz beeinflussen kann und als ein potentieller Kandidat für eine gezielte Strahlensensibilisierung von HNSCCs weiter untersucht werden sollte.

10.4 Offene Fragen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Seneszenz bzw. der parakrine SASP als ein entscheidender Faktor für die inhärente Strahlenresistenz der hier untersuchten HNSCC-Zelllinien identifiziert. Welche genauen SASP-Faktoren maßgeblich für die Strahlenresistenz verantwortlich sind, bleibt derzeit jedoch noch unbeantwortet. Daher ist es notwendig weitere Faktoren des SASP zu untersuchen, um zusätzliche Strategien zur SASP-Blockade für zukünftige in-vivo-Experimente und möglicherweise

für die Translation in die klinische HNSCC-Therapie zu entwickeln. Außerdem sollten die detaillierten Mechanismen und Signalmechanismen der Wirkung von Metformin im Rahmen der Strahlensensibilisierung durch SASP-Blockade weiter untersucht werden. Zwar wurde ein Mechanismus über den NF- κ B-Signalweg vorgeschlagen, jedoch wurde dieser nicht weitergehend charakterisiert. Andere Studien haben beispielsweise Signalwege des SASP identifiziert, deren Blockade zu einer verminderten Expression spezieller SASP-Faktoren führt (z.B. die Inhibition des SASP-Regulators MTOR (*Mechanistic target of rapamycin*) durch Rapamycin) (Laberge et al. 2015).

11 Zusammenfassung

Trotz deutlicher medizinischer Fortschritte gibt es einen großen Optimierungsbedarf in der Therapie von HNSCCs, um das Überleben von Patienten zu verbessern bzw. verlängern. Ein zentraler Punkt in dieser Hinsicht ist die Überwindung der relativen Resistenz gegenüber Strahlen- und/oder Chemotherapie. Daher wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Signalwege untersucht, die für die inhärente Strahlenresistenz von HNSCCs von zentraler Bedeutung sein könnten und als Zielstrukturen für spezielle Targeting-Strategien in Frage kommen.

Dafür wurde die Strahlenresistenz verschiedener HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu nicht-malignen, immortalisierten Mundschleimhaut-Keratinocyten (OKF6) untersucht. Klonogenitätsassays haben gezeigt, dass mehrere HNSCC-Zelllinien ein besseres klonogenes Überleben nach Bestrahlung als OKF6-Zellen aufweisen. Hierarchisches Clustering der klonogenen Überlebensdaten identifizierte zwei Gruppen von HNSCC Zellen: eine relativ zu OKF6 strahlenresistente Gruppe und eine relativ zu OKF6 strahlensensible Gruppe. Ein Strahlenresistenzindex wurde über Hauptkomponentenanalyse der klonogenen Überlebensdaten ermittelt. Anschließend wurde versucht, prädiktive Marker für die Strahlenresistenz der HNSCC-Zellen zu identifizieren. Ein qRT-PCR Profiling der DNA-Schadensreparaturantwort-Regulatoren wurde durchgeführt und die zelluläre Antwort auf Bestrahlung wurde mit Hilfe von Apoptose- und Seneszenz-Assays charakterisiert. Die erhaltenen Daten wurden hierarchischen Cluster-, Hauptkomponenten- und Korrelationsanalysen unterzogen. Hierbei ergab sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen der strahleninduzierten Seneszenz und der Klonogenität. Demnach zeigten die HNSCC-Zellen, die eine starke Seneszenz-Antwort nach Bestrahlung aufwiesen, das beste klonogene Überleben. Da seneszente Zellen irreversibel im Zellzyklus arretiert sind und demzufolge nicht mehr klonogen sind, war dies zunächst ein überraschender Befund. Es ist aber bekannt, dass seneszente Zellen metabolisch aktiv bleiben und ein großes Repertoire an Faktoren sezernieren, die pleiotrope Effekte auf umliegende Nachbarzellen besitzen. Diese Eigenschaft der Seneszenz, wird als Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp beschrieben. Zu den bekannten Signalmolekülen des SASP gehören beispielsweise inflammatorische Zytokine, wie IL-6 und IL-8, und

Angiogenese-Regulatoren, wie VEGF, die Proliferation, Invasivität und Angiogenese benachbarter Zellen maßgeblich beeinflussen. Es stellte sich folglich die Frage, ob die Strahlenresistenz-induzierenden Effekte der SASP-Faktoren auf strahlensensiblere Zellen übertragbar sind und ob es mit speziellen Targeting-Strategien möglich ist, durch eine SASP-Blockade die Strahlenresistenz zu durchbrechen. Dafür haben wir den Einfluss von konditionierten Medien strahlenresistenter Zelllinien auf die Klonogenität strahlensensibler Zelllinien untersucht. Klonogenitätsassays haben gezeigt, dass strahlensensible Zelllinien durch diese konditionierten Medien in der Tat ein signifikant besseres klonogenes Überleben und einen erhöhten Strahlenresistenzindex aufwiesen. Anschließend wurde der Einfluss des Antidiabetikums Metformin, einem Inhibitor der Expressionen verschiedener SASP-Faktoren durch Störung des NF- κ B-Signalwegs, auf die Strahlenresistenz der HNSCC-Zellen untersucht. Die Behandlung mit Metformin führte nicht nur zum Verlust der Strahlenresistenz in den strahlenresistenten Zelllinien, zusätzlich verhinderte Metformin den Strahlenresistenz-induzierenden Einfluss der konditionierten Medien. Dies wurde als ein Anhaltspunkt dafür angesehen, dass Metformin die Konzentration bestimmter entscheidender SASP-Faktoren verringert.

Zusammenfassend zeigten sich die PCA-basierten Strahlenresistenzindizes als hilfreiche quantitative Messwerte, die mit anderen Datenqualitäten korreliert werden konnten, um Regulatoren der Strahlenresistenz zu finden. Auf diese Weise konnten die strahlungsinduzierte Seneszenz und der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp als wichtige Determinanten der Strahlenresistenz identifiziert werden. Dessen Blockade durch Metformin in Kombination mit einer Bestrahlung scheint einen aussichtsreichen Therapieansatz für HNSCCs darzustellen.

12 Literaturverzeichnis

- Afshar G, Jelluma N, Yang X, Basila D, Arvold ND, Karlsson A, Yount GL, Dansen TB, Koller E, Haas-Kogan DA. Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells. *Cancer Research*. 2006; 66(8): 4223–4232.
- Banda M, Bommineni A, Thomas RA, Luckinbill LS, Tucker JD. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutation Research*. 2008; 649(1–2): 126–134.
- Barnes B, Bertz J, Buttmann-Schweiger N, Fiebig J, Jordan S, Kraywinkel K, Niemann H, Nowossadeck E, Poethko-Müller C, Prütz F et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. 2016; ISBN-13: 978-3896062796.
- Bartkowiak D, Högner S, Nothdurft W, Röttinger EM. Cell cycle and growth response of CHO cells to X-irradiation: threshold-free repair at low doses. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 2001; 1;50(1): 221–227.
- Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11(4): 239–253.
- Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth BM, Wolf U. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. 2010; ISBN-13: 978-3896062086.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 354: 567–578.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The Lancet Oncology*. 2010; 11: 21–28.
- Boscolo-Rizzo P, Da Mosto MC, Rampazzo E, Giunco S, Del Mistro A, Menegaldo A, Baboci L, Mantovani M, Tirelli G, De Rossi A. Telomeres and telomerase in head and neck squamous cell carcinoma: from pathogenesis to clinical implications. *Cancer Metastasis Reviews*. 2016; 35(3): 457–474.
- Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cell Biology*. 2001; 11(11): 27–31.
- Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3: 339–349.
- Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005; 120(4): 513–522.
- Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual Review of Physiology*. 2013; 75: 685–705.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004; 23(16): 2825–2837.
- Chen Z, Yan B, van Waes C. The Role of the NF-kappaB Transcriptome and Proteome as Biomarkers in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Biomarkers in Medicine*. 2008; 2(4): 409–426.
- Chen WS, Yu YC, Lee YJ, Chen JH, Hsu HY, Chiu SJ. Depletion of securin induces senescence after

- irradiation and enhances radiosensitivity in human cancer cells regardless of functional p53 expression. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 2010; 77(2): 566–574.
- Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, Premssirut P, Luo W, Chicas A, Lee CS et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & Development*. 2011; 25(20): 2125–2136.
- Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*. 2014; 15(11): 1139–1153.
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*. 2015; 21(12): 1424–1435.
- Cohen J, Chen Z, Lu SL, Yang XP, Arun P, Ehsanian R, Brown MS, Lu H, Yan B, Diallo O et al. Attenuated transforming growth factor beta signaling promotes nuclear factor-kappaB activation in head and neck cancer. *Cancer Research*. 2009; 69(8): 3415–3424.
- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLOS Biology*. 2008; 6(12): 2853–2868.
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010; 5: 99–118.
- Coppé JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, Campisi J. Tumorsuppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(42): 36396–36403.
- De Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*. 1995; 76(4): 1057–1062.
- Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*. 2009; 4(12): 1798–1806.
- Delacroix S, Wagner JM, Kobayashi M, Yamamoto K, Karnitz LM. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes & Development*. 2007; 21(12): 1472–1477.
- Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP, Rheinwald JG. Human Keratinocytes That Express hTERT and Also Bypass a p16INK4a-Enforced Mechanism That Limits Life Span Become Immortal yet Retain Normal Growth and Differentiation Characteristics. *Molecular and Cellular Biology*. 2000; 20(4): 1436–1447.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(20): 9363–9367.
- Dou Z, Ghosh K, Vizioli MG, Zhu J, Sen P, Wangenstein KJ, Simithy J, Lan Y, Lin Y, Zhou Z et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*. 2017; 550(7676): 402–406
- Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biology*. 2010; 31: 363–372.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*. 2006; 1(5): 2315–2319.
- Georgantzoglou A, Merchant MJ, Jeynes JCG, Mayhead N, Punia N, Butler RE, Jena R. Applications

- of High-Throughput Clonogenic Survival Assays in High-LET Particle Microbeams. *Frontiers in Oncology*. 2016; 5: 305.
- Glück S, Guey B, Gulen MF, Wolter K, Kang TW, Schmacke NA, Bridgeman A, Rehwinkel J, Zender L, Ablasser A. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nature Cell Biology*. 2017; 19(9): 1061–1070.
- Gollin SM, Parikh RA, Huang X. Genetic changes in ATM and ATR/CHEK1 as prognostic indicators in cancer. United States Patent 2012/0220654 A1. 2012; August 30.
- Herrmann T, Baumann M, Dörr W. *Klinische Strahlenbiologie: Kurz und Bündig*. Elsevier GmbH. 2006; ISBN-13: 978-3437239601.
- Inoue Y, Kitagawa M, Taya Y. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *The EMBO Journal*. 2007; 26(8): 2083–2093.
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*. 2004; 5(1): 1–10.
- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461(7267): 1071–1078.
- Joiner MC, van der Kogel A. *Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition*. CRC Press. 2009; ISBN-13: 978-0340929667.
- Jolliffe IT, Morgan BJ. Principal component analysis and exploratory factor analysis. *Statistical Methods in Medical Research*. 1992; 1(1): 69–95.
- Kim BM, Hong Y, Lee S, Liu P, Lim JH, Lee YH, Lee TH, Chang KT, Hong Y. Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(11): 26880–26913.
- Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Campisi J et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*. 2015; 17(8): 1049–1061.
- Lauber K, Ernst A, Orth M, Herrmann M, Belka C. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Frontiers in Oncology*. 2012; 2: 116.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11(1): 9–22.
- Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, Bourdeau V, Pollak MN, Ferbeyre G. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*. 2013; 12(3): 489–498.
- Morgan MA, Lawrence TS. Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways. *Clinical Cancer Research*. 2015; 21(13): 2898–2904.
- Müller S. *Methoden zur Erfassung epistemologischer Überzeugungen von Handelslehramtsstudierenden: eine empirische Vergleichsstudie*. Rainer Hampp Verlag. 2009; ISBN-13: 978-3866183452.
- Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11(7): 503–511.
- Newshean S, Yang ES. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Experimental Oncology*. 2012; 34(3): 243–254.
- Pannone G, Santoro A, Papagerakis S, Lo Muzio L, De Rosa G, Bufo P. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview.

- Infectious Agents and Cancer. 2011; 6:4.
- Perri F, Pacelli R, Della Vittoria Scarpati G, Cella L, Giuliano M, Caponigro F, Pepe S. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: biological bases and therapeutic implications. *Head & Neck*. 2015; 37(5): 763–770.
- Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1956; 103: 653–666.
- Riaz N, Morris LG, Lee W, Chan TA. Unraveling the molecular genetics of head and neck cancer through genome-wide approaches. *Genes & Diseases*. 2014; 1: 75–86.
- Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*. 2006; 1(3): 1458–1461.
- Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*. 2011; 192(4): 547–556.
- Ruiz de Galarreta M, Lujambio A. DNA sensing in senescence. *Nature Cell Biology*. 2017;19(9): 1008–1009
- Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*. 2012; 24(4): 835–845.
- Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The chemoradiation paradigm in head and neck cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2007; 4(3): 156–171.
- Semczuk A, Jakowicki JA. Alterations of pRb1-cyclin D1-cdk4/6-p16(INK4A) pathway in endometrial carcinogenesis. *Cancer Letters*. 2004; 203(1): 1–12.
- Silva P, Homer JJ, Slevin NJ, Musgrove BT, Sloan P, Price P, West CML. Clinical and biological factors affecting response to radiotherapy in patients with head and neck cancer: a review. *Clinical Otolaryngology*. 2007; 32(5): 337–345.
- Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization. 2014; ISBN-13 978-9283204435.
- Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in Cancer Research*. 2010; 108: 73–112.
- Sulli G, Di Micco R, d'Adda di Fagagna F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12(10): 709–720.
- Telmer CA, An J, Malehorn DE, Zeng X, Gollin SM, Ishwad CS, Jarvik JW. Detection and assignment of TP53 mutations in tumor DNA using peptide mass signature genotyping. *Human Mutation*. 2003; 22(2): 158–165.
- Thompson, CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203): 1456–1462.
- Unkel S, Belka C, Lauber K. On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to the linear-quadratic model. *Radiation Oncology*. 2016; 11: 11.
- Wakatsuki M, Ohno T, Iwakawa M, Ishikawa H, Noda S, Ohta T, Kato S, Tsujii H, Imai T, Nakano T. p73 protein expression correlates with radiation-induced apoptosis in the lack of p53 response to radiation therapy for cervical cancer *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 2008; 70: 1189–1194.
- Weichselbaum RR, Beckett MA, Schwartz JL, Dritschilo A. Radioresistant tumor cells are present in head and neck carcinomas that recur after radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 1988; 15(3): 575–579.

- Westra WH, Lewis JS Jr. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head and Neck Pathology*. 2017; 11(1): 41–47.
- Williams GC. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution*. 1957; 11: 398–411.
- Yu Q, Katlinskaya YV, Carbone CJ, Zhao B, Katlinski KV, Zheng H, Guha M, Li N, Chen Q, Yang T, Lengner CJ, Greenberg RA, Johnson FB, Fuchs SY. DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function. *Cell Reports*. 2015; 11(5): 785–797.

13 Eidesstattliche Erklärung: Seyd Shnayien

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Inhärente zelluläre Strahlenresistenz von
Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen:
Strahleninduzierte zelluläre Seneszenz als entscheidender
Faktor**

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

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

Berlin, 12.01.2019

Ort, Datum

Seyd Shnayien

14 Danksagung

Zu allererst möchte ich einen herzlichen Dank an meine Doktormutter Frau Professor Kirsten Lauber richten, deren Einsatz ich den Abschluss dieser Arbeit zu verdanken habe. Für die stetige Unterstützung, die ausführliche Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die fundierten Ratschläge während des Forschungsprozesses bin ich sehr dankbar.

Zudem möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Linda Kinzel sowie auch den übrigen Labormitgliedern danken. Insbesondere möchte ich dabei Ulrike, Michael, Roman, Jennifer, Viola, Anne, Karin und Nikko sowohl für ihre geduldige Einweisung in diverse Methoden als auch für ihren steten Rat und Tat in vielen weiteren Belangen danken. Darüber hinaus möchte ich Herrn Dr. Steffen Unkel für seine große Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Herrn Professor Claus Belka, Leiter der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Klinikums der Universität München, danke ich für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu promovieren.

Für die ideelle Förderung und materielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin des Förderprogramms für Forschung und Lehre unter der Leitung von Herrn Professor Jürgen Heesemann bin ich sehr dankbar.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine Freunde, sowohl aus Bonn als auch München, für die vielen schönen Momente und die offenen Ohren in schwierigen Zeiten. Des Weiterem gilt ein besonderer Dank Herrn Dr. Nick Lasse Beetz. Die motivierenden Gespräche, der konstruktive fachliche Austausch und das Korrekturlesen waren für mich sehr hilfreich.

Mein letzter Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Großmutter für die stetige Unterstützung im Studium und die geduldige Anteilnahme ohne die ich diese Arbeit nicht hätte schreiben können. Meinem Großvater Herrn Dr. Malik Shnayien danke ich für die Inspiration mich auf dem Weg der Promotion zu begeben.

15 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.

