

**Aus dem Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dennis Nowak
und dem
Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München
Institutsleiter: Prof. Dr. Matthias Port**

**Die Bedeutung des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K hinsichtlich
der Radiosensitivität von Plattenepithelkarzinomzelllinien des Mund- und
Rachenraumes in Abhängigkeit vom HPV-Status**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Justus Carl Paul Kähler

aus Flensburg

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dennis Nowak

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Philipp Baumeister
Prof. Dr. Hjalmar Hagedorn
Prof. Dr. Dipl.-Phys. Maximilian Niyazi

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Stefan Eder

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologischer Hintergrund humaner HNSCC	1
1.2. Die Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) – Risikofaktor für die Entstehung oropharyngealer Karzinome	1
1.3. Definition der (heterogenen nukleären) Ribonukleoproteine	2
1.4. Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K	2
1.5. Das heterogene Ribonukleoprotein K und seine kanzerogene Wirkung	4
1.6. Wirkung des Tumorsuppressorgens p53 und dessen Rolle in der Kanzerogenese	5
1.7. Das Protein 53 und seine Interaktionen mit hnRNP K	7
1.8. Die zelluläre Antwort auf ionisierende Strahlung	8
1.9. Ablauf des programmierten Zelltodes	10
1.10. Grundlage und Zielsetzung dieser Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1. <i>Material</i>	13
2.1.1. Puffer und Chemikalien	13
2.1.1.1. Zellbiologische und Molekularbiologische Verfahren	13
2.1.1.2. Proteinbiochemische Methodiken	14
2.1.2. Antikörper	17
2.1.3. Zelllinien	19
2.1.4. Verbrauchsmaterial	21
2.1.5. Geräte	22
2.1.6. Datenverarbeitungsprogramme	24
2.2. <i>Methoden</i>	25
2.2.1. Subkultivierung der Zellkultur und Anlage eines Versuchsansatzes	25
2.2.2. Bestrahlung der Zellkulturen	28
2.2.3. Klonierungstest – Adhäsionszellen	28
2.2.4. Herstellung eines Proteinlysats	30

Inhaltsverzeichnis

2.2.5.	Messung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure	31
2.2.6.	Western Blot	32
2.2.7.	Immunfluoreszenzfärbung	35
2.2.8.	Durchflusszytometrie (Flow Cytometry, FACS)	37
2.2.9.	Knock-Down – siRNA Transfektion	38
2.2.10.	Bio-Plex Multiplex - Apoptose Immuno-Assay	39
2.2.11.	Statistische Datenanalyse	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Immunfluoreszenzgekoppelte HPV Verifikation von UPCI-SCC-154	41
3.2.	HPV-positive HNSCC-Zelllinien zeigen erhöhte Strahlensensitivität	42
3.3.	Expressionszunahme von hnRNP K in HNSCC-Zelllinien nach Bestrahlung	44
3.4.	hnRNP K Expressionszunahme und zytoplasmatischer Verschiebung	46
3.5.	Verifikation des transienten Knock-Down in HNSCC-Zelllinien	47
3.6.	hnRNP K Knock-Down führt zu Terminierung der Klonierungsfähigkeit	48
3.7.	hnRNP K-Knock-Down ohne Einfluss auf Zellzyklusprogression	50
3.8.	hnRNP K-Knock-Down induziert Apoptose	54
4.	Diskussion	56
	Literaturverzeichnis	62
	Danksagung	68
	Affidavit	69
	Curriculum Vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Veröffentlichungen und Eigenanteil	70

Zusammenfassung

Radiotherapie stellt in Plattenepithelkarzinomen des Mund- und Rachenraumes (HNSCC) eine wichtige Therapieoption dar, deren therapeutischer Erfolg von der Strahlensensitivität der Tumorzellen abhängt. Klinische Studien konnten in HPV-induzierten HNSCC im Vergleich zu klassischen Tabak- und Alkohol-induzierten HNSCC neben einer erhöhten Strahlensensitivität und einer verbesserten Prognose auch ein schlechteres Outcome bei männlichen Patienten demonstrieren. Eine Mehrexpression des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K (hnRNP K) wurde zuvor in kolorektalen Karzinomen sowie malignen Melanomen mit erhöhter Strahlenresistenz in Verbindung gebracht. Diese Studie nimmt die Verknüpfung dieser Beobachtungen in den Fokus und untersucht den Einfluss der hnRNP K-Expression auf die Strahlensensitivität von HNSCC unter Berücksichtigung des HPV-Status. Dabei unterstreicht diese Studie die zentrale Rolle des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K in der zellulären Strahlenantwort und Homöostase von Plattenepithelkarzinomen des Mund- und Rachenraumes, wobei Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie und Multiplex-ELISA eine anti-apoptische sowie prokanzerogene Rolle von hnRNP K demonstrieren. Dabei zeigt sich der radioprotektive Effekt von hnRNP K unabhängig vom HNSCC HPV-Status. Auf molekularbiologischer Ebene imponiert eine Mehrexpression sowie zytoplasmatische Umverteilung von hnRNP K nach Exposition mit ionisierender Strahlung in Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie, welche sich ebenfalls nicht durch den HPV-Status beeinflusst zeigen.

Abstract (English) – International Journal of Molecular Medicine

Radiotherapy is a major treatment option for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). However, the success of radiotherapy is limited by tumor cell resistance to ionizing radiation (IR). Clinical studies have demonstrated an overall improved prognosis and higher susceptibility to radiotherapy of high-risk human papillomavirus (HPV)-associated HNSCC compared with classic HNSCC, as well as worse overall survival for male HNSCC patients.

Overexpression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K has been previously associated with resistance to radiotherapy in melanoma and colorectal carcinoma. The present study aimed to analyze the impact of hnRNP K expression on the aggressiveness and radioresistance of HNSCC concerning the HPV status. In which FACS and Multiplex-ELISA results indicate a tumorigenic and anti-apoptotic role of hnRNP K, underlining the critical role of hnRNP K in the cellular response to radiation induced DNA damage and homeostasis in head and neck squamous cell carcinoma. However, the radioprotective effects of hnRNP K were found to be independent of the tumor's HPV status.

On a molecular level Western blot and immunofluorescence microscopy demonstrate increased expression and cytoplasmic redistribution of hnRNP K after exposure to ionizing radiation. This effect appears not to be influenced by the HPV status of HNSCC cells.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung von hnRNP K in der Kanzerogenese	6
Abbildung 2 IR-abhängige Regulation von p53 und hnRNP K.	8
Abbildung 3 Darstellung der Apoptose-Kaskade.....	11
Abbildung 4 Zellkultur: Cal-27 1 (HPV negativ).....	20
Abbildung 5 Zellkultur: UPCI-SSC-154 (HPV positiv).	20
Abbildung 6 HPV (p16INK4A) Immunfluoreszenzfärbung in HNSCC	42
Abbildung 7 Klonierungstest der HNSCC Zellen (Cal-27, UPCI-SCC-154).	43
Abbildung 8 Immunoblot-Darstellung: Zeit- und Dosisabhängig.....	44
Abbildung 9 Auswertung des zeitabhängigen Immunoblots.....	45
Abbildung 10 Immunfluoreszenzmikroskopie (HNSCC).....	47
Abbildung 11 Western Blot Verifikation des hnRNP K Knock-Down (RNAi)	48
Abbildung 12 Klonierungstest nach Bestrahlung und hnRNP K Knock-Down	49
Abbildung 13 Klonierungstest der HNSCC Zelllinien, Knock-Down vs. Mock.	49
Abbildung 14 FACS Zellzyklusanalyse HNSCC Mock und RNAi sowie IR +/-.....	50
Abbildung 15 FACS Auswertung der G1-Phase in HNSCC	51
Abbildung 16 FACS Auswertung der S-Phase in HNSCC	52
Abbildung 17 FACS Auswertung der G2-Phase in HNSCC.	53
Abbildung 18 ELISA-Apoptose Assay (Active-Caspse-3) HNSCC.....	55

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
AK	Antikörper
Aqua Dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ASS	Aminosäuresequenz
ATCC	American Type Culture Collection / Zellbank
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated (Serin-Kinase)
BD	Base-Damage / Basenschäden
BER	Base excision repair / Basen-Exzisions-Reparatur
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAM	Chorion Allantois Membran
Da	Dalton
DAPI	Diamidin-2-Phenylindol
DDR	DNA Damage Repair / DNA Schadensreparatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Acid)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSB	Double Strand Breaks / Doppel Strang Brüche
DSMZ-Leibniz-Institut	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBV	Eppstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FADD	FAS associated Death Domain
FBS	Fetal Bovine Serum (entspricht FCS)
FCS	Fetal Calf Serum (entspricht FBS)
FCS	Flow Cytometry Standard / Vorwärtsstreuung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GGR	Global Genome Repair / Globale Genomreparatur
Gy	Gray
H2A	Histon Protein 2 A
HCC	Hepato-Cellular-Carcinoma (Hepatozelluläres Karzinom)
HDM2	Human double minute 2 homolog
hnRNP	Heterogenes Nukleäres Ribonukleoprotein
hnRNP K	Heterogenes Nukleäres Ribonukleoprotein K
HNSCC	Head- and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRHPV	High Risk Humanes Papilloma Virus
HRP	Horseradish Peroxidase
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunohistochemistry / Immunhistochemie
Inh	Inhibitor
IR	Ionizing Radiation, Ionisierende Strahlung
kDa	Kilo Dalton
Ki-67	Kiel Antigen Nr. 67 / Marker des Proliferationsindex
KNS	Nuclear Shuttling Domain
kV	Kilo Volt
LRHPV	Low Risk Humanes Papilloma Virus
mA	Milli Ampere
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeability
MRC-5	Medical Research Council cell strain 5
mRNA	Produkt nach Splicing ohne Introns
ncRNA	Non-Coding Ribonukleinsäure (Acid)
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NLS	Nuclear-Localisation-Sequence
OSCC	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma

PBS	Phosphate-Buffer-Saline
PBST	Phosphate Buffer Saline with Tween 20
PCR	Polymerase-Chain-Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
p16INK4a	Zyklin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A
pre-mRNA	Direktes DNA-Transkript mit Introns und Exons
PBST	Phosphate Buffered Saline/Tween
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RB	Retinoblastomprotein – Tumorsuppressorprotein
RNA	Ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	Reaktive Sauerstoff (O) Spezies
SG	Stress Granules /Stress Granula
siRNA	Small Interfering RNA
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
snRNP	Small Nuclear Ribonucleoprotein (pre-mRNA splicendes RNP)
SOP	Standard Operating Procedure
SSB	Single-Strand-Break, Einzelstrangbrüche
SSC	Seitwärtsstreuung
SCC	(Squamous Cell Carcinoma) Plattenepithelkarzinom
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur
TF	Transkriptionsfaktor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substrat der HRP
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UICC	Union for International Cancer Control
UV	Ultraviolett Strahlung
VD	Verdopplungsdauer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die Bedeutung des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K (hnRNP K) für die Radiosensitivität von Plattenepithelkarzinomzelllinien des Mund- und Rachenraumes in Abhängigkeit vom HPV-Status

1.1. Epidemiologischer Hintergrund humaner HNSCC

Plattenepithelzellkarzinome des Kopf- und Halsbereichs, international und auch im Folgenden HNSCC genannt (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), sind maligne Tumore des oberen Respirationstraktes, welche 4% der neuen Krebsdiagnosen und 2% der durch Malignome verursachten Tode in Europa ausmachen. Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten liegt in der 6. Lebensdekade und betrifft vermehrt das männliche Geschlecht (ca. 3:1) [2-4]. Unter anderem aufgrund dieser besonderen Lokalisation erfordert diese Tumorentität eine multidisziplinäre Herangehensweise mit dem Ziel, neben der Kuration des Krebsleidens auch den Erhalt von Organfunktion und Lebensqualität sicherzustellen. Historisch lagen HNSCC vornehmlich Rauchen und Alkoholabusus zugrunde. In Studien konnte gezeigt werden, dass aktuell bei mehr als 70% der Diagnosen eine Infektion mit humanen Papillomaviren nachgewiesen werden kann, wohingegen Rauchen und Alkohol ätiologisch in den Hintergrund treten [5-7]. Besonders betroffen sind Männer zwischen 20 und 45 Jahren, mit Prädilektionsstellen an Zunge, Zungengrund oder Tonsillen. Als Risikofaktoren zeichnen sich hierbei das Sexualverhalten der Patienten mit häufigem Partnerwechsel, oralen Sexualpraktiken sowie gleichgeschlechtlicher Sexualverkehr ab. Die klinisch primär aggressiveren HPV-positiven Karzinome zeigen unter leitliniengerechter Therapie eine deutlich verbesserte Prognose gegenüber HPV-negativen Karzinomen mit einer 5 Jahres-Überlebensrate von 70% gegenüber 20% [4, 8].

1.2. Die Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) – Risikofaktor für die Entstehung oropharyngealer Karzinome

Humane Papillomaviren werden in fünf Klassen eingeteilt: Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-HPV. Von den Genannten ist jedoch nur HPV aus dem Genus Alpha in der Lage, neben kutanen Infektionen auch die Mukosa zu infizieren [9, 10]. In der Alpha-Gruppe werden anhand des kanzerogenen Potentials low risk- (LR) und high risk- (HR) Typen unterschieden: LR-HPV induzieren meist benigne Läsionen (beispielsweise Condylomata acuminata), wohingegen die HR-HPV mit malignen Prozessen assoziiert

sind. 80% der HPV-assoziierten Krebsleiden werden mit den HR-Typen HPV-16 und HPV-18 in Verbindung gebracht, wobei die Durchseuchung der Bevölkerung bei ca. 80% liegt. In HNSCC ist HPV-16 der dominierend vorliegende HPV-Typus [11]. Humane Papillomaviren gehören zu der Gruppe der DNA-Viren, in deren Genom acht Gene kodiert sind. Zwei dieser Gene (E6 und E7) werden als Onkogene auf die infizierte Zelle übertragen und induzieren eine maligne Entartung über translatierte Onkoproteine. Diese wirken als Mediatoren des Zellzyklus und immortalisieren die Zellen, indem sie mit den Tumorsuppressorgenen p53 und dem Retinoblastom-Gen (Rb) interagieren. Somit greifen sie nicht nur in die p53-regulierte Apoptose ein, sondern über das Rb-Gen auch in den Zellzyklus. Eine ungehemmte Teilung der infizierten Zelle ist die Folge [12-14].

1.3. Definition der (heterogenen nukleären) Ribonukleoproteine

Eukaryontische Zellen transkribieren ihre DNA zu pre-mRNA. Diese werden von spezifischen RNA-Protein-Komplexen gebunden und geschnitten (Splicing) [15], es entsteht die mRNA. Die herausgeschnittenen Introns bleiben an diese enzymatischen Komplexe gebunden und werden gemeinsam mit diesen abgebaut. Die hieraus resultierende mRNA wird als DNA-Transkript aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert und bindet, abhängig von der Funktion, spezifische Proteine. Diese RNA-Protein-Komplexe nennt man Ribonukleoproteine (RNP). Es handelt sich dabei um dynamische Molekül-Komplexe aus RNA- und Proteinbestandteilen, die in Zellkern und Zytoplasma vorkommen.

Eine Unterkategorie der RNPs stellen die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) dar. Dabei handelt es sich um eine variable Gruppe der RNA-bindenden RNPs, die sich charakteristische Struktur motive wie eine RNA-bindende Domäne (RBD) bzw. ein RNA-Recognition-Motiv (RRM) am N-Terminus teilen. In Studien konnten diese mit wichtigen regulatorischen Funktionen der posttranskriptionellen Proteinexpression in Verbindung gebracht werden [16].

1.4. Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K

In der vorliegenden Arbeit liegt der Focus auf einem spezifischen hnRNP, dem heterogenen nukleären Ribonukleoprotein K (hnRNP K), welches dem Remodeling der Chromatinstruktur, der Transkription [17], dem Splicing der pre-mRNA [18] sowie dem Export derselben aus dem Nukleus und der Translationsmodulation innerhalb der Zelle zugeordnet werden konnte [19, 20]. Die Funktion des Ribonukleoproteins für die

zelluläre Homöostase wird über Expressionsintensität, Lokalisation, Phosphorylierungsstatus und Protein-Interaktionen moduliert [21]. Essenziell für diese funktionelle Vielfalt ist die Eigenschaft, sich bi-direktional zwischen Zytoplasma und Nukleus bewegen zu können. Dies wird durch die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) sowie die nukleäre Shuttle-Domäne ermöglicht [22]. hnRNP K moduliert durch diverse post-translationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierung, Methylierung oder Sumoylierung (Small-Ubiquitin-like-Modifier-Proteine werden reversibel an die Seitenketten angehängt), Interaktionen mit Zielstrukturen. Der bei der Bestrahlung entstehende oxidative Stress sorgt ebenso wie erhöhte IL-6 Spiegel oder eine vermehrte Insulin-Sekretion für eine Induktion der hnRNP K-Phosphorylierung an Threonin-, Tyrosin- oder Serinresten. Dies beeinflusst die Lokalisation des Ribonukleoproteins über verschiedene Signalwege (ERK, MEK, Raf, Ras) und führt zur Akkumulation innerhalb des Zytoplasmas [21, 23-26]. Die Aminosäuresequenz von hnRNP K weist zwei kleine und fünf große Abschnitte auf, die für Arginin codieren (beispielsweise die Codons AGA oder AGG). Dieser wird von der Protein-Arginin-Methyltransferase I asymmetrisch methyliert und demethyliert. Ohne angehängte Methylgruppe hat hnRNP K Einfluss auf die Expression von p53 [27-31]. Ionisierende Strahlung induziert DNA Läsionen, welche wiederum zur Sumoylierung des Lysinrests 422 an hnRNP K und zu einer verstärkten Transkription von p53 führt [23, 32, 33]. Das Protein p53, ein Transkriptionsfaktor von großer Bedeutung für Zellzyklus-Arrest und Apoptose bzw. die DNA-Schadensreparatur, besitzt mit hnRNP K einen korrespondierenden Faktor, mit dessen Hilfe die p53-vermittelte Transkriptionsregulation moduliert werden kann [23, 33-35]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass hnRNP K p53-unabhängig die Apoptose mittels Induktion von Caspase-Inhibitoren unterdrücken kann [36]. Die Wirkung von p53 und dessen Interaktion mit hnRNP K wird im Abschnitt 1.7 im Detail beschrieben. Weiterhin zeigte sich, dass hnRNP K nach ionisierender Bestrahlung (IR) überexprimiert wird, wobei sich das Protein-Level bereits 15 Minuten post-IR vervielfachte und nach 3h erneut auf physiologisches Niveau fiel, sofern die Zellen in der Lage waren, DNA Reparaturen suffizient durchzuführen [37]. In Zellen, die Reparaturdefizienzen aufwiesen, blieb die Proteinkonzentration für mindestens 12 Stunden erhöht [35].

1.5. Das heterogene Ribonukleoprotein K und seine kanzerogene Wirkung

hnRNP K konnte in Studien im physiologischen Rahmen nahezu ubiquitär in gesunden Körperzellen nachgewiesen werden [38]. Allerdings wird das Ribonukleoprotein auch auf unterschiedlichen Ebenen mit Kanzerogenese und Metastasierung in Verbindung gebracht. So konnte es in verschiedenen Malignomen detektiert werden, wobei eine Korrelation zwischen Proteinüberexpression, aggressivem klinischen Verlauf und Metastasierung aufzeigbar war [39-44]. Auch konnte demonstriert werden, dass ein Verlust von hnRNP K, in diesem Falle durch RNAi (RNA-interference) vermittelt, in Hepatozellulären-Karzinom-Zellen (HCC) unabhängig von p53 die Zellvitalität deutlich reduziert, und dass vermehrt Apoptose stattfindet [36]. In Studien konnte gezeigt werden, dass hnRNP K die Aktivität von Initiator- und Effektor-Caspasen durch Transkriptionskontrolle von Caspase-Inhibitoren signifikant reduziert. Dabei wird ein bestrahlungsinduzierter Zellzyklusarrest in G1 oder G2 durch p53 und hnRNP K mit p21 als Ziel-Protein mediiert [37]. Durch diese regulatorische Eigenschaft trägt hnRNP K als wichtiger Faktor zur zellulären strahleninduzierten DNA-Schadensreparatur bei [45, 46]. Eine Hochregulation führt zu unkontrolliertem Zellzyklusprogress und reduzierter Apoptose. Beides könnte das Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie mindern und weitere maligne Entartung akzelerieren. Einige Studien assoziieren hnRNP K mit klassischen Onko- und Tumorsuppressor-Genen wie beispielsweise c-myc oder c-src [47]. hnRNP K wirkt dabei sowohl translations- als auch transkriptionsinduzierend auf c-myc und interagiert mit bzw. aktiviert c-src direkt. Dabei könnte eine Mehrexpression des Ribonukleoproteins zu einer deutlich gesteigerten Genexpression führen und Tumorinduktion oder die Akzeleration der malignen Entartung hervorrufen [23, 48]. Insbesondere eine vermehrte Expression führt zu einem möglichen kanzerogenen Effekt [49]. Andere Studien konnten zeigen, dass ein Knock Down von hnRNP K zu einer Reduktion der Migrationsfähigkeit in diversen Tumoren führt [43, 50] und auch die Proliferation in Tumorzellen allgemein reduziert [51]. Eine kürzlich publizierte Studie demonstrierte, dass hnRNP K in HNSCC-Zellen nach Bestrahlung vermehrt exprimiert wird und ein Knock Down die HNSCC-Zell-Migration als Grundlage der Metastasierung beeinträchtigt [52]. Insgesamt zeigt sich, dass in verschiedenen Modellen eine vermehrte Expression von hnRNP K die Kanzerogenese fördert.

1.6. Wirkung des Tumorsuppressorgens p53 und dessen Rolle in der Kanzerogenese

p53 ist ein, wie der Name bereits impliziert, 53kDa schweres Regulator-Protein des Zellzyklus und ein essenzieller Tumorsuppressor, dessen gleichnamiges Gen auf dem Chromosom 17p13.1 liegt. In diesem Zusammenhang dient es der genomischen Plastizität und Zelldifferenzierung und mediiert die Genexpression bei zellulärem Stress beispielsweise bei ausgeprägter DNA-Schädigung. Dabei wirkt es als Proliferationsinhibitor. Seine bekannteste Funktion ist die Induktion der Apoptose, indem es insbesondere in der Rolle als Tumorsuppressor im Sinne eines Transkriptionsfaktor (TF) wirkt [53], wobei es den Zellzyklusprogress und das Zellwachstum nach der Detektion von DNA Läsionen inhibiert [21, 48]. Für die Ausübung dieser Funktionen besitzt es verschiedene Domänen: zentral gelegen ist die spezifische DNA-Bindungssequenz, gefolgt von der nukleären Lokalisationssequenz. N-Terminal findet sich die TF-Aktivierungsdomäne (für TFIID und TFIIB), das C-terminale Ende dient der Regulation der DNA-Bindungsfähigkeit an der zentral gelegenen Domäne [21, 54, 55]. Seine Mediatorfunktion übt p53 HDM-2-vermittelt aus (Human Double Minute 2, in Studien auch oft als MDM-2 (Mouse Double Minute 2) bezeichnet), dazu erfolgt der Export ins Zytoplasma [56]. Physiologisch liegt p53 an HDM-2 gebunden vor [57, 58]. Dabei dient HDM-2, an p53 bindend, gleichzeitig der Inhibition der originären Funktion von p53 sowie der Markierung zur Ubiquitylierung. Dauerhaft kommt es so also über die HDM-2-Ubiquitin-Ligase zur Ubiquitylierung und zum Abbau durch das Proteasom im Zytosol. Somit ist p53 in einem ständigen Regenerationsprozess begriffen (HWZ: 20-30 Minuten) [33, 56]. Sobald eine genomische Aberration (z.B. durch ionisierende Strahlung oder chemische Noxen) detektiert wird, verhindert die Phosphorylierung einer spezifischen Aminosäuresequenz von p53 durch die ATM-Kinase (Ataxia Telangiectasia Mutated-Kinase) den Export des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins ins Zytoplasma und führt zu einer Akkumulation innerhalb des Zellkerns [34]. Durch die ATM-Kinase katalysierte Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass sich p53 von seinem Inhibitor (HDM-2) löst und in aktivierter Form vorliegt. In aktivierter Form kann p53 den Zellzyklus unterbrechen, um eine DNA-Schadensreparatur oder Apoptose einzuleiten. Das Vorhandensein eines inaktiven Pools von p53 innerhalb des Zellkerns ermöglicht ein rasches Ansprechen auf Noxen ohne eine Verzögerung durch Expressions- und Translationsprozesse. Je nach Zellzyklus und Umfang der DNA-Schäden induziert p53 spezifische Reaktionen [53]: Wird in einer in der frühen G1-

Phase befindlichen Zelle eine C-Terminale DNA-Läsion detektiert, inhibiert die Aktivierung von p53 die Expression von p21. Dies induziert über den D-Cyclin/CDK4/6-Komplex mittels Phosphorylierung des Retinoblastom-Gens auf physiologische Weise weitere Gene der Zellzykluskontrolle. Dazu gehört der Cyclin-E/CDK2-Komplex, der den Übergang der G0- in die G1-Phase moduliert. Weiterhin aktiviert p53 das Reparaturprotein GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage). Der entstandene DNA-Defekt kann so behoben werden, bevor die Zelle in die S-Phase eintritt. Über die Inhibition der Cyclin/CDK1-Komplex-Bildung, die für den Eintritt in die Mitosephase essenziell ist, kann auch in der G2-Phase der Zellzyklus unterbrochen werden. Bei irreparablen Läsionen oder zu einem Zeitpunkt, wenn sich die Zelle bereits in der Teilungsphase befindet, wird über p53 die Apoptose eingeleitet [59]. Über seine essenzielle Funktion als Tumorsuppressor ist p53 ein wichtiger Angriffspunkt in der Kanzerogenese [51]. In mehr als 60% aller Tumore kann eine Aberration des p53-Gens nachgewiesen werden. Dies führt zur Immortalität der Zellen, da auch bei detektierten Mutationen keine Apoptose eingeleitet werden kann und ein dysregulierter Zellzyklusprogress stattfindet. Das Tumorsuppressorprotein ist allerdings nicht die Ursache dieser Tumorgenese, sondern Teil der mangelnden Fähigkeit des Organismus, gegen eine maligne Zellentartung adäquat vorzugehen. Ebenfalls sprechen p53 mutierte Zellen schlechter auf Chemo- oder Radiotherapie an, da der p53-Signalweg die Elimination der Zellen verhindert. Es entstehen in der Folge akzeleriert vermehrt Mutationen, die eine Metastasierung begünstigen können [58].

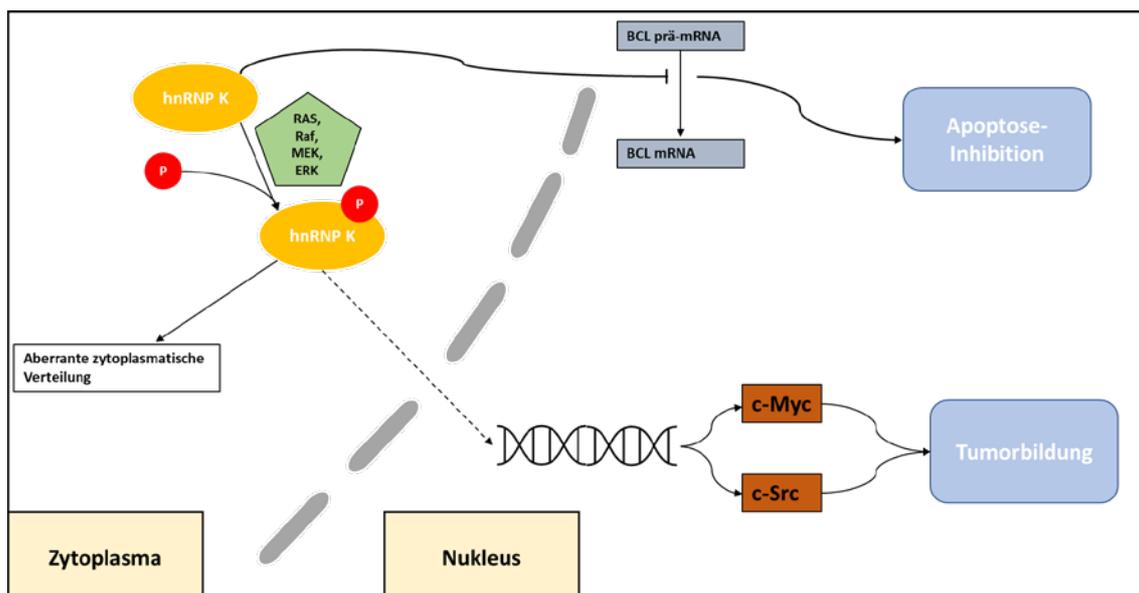


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines Ausschnittes der Beteiligung von hnRNP K an der Kanzerogenese [modifiziert nach Wang, Z, Qiu, H, He, J, et al. The emerging roles of hnRNP K. J Cell Physiol. 2019; 235: 1995–2008.

1.7. Das Protein 53 und seine Interaktionen mit hnRNP K

In Reaktion auf ionisierende Strahlung zeigte sich hnRNP K als wichtiger Mediator für eine funktionierende zelluläre Antwort der DNA-Schadenreparatur. Eine enge Kooperation mit p53 zur Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints konnte bereits 2005 durch die Forschungsgruppe um Prof. A. Moumen dargestellt werden [35]. hnRNP K zeigte sich als direktes Zielprotein der Ligase HDM2, welches zuvor bereits mit p53 und der DNA-Schadensreparatur in Verbindung gebracht wurde [60]. Die Reduktion von hnRNP K verhinderte dabei weder die Phosphorylierung von p53, noch die Rekrutierung von DNA-Schadensreparatur-Mediatoren zu DNA-Läsionen. So wurde vermutet, dass die Rolle von hnRNP K vermutlich die eines transkriptionellen Kofaktors ist. Als solcher wird das Ribonukleoprotein für die Aktivierung von p53 Zielgenen benötigt, beispielsweise p21, und wirkt als essenzieller Mediator. Auch konnte gezeigt werden, dass hnRNP K und p53 in gemeinsamer Interaktion Einfluss auf die Induktion eines Zyklusarrests in G1/S- und G2/M-Zellzyklus-Checkpoints nehmen [34]. So konnte in der Analyse des Zellzyklus‘ gezeigt werden, dass der Zellzyklusarrest, welcher durch eine DNA-Läsion induziert werden würde, aufgrund der Reduktion von hnRNP K oder p53, nicht stattfindet. Dieser Effekt von hnRNP K zeigte sich p53 abhängig. In p53-geminderten Zellen zeigte sich keine Alteration des Zellzyklusarrests. Es wird vermutet, dass hnRNP K die Stabilität von p53 Promotor-Komplexen verbessert. Indiziert wird dies durch eine gemeinsame Expressionsanpassung vor sowie nach DNA-Läsionen. So wurde hnRNP K als wichtiger Faktor in der DNA-Bindungsfähigkeit von p53 sowie dessen Selektion für Zielstrukturen innerhalb des Genoms diskutiert [35].

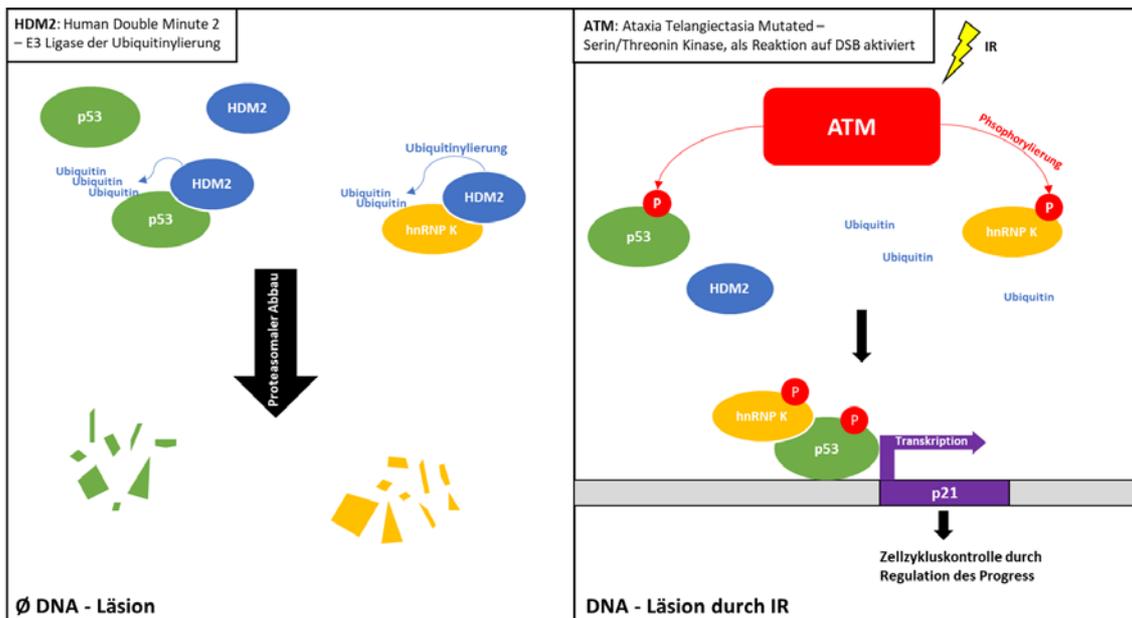


Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der Regulation von p53 und hnRNP K ohne ionisierende Bestrahlung (links) sowie nach ionisierender Bestrahlung (rechts) [modifiziert nach Nickoloff, Jac. (2013). Assaying DNA double-strand break induction and repair as fast as a speeding comet. *Cell cycle*. 12(9). 10.4161/cc.24667. Figure 1]

1.8. Die zelluläre Antwort auf ionisierende Strahlung

Kommt es zur Strahlenexposition, beispielsweise durch Röntgenstrahlen, werden DNA-Schäden in den betroffenen Zellen hervorgerufen. Differenziert werden müssen dabei direkte Schäden des DNA-Doppelstranges, z.B. Doppelstrang- oder Einzelstrangbrüche (DSB und SSB), und indirekte Schäden. Bei Letzteren entstehen reaktive Kationen, die ihrerseits schädigende Folgereaktionen auslösen. Die entstehenden freien reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) wie Hyperoxid-Anionen, z.B. Superoxid-Anionenradikal O_2^- , Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal (OH) führen wiederum zu Lipidperoxidation, Proteinoxidation und DNA-Schäden [61].

Im menschlichen Genom ereignen sich täglich mehrere zehntausend DNA-Läsionen durch diverse Einflussfaktoren. Die meisten von diesen können durch unseren Körper ohne bleibende Schäden innerhalb der DNA detektiert und anschließend repariert werden. Dies ist möglich, weil Körperzellen variable DNA-Reparaturmechanismen unterhalten, für die mehr als 150 verschiedene Gene kodieren. Ist jedoch eine Reparatur des Schadens nicht möglich, wird der programmierte Zelltod induziert. Strahlung oder reaktive Sauerstoffspezies als Folge dieser induzieren sowohl ganze Strangbrüche als auch Modifikationen der einzelnen DNA-Nukleotide. Dabei können sowohl Desoxyribose als auch Basen betroffen sein; dies führt zu Fehlpaarungen und Mutationen [62]. Läsionen der DNA sind weniger gravierend, sofern sie nur einen Einzelstrang der DNA-Doppelhelix betreffen, da die Reparaturmechanismen die intakte

komplementäre Matrize als Vorlage der Reparatur verwenden. Arten der Fehlerbehebung sind die direkte Reparatur, wobei ein Enzym den Defekt erkennt und anschließend selbst behebt (z.B. Photolyasen, die entstandene Thymindimere in zwei Thymin-Moleküle auftrennen), oder die Basen-Exzisionsreparatur (BER), bei der durch Glykosylasen fehlgepaarte Basen herausgeschnitten werden. Die entstandenen abasischen Positionen werden durch Polymerasen wieder aufgefüllt. Eine weitere Möglichkeit ist die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), die größere Basenveränderungen behebt als die BER. Entstehen bei der Schädigung DSB, ist hingegen die Stabilität des Genoms beeinträchtigt, da es zu chromosomalen Translokationen oder einer Replikationsbehinderung kommen kann. Die Problematik liegt im Fehlen des Komplementärstrangs, ohne den die Information nicht rekonstruiert werden kann. Eine Methode der Reparatur ist die homologe Rekombination; die kann nur im Anschluss an die DNA-Replikation (späte S-Phase oder G2-Phase) stattfinden, da der komplementäre Strang des Schwesterchromatids als Matrize vorliegt. Alternativ kann die nicht-homologe End-zu-End-Verbindung zu jedem Zeitpunkt im Zellzyklus stattfinden. Hier entstehen allerdings gehäuft Fehler innerhalb der DNA, da nur ein glatter Bruch des Doppelstranges eine fehlerfreie Ligation (Verbindung) der beiden Stränge ermöglicht. Auftretende Überhänge werden enzymatisch so prozessiert, dass eine Ligation katalysiert werden kann. Infolge dieser Reparatur entstehen jedoch häufig kleinere Deletionen, die zu einer Leserasterverschiebung in kodierenden DNA-Abschnitten führen können [63].

1.9. Ablauf des programmierten Zelltodes

Programmierter Zelltod oder Apoptose ist neben der Nekrose der bedeutendste Mechanismus des Zelltodes und wird im Gegensatz zur Nekrose durch die Zelle selbst aktiv durchgeführt. In der Differenzierung zur Nekrose entstehen dadurch keine Schäden an umgebenden Zellen oder Geweben durch freiwerdende, potenziell toxische Zellbestandteile.

Apoptose kann sowohl durch die Zelle selbst (intrinsisch) oder von außen, beispielsweise von Immunzellen (extrinsisch) induziert werden [64, 65].

Der intrinsische Weg der Apoptoseinduktion wird durch osmotischen Stress, DNA-Läsionen oder den Entzug von Wachstumsfaktoren induziert. Die auslösenden Faktoren wirken auf Proteine der Bcl-2-Familie, die pro- und anti-apoptotische Faktoren beinhalten. Einer dieser Faktoren ist p53, welches durch Phosphorylierung aus dem Expressions- und Ubiquitinylierungszyklus entfernt und vermindert abgebaut wird. In der Folge akkumuliert es zellulär. Dabei kommt es zur Induktion der pro-apoptotischen Bad-Proteine. In aktivierter Form binden sie anti-apoptotische Proteine und inhibieren diese durch Bildung von Heterodimeren, sodass die Apoptose initiiert werden kann. Parallel werden Bax-/Bak-Proteine aktiviert (pro-apoptotisch multidomäne Proteine der Bcl-2-Familie). Diese bilden Heterodimere mit Bcl-2 und aktivieren so die Apoptose. Nach Interaktion mit der mitochondrialen Membran werden spannungsabhängige Ionenkanäle geöffnet; das führt zu einem Verlust des Membranpotentials und einer Freisetzung von Cytochrom C und SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases). Der APAF-1 (Apoptotisch Protease aktivierender Faktor 1) löst sich von der Zellmembran der Mitochondrien ab und bildet zusammen mit Cytochrom C so das sog. Apoptosom, einen Proteinkomplex, der der Bindung an ProCaspase-9 dient und damit Caspase-9 aktiviert (Initiator Caspase). SMAC konnte in Studien in Zusammenhang mit der Inhibition von IAP (Inhibitor Apoptotischer Proteine) in Verbindung gebracht werden [66], die die Caspase-Kaskade über die Caspase-9 ermöglicht. Die Initiator-Caspase-9 aktiviert die Effektor-Caspase-3 durch Abspaltung der Prodomäne. Die Effektor-Caspasen beginnen, Zielproteine zu lysieren. Dieser Vorgang dient dem programmierten Zelltod bei irreparablen DNA-Läsionen. Über seine Funktion als Tumorsuppressor ist p53 dabei ein wichtiger Angriffspunkt der Kanzerogenese. So kann in mehr als 60% aller Tumore eine Aberration des p53-Gens nachgewiesen werden; dies führt zur Immortalität der Zellen durch Dysregulation des Zellzyklus und Apoptose. hnRNP K wirkt dabei als essenzieller Kofaktor von p53 [34, 45].

Der extrinsische Weg wird eingeleitet durch Bindung von Liganden an einen der sog. Todesrezeptoren. Bei den Liganden handelt es sich um Zytokine, welche unter anderem von T-Zellen ausgeschüttet werden. Die Todesrezeptoren gehören zur Gruppe der TNF-Rezeptoren (Tumornekrosefaktor). Zu diesen gehören der TRAIL-Rezeptor, der FAS-R oder der TNF-R. Eine Zytokinbindung führt zu einer Konformationsänderung im FADD-Liganden (FAS associated death domain), der, nun aktiviert, die ProCaspasen 8 und 10 induziert und somit eine Freisetzung der Initiator-Caspasen bewirkt. Diese diffundieren durch das zelluläre Zytoplasma und induzieren weitere Reaktionen der Apoptose-Kaskade. So aktivieren sie direkt die ProCaspase-3 und -7. Diese vollziehen nach ihrer Aktivierung die Apoptose als Effektor-Caspase-3 und -Caspase-7 mittels enzymatischen Abbaus der Zielstrukturen.

Eine zweite Reaktion, die Caspase-8 und Caspase-10 initiieren, ist die Aktivierung von Bid zu tBid. Diese stellt die Verbindung zum intrinsischen Weg her. tBid induziert wiederum die Bildung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak, die ihrerseits so die sog. MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeability) hervorrufen.

Dabei stellt Caspase-3 gemeinsam mit Caspase-7 sowohl beim extrinsischen Weg als auch beim intrinsischen Weg die Endstrecke der Apoptose dar und baut zelluläre Proteine sowie insbesondere die DNA ab [66-68].

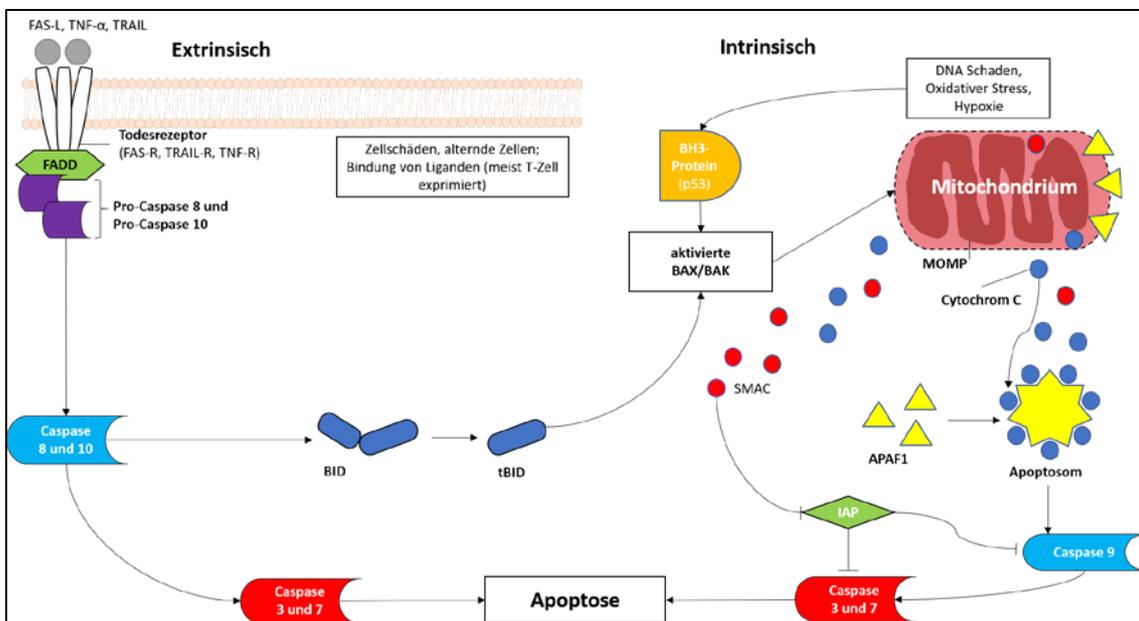


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung der Apoptose, vermittelt über den extrinsischen (links) bzw. intrinsischen (rechts) Weg. Die in unseren Versuchen analysierte aktivierte Caspase-3 befindet sich als Effektor-Caspase in der gemeinsamen Endstrecke der Apoptose [modifiziert nach: [69], Figure 1].

1.10. Grundlage und Zielsetzung dieser Arbeit

Karzinome des Mund- und Rachenraumes stellen in Deutschland eine häufige Tumorentität dar, die zu über 90% aus Plattenepithelkarzinomen (HNSCC) besteht [2, 70]. Traditionell sind Tabak- sowie Alkoholkonsum als Hauptrisikofaktoren etabliert, in den vergangenen Jahren stieg jedoch die Karzinomprävalenz mit Assoziation zu oralen Infektionen mit dem humanen Papillomavirus (HPV) signifikant an [2-7]. In modernen, multimodalen Therapieansätzen nimmt die adjuvante und neoadjuvante Strahlentherapie in Verbindung mit chirurgischen bzw. chemotherapeutischen Behandlungsansätzen einen zentralen Platz ein. HPV-assoziierte HNSCC zeigen dabei neben einer erhöhten Strahlensensibilität eine verbesserte Prognose nach Therapie, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen aktuell ungeklärt sind [4, 8, 12, 13].

Eine Hypothese ist die Beeinträchtigung des Zellzyklus durch übertragene Onkogene mit Wirkung auf p53, den sog. Wächter des Genoms, und das Retinoblastom-Gen (Rb). Eine limitierte Reparaturfähigkeit der Zellen für DNA-Doppelstrangbrüche würde entstehen. Diese werden vornehmlich durch Bestrahlung hervorgerufen [71]. Eine mögliche Ursache innerhalb der Proteomik, die die verbesserte Strahlensensibilität bedingen könnte, wäre eine Beteiligung des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K (hnRNP K), das als essenzieller Co-Faktor des Tumorsuppressorgens p53 agiert. So konnte in den vergangenen Jahren nachgewiesen werden, dass das ubiquitär in Zellkernen humaner Zellen vorkommende hnRNP K in diversen Tumorentitäten überexprimiert wird und mit Wachstum und Proliferation sowie Überleben der Tumorzellen assoziiert ist [35, 36].

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Bedeutung von hnRNP K für die Vermittlung karzinogener Eigenschaften, insbesondere der Strahlenresistenz, von HNSCC in Abhängigkeit des HPV-Status in den Mittelpunkt der Betrachtungen gestellt. Die hier dargestellten Untersuchungen sollen dabei in erster Linie einer Erweiterung des Verständnisses spezifischer Funktionen und Interaktionen der Ribonukleoproteinfamilie, insbesondere des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K dienen. Dazu kommen molekularbiologische und proteinbiochemische in-vitro-Verfahren zum Einsatz. Auf diese Weise sollen valide Grundlagen gelegt werden, auf die in Zukunft weiterführende Untersuchungen aufbauen können. So soll diese Arbeit sowohl Erkenntnisgewinn als auch Wegweiser für zukünftige diagnostische oder therapeutische Ansätze der Radioonkologie sein.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Puffer und Chemikalien

Im Folgenden sind die Puffer und Chemikalien aufgeführt, die im Rahmen der Untersuchungen zur Anwendung kamen. Der Übersicht halber werden diese nicht für alle Folgeversuche wiederholt. Detaillierte Mengenangaben sind in der spezifischen Versuchsmethodik aufgeführt.

Die verwendeten Puffer und Chemikalien wiesen analytischen Reinheitsgrad auf.

2.1.1.1. Zellbiologische und Molekularbiologische Verfahren

Subkultivierung der Zellkultur und Anlage der Versuchsansätze

- Medium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose, pyruvate (DMEM) (Qty: 500 ml), REF: 41966-029, LOT: 1858694, GIBCO, UK (Cal-27)
- Medium: Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)(Qty: 500 ml), M5650, LOT: RNBF1272, SIGMA-ALDRICH, UK (UPCI-SCC-154)
- Zusatz: L-Glutamin (200 mM 100x)(Qty: 100 ml), REF: 25030-024, GIBCO, UK (UPCI-SCC-154)
- Minimal Essential Medium – Non Essential Amino Acids 100X (MEM NEAA), (Qty: 100 ml) REF: 11140-035, LOT: 1788104, GIBCO, UK (UPCI-SCC-154)
- Fetal Bovine Serum / Fetal Calf Serum (FCS), F7524-500ML, LOT: 060M3395, SIGMA-ALDRICH, USA, Taufkirchen, GER
- Trypsin-EDTA (Qty: 100 ml 0.05%) (1x), REF: 25300-054, LOT: 00412, GIBCO, UK

Vitalitätstestung

- Trypanblau-Farbstoff (Trypan-Blue Solution 0,4 %), Prepared in 0.81 % sodium chloride and 0.06 % potassium phosphate dibasic, T8154 100 ml, LOT: 027K2332, SIGMA-ALDRICH, UK

Klonierungstest – Adhäsionszellen

- Ethanol (Qty: 2.5l) >99,5 %, Ph. Eur., reinst., Art. Nr.: 5054.2, CARL ROTH GMBH, GER
- Trypanblau-Farbstoff (Trypan-Blue Solution 0,4 %), Prepared in 0.81 % sodium chloride and 0.06 % potassium phosphate dibasic, T8154 100ML, LOT: 027K2332, SIGMA-ALDRICH, UK
- Phosphate Buffered Saline (PBS), pH: 7.4, Qty:1 Packet in 1 liter of 0.01 M, LOT: SLBN3568V, SIGMA ALDRICH, MO, USA

Immunfluoreszenzfärbung

- Roti-Histofix 4 % (Qty: 500 ml), säurefrei (pH 7), phosphatgepuffert, klare, farblose Formaldehydlösung 4%, Art. Nr.: P087.4, CARL ROTH GMBH, GER
- Triton X-100 – pro analysis (Qty: 1 l), X100 1.08603.1000, K22272603 537, 791086.0305/04-60852896, MERCK, GER

2.1.1.2. Proteinbiochemische Methodiken

Herstellung eines Proteinlysats

- RIPA Buffer (10X, Qty: 15 ml), LOT: 10, REF: 9806S, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA
- Protease/Phosphatase Inhibitor-Cocktail (100X, Qty: 1 ml), LOT: 12, REF: 5872S, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA

Messung der Proteinkonzentration (BCA)

- BCA Protein Assay Reagent A (Qty: 250 ml), LOT: 1, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, REF: 11621S, MA, USA
- BCA Protein Assay Reagent B (Qty: 25 ml), LOT: 1, REF: 11622S, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA
- BCA Protein Assay Albumin Standard (Qty:10 x 1 ml (2.0 mg/ml)), REF: 11623S, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA
- Compatibility Reagent (Qty:6 x 8strips), LOT: 1, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, REF: 11785S, MA, USA

- Reconstitution Buffer (Qty:15 ml), LOT: 1, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, REF: 11791S, MA, USA
- Albumin Standard, concentration: 2.0 mg/ml in a 0.9 % aqueous NaCl Solution containing sodium azide (Qty:10 x 1 ml), Source: Bovine Serum Albumin, LOT: RD236145, Prod: 23209, THERMO SCIENTIFIC, IL, USA

Western Blot

- Novex™ NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4 x) (Qty:10 ml), LOT: 1691086, THERMO FISHER SCIENTIFIC, IL, USA
- Novex™ NuPAGE™ Transferpuffer (20 x, Qty: 125 ml), REF: NP0006-1, LOT: 1633731, THERMO FISHER SCIENTIFIC, CA, USA
- Novex™ NuPAGE™ Transferpuffer (20 x, Qty: 1 l), REF: NP0006-1, LOT: 1621147 THERMO FISHER SCIENTIFIC, CA, USA
- NuPAGE™ Novex™ 4-12 % Bis-Tris-Proteingele, 1.0 mm,10-Well, LOT: NP0321PK2, THERMO FISHER SCIENTIFIC, CA, USA
- MagicMark XP, Western Protein Standard (Qty: 250 µl), LOT: 1760169, REF: LC5602, THERMO FISHER SCIENTIFIC, CA, USA
- 1-Step Transfer Buffer (Qty: 1 l), Prod: 84731, THERMO SCIENTIFIC, IL, USA
- Methanol, Rotipuran > 99.5 % (Qty: 2.5 l), Art. Nr.: 4627.5, UN1230, CARL ROTH GMBH, GER
- 20x TBS Tween – 20 Buffer (Qty: 500 ml), 20 x Concentrate: 1x= 25 mM Tris, 0.15M NaCl, 0.05 % Tween-20, REF: 28360, LOT: QB211834, THERMO SCIENTIFIC, IL, USA
- Milchpulver Blotting grade, pulv. Fettarm (Qty:1 kg), Art. Nr.: T145.5, CARL ROTH GMBH, GER
- SuperSignal West Pico Chemiluminiszent Substrate (Qty: 500 ml), LOT: RC224889, Prod. Nr. 34080, THERMO SCIENTIFIC, IL, USA
- SuperSignal West Pico Luminol Enhancer Solution (Qty: 250 ml), Prod: 856136, THERMO SCIENTIFIC, IL, USA
- Pico Stable Peroxide Solution (Qty: 250 ml), LOT: QL227136, THERMO SCIENTIFIC, IL, USA
- Roti-Histofix 4% (Qty: 500 ml), säurefrei (pH 7), phosphatgepuffert, klare, farblose Formaldehydlösung 4%, Art. Nr.: P087.4, CARL ROTH GMBH, GER

Durchflusszytometrie (Flow Cytometrie, FACS)

- BD Pharmingen – FITC BrdU Flow Kit – Part A: Component of 557891 or 559619, CAT: 51-2354AK, LOT: 6053889, BD BIOSCIENCES, USA
- BD Perm/Wash, Buffer (Qty:25 ml, 10x stock), LOT: 5195585, CAT: 51-2091KE, BD BIOSCIENCES, USA
- BD Pharmingen, FITC anti-BrdU AK, LOT:6043933, CAT: 51-23614L, BD BIOSCIENCES, USA
- BD Cytoperm, Permeabilization Buffer Plus (Qty:10 ml, 1x), Prod: 561651, CAT: 51-2356KC, LOT: 5328656, BD BIOSCIENCES, USA
- BD Cytotfix/Cytoperm, Fixation and Permeabilization Solution (Qty: 25 ml), CAT: 51-2090KE, LOT: 5356997, BD BIOSCIENCES, USA
- BD Pharmingen – 7-AAD (Qty: 50 Tests, 1.0 ml), LOT: 5345625, CAT: 51-2359KC, BD BIOSCIENCES, USA
- BD Pharm Lyse – Lysing Buffer (Qty: 100 ml in 10 x concentration), CAT: 555899, LOT: 4189857, BD BIOSCIENCES, USA
- BD Pharmingen FITC BrdU Flow Kit – Part B: Component of 557891 or 559619, CAT: 51-2354BK, LOT: 6053889, BD BIOSCIENCES, USA
- BD Pharmingen, BrdU, CAT: 51-2420KC, LOT: 5320807, BD BIOSCIENCES, USA
- DNase I (RNase-free)(Qty: 1.000 Units, 2.000 U/ml), M0303S, LOT: 0161509, NEW ENGLAND BIOLABS (NEB), MA, USA
- RIPA Buffer (10X, Qty: 15 ml), LOT: 10, REF: 9806S, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA
- RNase (Ribonuclease A from bovine pancreas) (Qty: 100 mg), LOT: R5125, SIGMA ALDRICH, now MERCK, GER
- Pepsin (aus Magenschleimhaut vom Schwein – 0,7, FIP-U/mg für biochemische Zwecke (Qty:100 g)), EC 3.4.23.1, 1.07185.0100, LOT: K28938985 346, MERCK, GER
- HCl (Hydrochloric acid 4 mol/l - 4 N volumetric standard solution (Qty: 1l)), EG-Nr. 231-595-7, N076.1, CARL ROTH, GER
- Albumin bovine Fraction V, pH 7.0 (Qty: 25 g), 11930.02, LOT: 151180, EC: 232-936-2, SERVA, GER
- Propidiumiodid (Propidium iodide \geq 94.0 % (HPLC)) (Qty: 10 mg), LOT: P4170, EC: 247-081-0, SIGMA ALDRICH, USA

Knock-Down – siRNA Transfektion

- Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Mannheim, GER)
- Silencer® Select negative control siRNA #1, (Life Technologies, Waltham, USA)
- Silencer® Select hnRNP K (sequence: 3'-AUAAUCAUAGGUUUCAUCGta; 5'-CGAUGAAACCUAUGAUUAUtt) (Life Technologies, Waltham, USA)

Bio-Plex Multiplex - Apoptose Immuno-Assay

- Bio-Plex Pro™ RBM Apoptosis Panel 3 (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), enthält: Capture beads (1.4 ml), Detection antibodies, Standard mix, control 1 (high) and 2 (low), Blocking buffer, Standard diluent, Assay buffer (60 ml), Lysate dilution buffer (LDB 100 ml), Cytosolic extraction buffer (CEB, 60 ml), Streptavidin-PE (10 x, 250 µl)

2.1.2. Antikörper

Aufgeführt sind alle Antikörper, die innerhalb dieser Studie Verwendung fanden.

Die verwendeten Antikörper wiesen analytischen Reinheitsgrad auf.

Western Blot

- hnRNP K (R332) Rabbit Ab (100 µl), REF: 4675S, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA
- Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulin HRP (Qty: 1 ml, 0.25 g/l), REF: P0448, LOT: 20010775, (DAKO) AGILENT PATHOLOGY SOLUTIONS, CA, USA
- GAPDH (14C10) Rabbit mAb (HRP Conjugated) (Qty:100 µl), REF: 3683S, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA

Immunfluoreszenzmikroskopie

- Anti-BrdU (B44) Pure (Qty: 2 ml), LOT: 6042756, BD BIOSCIENCES, CA, USA
- Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC Rabbit F(ab')₂ (Qty: 2 ml), REF: F0313, LOT: 20019828, DAKO, DK
- Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulin HRP (Qty: 1 ml, 0,25 g/l), REF: P0448, LOT: 20010775, AGILENT PATHOLOGY SOLUTIONS, CA, USA
- hnRNP K (R332) Rabbit Ab (100µl), REF: 4675S, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA
- VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Qty:10 ml), SKU: H-1200-10, ABCAM, Cambridge, UK
- Anti-mouse IgG Fab2, Alexa Fluor (R), 488nm, Molecular Probes (Qty: 250 µl with 2 mg/ml) REF: 4408S, LOT: 8, CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA
- Rabbit polyclonal anti-p16INK4A (dilution 1:1000), CELL SIGNALING TECHNOLOGIES, MA, USA
- Texas Red – X goat and rabbit IgG (H+L) (Qty: 0.5 ml with 2 mg/ml, REF: T6391, LOT: 1383055, LIFE TECHNOLOGIES, OR, USA
- Texas Red – X Phalloidin (Verdünnung 1:40) INVITROGEN, Mannheim, GER
- Phalloidin FITC labeled, Mixed Isomers (Qty: 0.1 mg), REF: P-5282, LOT: 120K1599, SIGMA ALDRICH, USA

Durchflusszytometrie (Flow Cytometry, FACS)

- Anti-BrdU (B44) Pure (Qty: 2 ml), LOT: 6042756, BD BIOSCIENCES, CA, USA
- Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC Rabbit F(ab')₂ (Qty: 2 ml), REF: F0313, LOT: 20019828, DAKO, DK

2.1.3. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien entstammten dem Leibniz-Institut, der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ, Braunschweig, Deutschland – UPCI-SCC-154) und einer US-amerikanischen non-profit-Organisation und Zell-Bank, namentlich ATCC (American Type Culture Collection – Cal-27).

Die **Cal27 (ATCC: CRL-2095™, lot no. 62278082) Zelllinie** stammte von einem Plattenepithelkarzinom der Zunge eines 56-jährigen männlichen Kaukasiers. Es handelte sich um polygonale, epitheliale und daher adhärente Zellen mit einem stark granulierten Zytoplasma (Biosafety Level 1). Sie wiesen einen aneuploiden Karyotyp auf, waren zur Tumorgenese fähig und bildeten bei Beimpfung von nackten Mäusen innerhalb von 6 Wochen solide Tumore. Die nackte Maus steht als Synonym für die athymische Maus, die sich durch einen Entwicklungsdefekt des Thymusepithels auszeichnet (Thymusaplasie und Haarlosigkeit sind untrennbar verknüpft). Ein abnormales Haarwachstum und das Fehlen reifer T-Zellen mit Verlust der Zell-mediierter Immunantwort sind die Folge.

Die **UPCI-SCC-154 (DSMZ no.: ACC 669) Zelllinie** entstammte einem Plattenepithelkarzinom Grad 2 des Hypopharynx eines 54-jährigen männlichen Kaukasiers. Es handelte sich ebenfalls um adhärente Epithelien ähnliche Zellen. Im Gegensatz zur Cal27 Zelllinie lag hier eine Infektion mit Humanen Papillomaviren (HPV) vor. Diese konnte durch eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Onkogenetisch zeigten sich in der Zelllinie weder eine Amplifikation des Chromosomenanteils 11q13 noch Mutationen des TP53 (Tumor Protein 53).

Exemplarische Abbildung der Versuchszellen in Kultur in 10x bzw. 20x Vergrößerung:

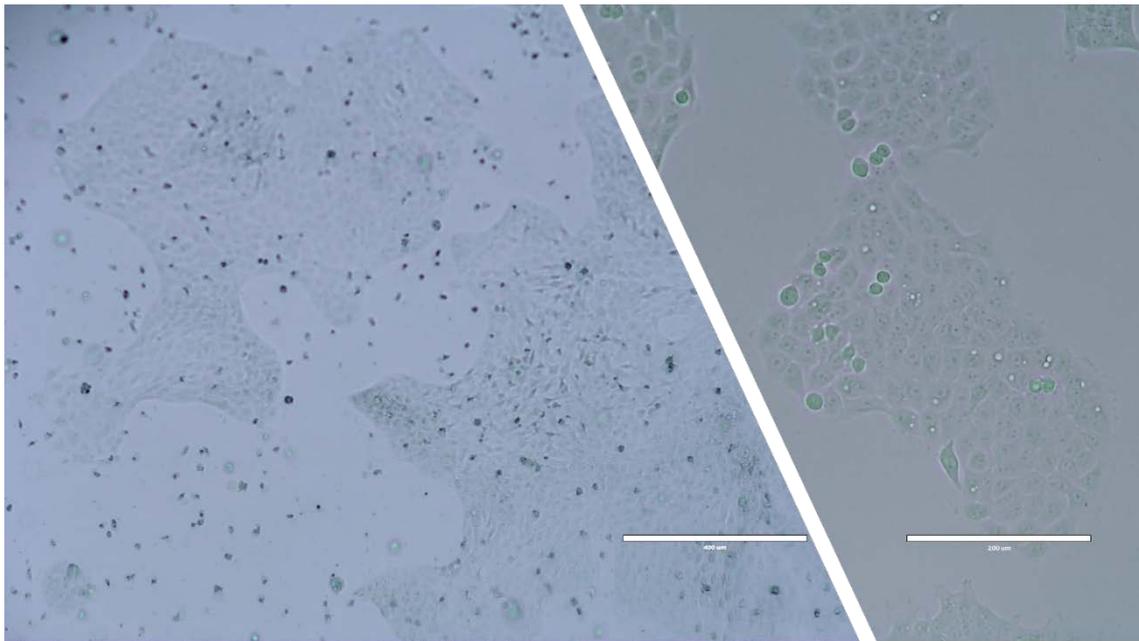


Abbildung 4 links: Cal-27 10x vergrößert in Kultur (Größenmaßstab 400 µm), Rechts: Cal-27 20x vergrößert in Kultur (Größenmaßstab 200 µm)

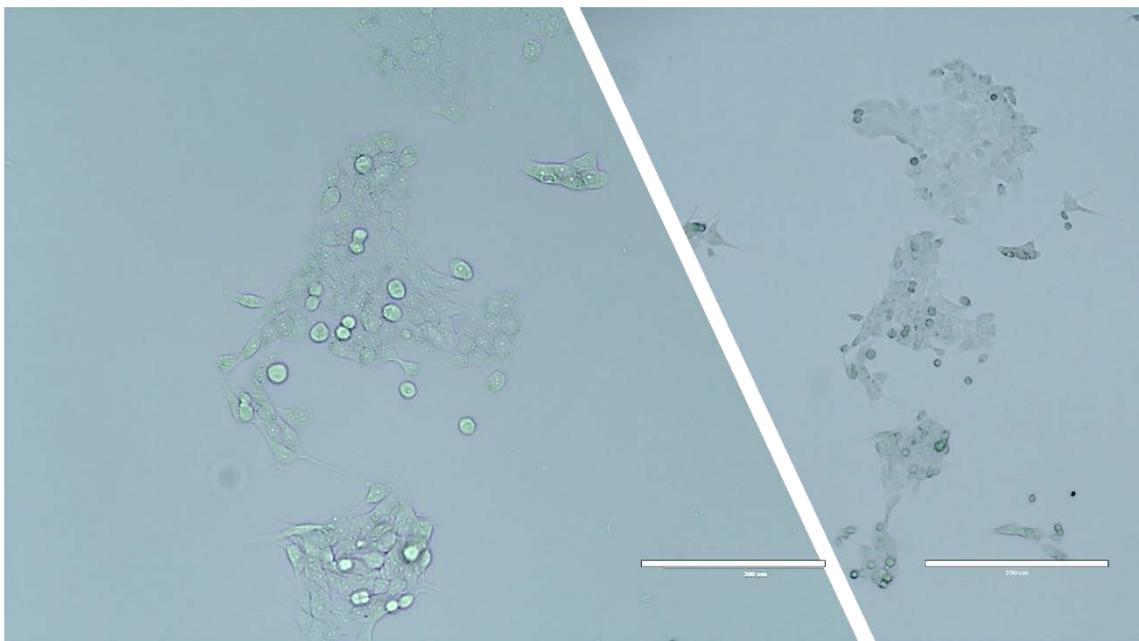


Abbildung 5 links: UPCI-SSC-154 20x vergrößert in Kultur (Größenmaßstab 200 µm), Rechts: UPCI-SSC-154 10x vergrößert in Kultur (Größenmaßstab 400 µm)

2.1.4. Verbrauchsmaterial

Cell Scraper groß & klein (Spatel für Zelllinien)

Pipettensatz, 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Eppendorf, Hamburg

1 ml, 1.5 ml und 2 ml Eppendorf-Tubes, Eppendorf, Hamburg

Deckgläschen

Einmalpipette 5 ml und 10 ml

Gelträger (NuPAGE 10 % Bis-Tris Gel), Life Technologies

PVDF-Membran

Blotpads („Schwämme“)

Objektträger Superfrost (Menzel)

Zentrifugationsküvetten

Filterpapier mit Aussparung

Metallklammern

Kulturflaschen Falcon

96-Well-Platten Falcon

6-Well-Platten Falcon

Petrischale 60 mm Falcon

25 mL Pipetten Falcon

10 mL Pipetten Falcon

5 mL Pipetten Falcon

2 mL Pipetten Falcon

1 mL Pipetten Falcon

50 mL Zentrifugenröhrchen Falcon

15 mL Zentrifugenröhrchen Falcon

0,22 µm Porenfilter VWR

20 mL Spritze

2.1.5. Geräte

8 Mehrkanalpipette Xplorer(15-300 µl), Eppendorf, Hamburg, GER

96 Well Platten Reader (Multiskan FC), Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Absauger BVC professional, VACUUBRAND, Wertheim, GER

BD FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, GER

Bio-Plex Pro™ Wash Station, Bio-Rad Laboratories, München, GER

Bio-Plex® Multiplex Immunoassay System, Bio-Rad Laboratories, München, GER

Centrifuge Kendro Sepatech Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, GER

Centrifuge Megafuge 1.0 R, Biofuge Primo R, Heraeus, Hanau, GER

CO₂-Brutschrank Heraeus, BBD 6220, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Invers-Mikroskop Olympus Life Science Solutions, Shinjuku, Tokyo, JPN

Kolbenhubpipette Reference 0,5 – 10 µl, Eppendorf, Hamburg, GER

Kolbenhubpipette Reference 10 – 100 µl, Eppendorf, Hamburg, GER

Kolbenhubpipette Reference 100 – 1000 µl, Eppendorf, Hamburg, GER

Kühlschrank Liebherr, Bulle, CHE

Lamina-Flow-Bank, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

myECL™ Imager, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Pierce Power Station (Blot) von Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Pipette Xplorer (15 – 300 µl) Eppendorf, Hamburg, GER

Pipette Xplorer (50 – 1000 µl) Eppendorf, Hamburg, GER

Pipettierhilfe Accu-Jet Hirschmann, Eberstadt, GER

Pipettus® Akku von Hirschmann, Eberstadt, GER

Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK

PTW Unidose Dosimeter, PTW Freiburg GmbH, Freiburg, GER

Rollenschüttler von Edmund Bühler, Bodelshausen, GER

Rüttler DELFIA PLATESHAKER Wallac, Turku, FIN

Schüttler Polymax 2040 (bei 4°C), Heidolph, Schwabach, GER

Stereomikroskop STEMI SV8, Carl Zeiss, Oberkochen, GER

Tank Transfer Unit, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK

Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, GER

Thermostat 5320 Eppendorf, Hamburg, GER

Unidose, PTW Freiburg GmbH, Freiburg, GER

Vortexer IKA, Staufen, GER

Wasserbad Köttermann-Labortechnik, Uetze, GER

XCell Blot Module, Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, California, USA

XCell Sure Lock (Elektrophorese-Kammer), Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, CA, USA

YXLON Maxishot mit 3 mm Beryllium Filter, Hamburg, GER

Zählkammer improved nach Neubauer, Optik Labor, Görlitz, GER

Zählkammer nach Neubauer mit Federklemmen, Optik Labor, Görlitz, GER

Zählkammer nach Neubauer, Marienfeld, Lauda-Königshofen, GER

Zeiss Axioimager 2i Fluorescence Microscope und ISIS Fluorescence Imaging System, MetaSystems, Altlußheim, GER

2.1.6. Datenverarbeitungsprogramme

BD CellQuest Pro Software, BD, Heidelberg, GER

EndNote X5.0.1 (Bld 5774) – 1988-2011 Thomson Reuters, New York, US

GIMP 2.8.4 (GNU Image Manipulation Program), Spencer Kimball, Peter Mattis
Mendeley Ltd, Registered trademark of Elsevier B.V., Amsterdam, NLD

GraphPad Prism 8, GraphPad, La Jolla, CA, USA

ImageJ 1.46r/Java 1.8.0_112, National Institutes of Health, USA

ISIS fluorescence imaging system, MetaSystems, Altussheim, GER

LogTag Analyzer & Access Library, LogTag Recorders, Auckland, NZL

SigmaPlot 14.0, Systat Software, Erkrath, GER

2.2. Methoden

2.2.1. Subkultivierung der Zellkultur und Anlage eines Versuchsansatzes

Die Methode dient grundsätzlich der standardisierten und optimierten Subkultivierung von Zellen und dem standardisierten Anlegen eines Versuchsansatzes.

Ziel der Methode ist es, Untersuchungszellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten und unter Erneuerung des Kulturmediums in frische Zellkulturbehältnisse zu transferieren oder die Zellen für Versuche bereitzustellen. Engmaschige lichtmikroskopische Sichtkontrollen, pH-Indikatoren (Phenolrot) und Vitalitätstestungen dienen der Überwachung. Dies ermöglicht die dauerhafte mitotische Zellteilung der Untersuchungszellen und die Gewinnung von exponentiell wachsendem, kontaminationsfreiem Untersuchungsmaterial (Vitalität $\geq 95\%$).

Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Für Cal27 wurde dazu DMEM Medium mit 10% FCS verwendet, wohingegen UPCI-SCC-154 Zellen mit EMEM, supplementiert mit 10% FCS, 2mM Glutamat sowie 1% MEM NEAA, kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen lag die Verdopplungszeit (VD) der Cal-27-Zellen bei 20-30 Stunden und für die UPCI-SCC-154 bei 25-35 Stunden.

Die Präparation von Adhäsionszellen (hier: Plattenepithelkarzinomzellen der Linien Cal-27 und UPCI-SSCC-154) für Versuchszwecke fand stets unter einer Sterilbank (Laminar Flow) statt. Die Adhäsionszellen wurden nach makroskopischer und mikroskopischer Sichtkontrolle der Kulturfläche zunächst mithilfe von 2ml Enzymlösung (Trypsin-EDTA) abgelöst. Je nach Zelllinie wurde die Zellkultur für 1 – 10 Minuten im Brutschrank inkubiert, um den enzymatischen Löseprozess zu beschleunigen. Nach mikroskopischer Kontrolle der Ablösung konnte die Enzymlösung durch im Medium enthaltenes Serum (10% FCS) inaktiviert werden. Zur vollständigen Entfernung wurde dieses durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand abgesogen und verworfen. Um die Zellzahl für die Subkultivierung zu bestimmen, wurden die Zellen des Pellet vereinzelt. Zu diesem Zweck wurde zunächst 1,0 mL Medium zugegeben und mit der Pipette homogenisiert. Anschließend wurde ein Aliquot für die Zellzählung entnommen und ausgezählt.

Die benötigte Zellzahl zur Subkultivierung (2×10^6 (Cal-27) oder 1×10^6 (UPCI-SCC-154) Zellen je Aussaat) wurde im vorgegebenen Verdünnungsverhältnis von ca. 1:5 alle 3 Tage geteilt. Dabei wurden die Zellen in frischem Medium (DMEM für Cal-27; EMEM für UPCI-SCC-154) auf neue Zellkulturflaschen (Falcon Kulturflaschen 25 cm²) übertragen, um optimales Wachstum zu gewährleisten.

Sofern die Zellen nicht für die Subkultivierung, sondern für einen Versuchsansatz umgesetzt wurden, wurde die zur Versuchsdurchführung benötigte Zellzahl nach der Auszählung in der Neubauer-Zählkammer entnommen und in frischem Medium für die jeweils angeforderte Verdünnung resuspendiert und erneut vereinzelt.

Versuchsansatz

Nach sowohl makroskopischer als auch mikroskopischer Sichtkontrolle der Kulturfläche wurde das Medium auf der Sterilbank abgesaugt und gespült. Nach Zugabe von 2 ml Enzymlösung (Trypsin-EDTA) zur Ablösung der Versuchszellen wurden die Zelllinien für 1 – 10 Minuten im Brutschrank inkubiert, um den enzymatischen Löseprozess zu beschleunigen (Cal-27: 2 min – UPCI-SCC-154: 10 min). Die Prozesskontrolle fand unter dem Lichtmikroskop statt. Es erfolgte die Inaktivierung mittels Zugabe des jeweiligen Kulturmediums mit 10 % FCS. Nach Abtrennung durch Zentrifugation wurde der Überstand abgesogen und verworfen. Das Zellpellet wurde homogenisiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die zur Versuchsdurchführung benötigte Zellzahl wurde entnommen und in frischem Medium für die jeweils angeforderte Verdünnung resuspendiert.

Vitalitätstestung

Als eine Methode zur Bestimmung der Zellvitalität bei einem unbekanntem Anteil vitaler Zellen innerhalb einer Zellkultur dient die Vitalitätstestung mittels Trypanblau. Die Methodik beruht auf der Intaktheit der Zellmembran vitaler Zellen, sodass der Farbstoff Trypanblau diese nicht durchdringen kann. Beschädigte oder zerstörte Zellmembranen werden durchdrungen und Proteinstrukturen im Inneren angefärbt, während vitale Zellen mit intakter Membran nicht angefärbt und sich somit hell darstellen. Die Auswertung muss aufgrund der Zytotoxizität von Trypanblau sofort durchgeführt werden, um ein valides Ergebnis zu erhalten.

Im vorliegenden Versuch wurde die Zellsuspension vor der Testung durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurden ca. 0,5 ml Suspension in ein Eppendorfggefäß (1,5 ml) überführt und erneut vereinzelt. 0,1 ml Zellsuspension wurden in ein separates Eppendorfggefäß mit 0,1 ml Trypanblau überführt und erneut gevortext. Nach 5-minütiger Inkubation konnte die Zählkammer mit 10 µl der inkubierten Trypanblau-Zellsuspension bestückt und mittels 10er Objektiv (100x absolute Vergrößerung) ausgezählt werden.

Auswertung

In Zellkulturen werden zur Auszählung von Zellen Zählkammern nach Neubauer verwendet (aufgrund der jeweiligen Zellgröße bei Körperzellen die Eckquadrate, vgl. bei Blutzellen die Mittelquadrate). Jede Seite eines Quadrates hat dabei die definierten Maße von 1 mm Länge bzw. Breite. Die Fläche beläuft sich somit auf 1mm². Bei Auflegen des Deckglases entsteht ein definierter dreidimensionaler Raum. Dieser liegt bei einer Kammertiefe von 0,1 mm bei 0,1 mm³, das entspricht 1 µl. Um die Anzahl von Zellen je ml zu erhalten, wird das Ergebnis der Auszählung mit 10⁴ multipliziert.

Die Berechnung der Vitalität erfolgte im vorliegenden Versuchsaufbau gemäß folgender Formel:

$$\text{Vitalität (\%)} = (\text{ungefärbte Zellen} \times 100) / (\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen})$$

2.2.2. Bestrahlung der Zellkulturen

Vor Verwendung der YXLON-Röntgenröhre (YXLON Maxishot 3 mm Beryllium Filter mit einer Plateau Dosis-Rate von 1 Gy/min bei 13 mA und 240 kV) ist nach längerer Standzeit (>24 Stunden) regelmäßig eine Eichung notwendig. Diese wurde im vorliegenden Versuch mit 260 kV und 13 mA durchgeführt, wobei die Dauer nach Anzahl der Stillstandstage variierte. Der Nullabgleich subtrahierte die natürliche Hintergrundstrahlung.

Nach Beendigung der Konditionierung wurden die Bestrahlungsversuche unter Einberechnung von Luftdruck und Temperatur durchgeführt. Die Versuchszellen wurden dabei 240 kV Röntgenstrahlung mittels MaxiShot System ausgesetzt, wobei über einen 3 mm Beryllium-Filter eine Plateau-Dosis von 1 Gy/min bei 13 mA erreicht wurde (~17mGy/s).

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Kontroll-Zellen während der Bestrahlung unter äquivalenten äußeren Bedingungen gelagert.

2.2.3. Klonierungstest – Adhäsionszellen

Die Koloniebildungsfähigkeit der Adhäsionszellen wird mittels Klonierungstests bestimmt. Es handelt sich dabei um eine Messung des Zellüberlebens, beispielsweise nach ionisierender Bestrahlung, und misst indirekt den klonogenen Zelltod.

Nach Anlage des Versuchsansatzes (vgl. 2.2.1) und Übertragung von 1 ml Zellsuspension mit 100 – 1000 Zellen/Well auf 6-Well-Platten in 4ml Medium inkubierten die Zellen nochmals für 24 h im Brutschrank, bevor sie zur Behandlung oder Bestrahlung verwendet wurden. Da die Aussaat unterschiedlicher Zellzahlen durch die steigende Strahlendosierung von 0 bis 6 Gy bedingt ist, dienten im vorliegenden Fall 100 Zellen je Well als Standard-Kontrolle ohne Bestrahlung bzw. bei 0,5 Gy. Um jedoch auch bei einer Dosis von 6 Gy die Möglichkeit eines Nachweises koloniebildungsfähiger Zellen zu haben, wurde die Zellzahl erhöht. Ausgesät wurden dabei bei 0 und 0,5 Gy 100 Zellen, 1 Gy mit 150 Zellen, 2 Gy mit 200 Zellen, 3 Gy mit 300 Zellen, 4 Gy mit 600 Zellen und 6 Gy mit 1000 Zellen. In der Auswertung wurde dies berücksichtigt. Unter laufender mikroskopischer Wachstumskontrolle wurden die Zellen nach 9 Tagen zum Abstoppen und zur Fixation aus dem Inkubator genommen. Das Nährmedium wurde abgesogen. Durch Spülung mit jeweils ca. 2 ml PBS wurden

die Mediumreste abgesogen. Anschließend fand eine zehnmütige Fixation mit 2 ml Ethanol (w(C₂H₅OH) =80 %) pro Well statt. Nach vollständiger Trocknung erfolgte die Färbung mittels 0,5 % Trypanblau. 1-2 ml des Farbstoffes wurde je Well zugegeben und nach 5-10 Minuten abgesogen. Anschließend wurde jedes Well doppelt mit 2 ml PBS gespült und die fixierten und gefärbten Zellen erneut getrocknet.

Auswertung

Die Plating Efficiency (PE) beschreibt den Prozentsatz der ausgesäten Zellen bei 0 Gy, die Kolonien bilden.

Alle Klone, die sichtbar mindestens 50 Zellen enthalten, wurden manuell am Stereomikroskop ausgezählt. Die Überlebensraten wurden auf einer logarithmischen Skala gegen die Bestrahlungsdosen auf einer linearen Skala aufgetragen. Die Experimente wurden jeweils vierfach durchgeführt.

Die Berechnungen von Plating Efficiency (PE) und Überlebensrate (Surviving Fraction/SF) der Klonierungstests wurden wie folgt durchgeführt:

$$PE = (\text{Kolonienzahl}) / (\text{Ausgesäte Zellen je Well}) \times 100$$

$$SF = (\text{Kolonienzahl}) / ((\text{Ausgesäte Zellen je Well}) \times (PE/100))$$

2.2.4. Herstellung eines Proteinlysats

Ziel der Methode ist die Herstellung eines gereinigten Proteinlysats zur weiteren Analytik mittels Proteinkonzentrationsmessung (BCA) oder semiquantitativer Proteinanalytik (Western Blot).

Grundlage des Verfahrens ist die Lyse der Zellen und Gewebe durch Verdauung der Zell- und Kernmembranen mit anschließender Auftrennung der freigesetzten Stoffe und Isolation der Proteine durch Zentrifugation. Diese setzt die dichteren Stoffe (Zellreste) als Pellet am Boden ab und löst die weniger dichten Stoffe (Proteine) im Überstand.

Vor Versuchsbeginn wurde der RIPA+ P-Puffer hergestellt, der regelmäßig zur Lyse von Zelle und Kern verwendet wird. Dazu wurde der RIPA-Puffer (1x) mit einem Protease/Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (100x) 1:100 versetzt. Dieser diente der Inaktivierung von in den Zellen enthaltenen und bei der Lyse freigesetzten Proteasen und Phosphatasen, welche anderweitig unreguliert Proteinstrukturen abbauen und die Untersuchungsergebnisse unbrauchbar machen würden.

Nach dem Entfernen des Zellmediums wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit eiskaltem RIPA+P versetzt (0,5 ml auf 60 mm Petrischale). Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Kulturfläche mit dem Cell-Scraper abgetragen und die Suspension in 2ml Eppendorfgefäße überführt.

Nach 30 Minuten bei 4°C im Schüttler konnte die Suspension gevortext und bei 4°C für 10 Minuten mit 14000xg zentrifugiert werden. Der Überstand, in dem sich die Proteine befinden, wurde abgenommen, ohne das Pellet zu lösen und in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Die Proben wurden zur sofortigen Auswertung im Western Blot verwendet oder für spätere Untersuchungen bei -80°C zur Konservierung eingefroren.

2.2.5. Messung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure

Ziel dieser Methode ist die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Messung der Absorption des ultravioletten und sichtbaren Lichts, das bei Strahlung einer spezifischen Wellenlänge (monochromatisch) und Anfangsintensität durch eine Probenlösung auftritt, stellt dabei die Grundlage des Photometrieprinzips dar. Detektiert wird dabei die Intensität des durch die Probe geleiteten Lichts an einer Photozelle über die sog. Transmission (Durchlässigkeit eines Mediums). Daraus wird ein Absorptionsspektrum gewonnen. Dieses ist abhängig von der Konzentration und den spezifischen Eigenschaften des Stoffes bzw. der Lösung, der Intensität und der Länge des Lichtweges. Die Methode basiert auf dem proportional zur Proteinkonzentration auftretenden Farbumschlag. Diesem detektierten Farbumschlag liegt die Reaktion von zwei Molekülen Bicinchoninsäure im alkalischen Milieu zugrunde, die mit freien Kupferionen (Cu^+) reagieren und stabile Komplexe bilden. Diese Verbindung dient als Grundlage für die Analyse von Proteinkonzentrationen mit der BCA-Methode (BCA – Bicinchoninic Acid), bei der Cu^{2+} mit Proteinen, genauer mit zwei Peptidbindungen, reagiert (Biuretreaktion). Dadurch wird ein stabiler Farbumschlag in Richtung dunkelviolett erreicht, der sich über einen ausgedehnten Bereich der steigenden Proteinkonzentrationen proportional zur Änderung der Farbintensität verhält. Der Farbumschlag ist mittels Plate Reader durch Absorptionsmessungen bei 562 nm Wellenlänge quantifizierbar [72].

Vor Versuchsansatz wurde zunächst der Rekonstitution Buffer 1:1 mit dH_2O verdünnt, um das Compatibility-Reagenz herzustellen. In einem zweiten Arbeitsschritt musste die BCA-Arbeitslösung angesetzt werden, eine 50:1 Verdünnung von Reagenz A und Reagenz B. Verwendet wurden 96-Well-Platten, in die je 9 μl RIPA-Puffer (sample control), Protein Std. oder Proben pipettiert wurden. Ergänzend wurde 4 μl Compatibility-Reagenz zugegeben, die Lösung bei Raumtemperatur (RT) eine Minute geschüttelt und anschließend für 15 Minuten (37°C) inkubiert.

Es wurden jeweils 260 μl BCA-Arbeitslösung je Well zugefügt, erneut auf dem Schüttler vermischt sowie inkubiert. Nach 5-minütigem Abkühlen konnte die Absorption bei 562 nm im Plate-Reader bestimmt werden.

2.2.6. Western Blot

Ziel des Versuchs ist die semiquantitative Darstellung von Einzelproteinen in Proteinlysaten aus Zelllinien bzw. Zellkulturüberständen mithilfe von Antikörpern. Grundlage ist die Auftrennung von Proteinen anhand ihres spezifischen Molekulargewichts und ihrer Ladung sowie der Membrantransfer und Detektion mithilfe Antikörper.

Verwendet wurden dazu im vorliegenden Versuch Erstantikörper, die gegen das gesuchte Antigen gerichtet sind, sowie HRP-gekoppelte Sekundärintikörper für eine chemilumineszente Detektion. Die Auftrennung basiert auf der unterschiedlichen Laufzeit der Proteine in einem Polyacrylamidgel (hier: NuPAGE™ Novex™ 4-12 % Bis-Tris-Proteingel) basierend auf Ladung und Größe. Dazu wurde an das Gel eine Spannung (hier 125 V) angelegt, um ein elektrisches Feld zu erzeugen, in dem negativ geladenen Moleküle von der Kathode zur Anode wandern. Durch einen im Probenpuffer enthaltenen Farbstoff - in diesem Falle Phenolrot - wurde die Probenbewegung kontrolliert (Size-/Weight-Marker, hier NuPAGE LDS Sample-Buffer 4x, THERMO FISHER). Anschließend wurden die Moleküle mittels Blotting auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert. Dort konnten sie mithilfe enzymgekoppelter Antikörper nachgewiesen werden (Chemilumineszenzverfahren). Aufgrund der Molekülmassen von GAPDH (36 kD) und hnRNP K (65 kD) wurde MOPS als Running Buffer verwendet (MOPS: 14-200 kD). Die Proben wurden durch den Versatz mit 5 µl des 4x Probenpuffers auf je 20 µl Proteinlysate (Konzentration von ca. 900 µg/ml bei Cal-27 sowie ca. 500 µg/ml für UPCI-SCC-154) vorbereitet. Diese Probenlösung wurde anschließend bei 72°C für 10 Minuten erhitzt.

Nach Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden die Proteinlysate in die Geltaschen eingebracht. Danach wurden 10µl Size Marker in den ersten Slot sowie jeweils knapp 20 µl der Probe in die übrigen Slots pipettiert und die Elektrophorese gestartet.

Nach Auftrennung der Proteine wurde das Gel in den Transferpuffer (Novex™ NuPAGE™ Transferpuffer) gelegt, um es der Plastikhülle zu entnehmen. Nachdem zwei Lagen in Transfer Buffer getränktes Filterpapier blasenfrei auf die positiv geladene untere Seite des Blotmoduls (Anode) gelegt wurden, konnte darauf eine in Methanol getränkte Polyvinylidendifluorid- Membran mithilfe einer Pinzette aufgelegt werden. Es folgten das Gel sowie zwei weitere in Transfer Buffer getränkte Lagen des Filterpapiers, bevor die Kassette mit dem oberen Blotmodul (Kathode) verschlossen wurde. Diese wurde in die Power Station eingelegt und das Blotting durchgeführt. Je nach

Molekülmasse bzw. Größe des gesuchten Antigens unterscheidet sich die Dauer deutlich (hnRNP K 65 kDA und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) 37 kDA hier 7 min). Nach dem Blotting wurde die PVDF-Membran entnommen und die Vorderseite markiert. Danach wurden die Membranen 30 Minuten in 3-5 % Milch-Phosphate Buffered Saline/Tween ((PBST) und 1x Phosphat Buffered Saline + 0,1 % Tween) auf dem Schüttler geblockt (PBST + 3-5 % Milchpulver Blotting grade). Freie, bindungsfähige Oberflächen werden so belegt, dass folgende Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingehen und weder in einem falsch positiven Nachweis noch einem störenden Hintergrundsignal resultieren. Grundlage ist, dass Antikörper nicht nur an ihrem spezifischen Antigen haften, sondern auch aufgrund von Struktur, Ladung oder Bindung der Proteine an den Antikörper selbst ungerichtet andere Strukturen binden. Diese unspezifische Bindungsfähigkeit soll durch Blockierung gezielt abgesättigt werden.

Die Probe wurde 2 x 5 Minuten mit PBST und anschließend 1 x 5 Minuten mit PBS auf dem Schüttler gewaschen, um die AK-Lösung nicht mit Milchproteinen zu kontaminieren. Der Primärantikörper wurde mit 10 ml PBST verdünnt. Die Membran wurde nun in einem 50ml Falcon-Tube bei 4°C in der Kühlkammer über Nacht auf dem Rollenschüttler (wenige Stunden bei RT) inkubiert, anschließend 2x jeweils für 5 Minuten mit PBST und 1x mit PBS auf dem Schüttler bei RT gewaschen. Die Verdünnung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte ebenfalls mit 10 ml PBST. Zur Detektion von GAPDH wurde ein bereits mit HRP konjugierter Primärantikörper verwendet, so dass die Inkubation mit einem Sekundärantikörper entfiel. Nach 2 Stunden Inkubation des Sekundärantikörpers auf dem Schüttler bei RT wurde erneut 2 x 5 Minuten mit PBST sowie 1x5 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe des Chemilumineszenz-Substrats, wobei 2 ml pro Membran zugegeben wurden (jeweils 1 ml Substrat A und 1 ml Substrat B (1:1)). Diese wurden zuvor lichtgeschützt gelagert. Auf der schwarzen Platte des Imagers wurden die Membran und die 4 ml des Chemilumineszenz Substrats für 1-2 Minuten bei RT inkubiert und anschließend auf die magnetische Filmschiene des Imagers gelegt.

Auswertung

Zur digitalen Filmaufnahme wurde der Thermo Scientific myECL™ Imager verwendet, nachdem er vor Versuchsbeginn auf seine Arbeitstemperatur von -25°C heruntergekühlt worden war.

Die Western Blot-Signale des untersuchten Zielproteins, hier hnRNP K, wurden durch den Thermo-Scientific-Imager detektiert und ausgegeben. Ebenfalls wurden die auftretenden Hintergrundsignale subtrahiert, die durch Verschmutzung von Membran oder magnetischer Filmschiene bzw. durch unspezifische Banden entstehen.

Anschließend wurden die Signale von hnRNP K gegen die Signale der GAPDH-Kontrolle normalisiert. Dies dient der Vergleichbarkeit zur Analyse der relativen Mengen des Zielproteins über den Blot hinweg, um biologische Unterschiede hinsichtlich der Proteinexpression zu untersuchen [73].

Anschließend wurden die gewonnenen Bilddaten in ImageJ eingepflegt und hinsichtlich ihrer Balkenintensität analysiert.

2.2.7. Immunfluoreszenzfärbung

Ziel dieses Verfahrens ist die Herstellung von Zellpräparaten für die immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Proteinen und Proteinkomplexen sowie des Aktinzytoskeletts. Dies ermöglicht die Bestimmung von Protein-Lokalisation und -Verteilung sowie eine Überprüfung von Umbauvorgängen des Aktinzytoskeletts. Die Grundlage der Immunfluoreszenzmikroskopie stellt die Erkennung der Proteine von Erstantikörpern (AK) dar, welche wiederum durch fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper gebunden werden. Es handelt sich hierbei um eine klassische Methodik zur spezifischen Antigenanalytik [74].

Das Aktinzytoskelett wurde durch fluoreszenzgekoppeltes Phalloidin nachgewiesen. Dieses geht mit hoher Affinität irreversible Bindungen mit polymerisierten Aktinfilamenten ein. DNA-Strukturen, beispielsweise der Zellkern, wurden mithilfe des interkalierenden DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) dargestellt. Solche Stoffe lagern in chemischen Verbindungen ein, ohne Strukturänderungen hervorzurufen oder ihre Eigenschaften zu verändern. DAPI legt sich dabei in die kleine Furche der DNA ein. Furchen sind auf der Außenseite der Doppelhelix befindliche Vertiefungen. Man unterscheidet zwischen kleinen und großen Furchen, die durch die glykosidischen Bindungen zwischen Base und Zuckerrest entstehen. Diese stehen sich nicht genau (180°), sondern etwas versetzt gegenüber (120° - 240°). Der DNA-Farbstoff DAPI emittiert spezifisch bei ca. 460 nm Wellenlänge blau. Dadurch wird eine Kopplung von Phalloidin (Alexa Fluor 488 – 525 nm) und dem hnRNP K AK (Texas Red – 605nm) ermöglicht und die parallele Darstellung aller Strukturen auf einer Abbildung bzw. in Zellen. Hierbei ist zu beachten, dass sowohl in der Färbung von Phalloidin (in Alexa Fluor) als auch hnRNP K (in Texas Red) ein geeigneter Sekundär-AK verwendet wird.

Die verwendeten Objektträger wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend jeweils 20 Minuten in eiskaltem Histofix/Formalin/PFA fixiert. Dies führte zum Tod der Zellen sowie zur Fixation durch Ausbildung kovalenter Bindungen. Es wurde erneut 2x je 5 Minuten mit reinem PBS gewaschen und danach für 1x 5 Minuten mit PBS + 0,2 % Triton-X versetzt, um die Zellmembran zu lysieren und einen Zugang für die Antikörper-Bindung zu schaffen. Folgend wurde 30 Minuten mit 500 μ l Blocker bei RT in der Dunkelkammer geblockt. Ergänzend kamen nochmals 500 μ l Erst-AK je Well (1 ml/Chamberslide) verdünnt mit Blocker hinzu (1:100). Nach 1 h Inkubation in der Dunkelkammer wurde erneut 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der

fluoreszenzmarkierte Zweit-AK (500 μ l/Well) kam in entsprechender Verdünnung hinzu (1:1000). Angeschlossen an 30 Minuten Inkubationszeit in der Dunkelkammer wurde die fluoreszenzgekoppelte Phalloidin-Färbung (1:40: 12,5 μ l) ergänzt und abermals für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurde 3x5 Minuten mit PBS (RT) gewaschen und die Objektträger mit Aqua dest. gespült, nachdem die Plastikaufsätze von den Chamberslides entfernt worden waren. Dies diente der Beseitigung möglicher PBS Reste, die sich angetrocknet als kristalline Strukturen negativ auf das Immunfluoreszenz-Bild auswirken könnten. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde der Objektträger mit wässrigem Eindeckmedium versetzt (z.B. DAPI 20-25 μ l zur Darstellung des Zellkerns) und mittels eines Deckglases abgeschlossen.

Die Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte an einem Zeiss AxioImager 2i Fluoreszenz Mikroskop (Carl Zeiss AG). Die Auswertung wurde mittels FOCI Analyse des ISIS Fluorescence Imaging System (MetaSystems) [75] vorgenommen.

2.2.8. Durchflusszytometrie (Flow Cytometry, FACS)

Ziel dieses automatisierten quantitativen Verfahrens ist es, Zellen anhand ihrer optischen Eigenschaften (Größe, Form, Struktur oder Färbung) zu analysieren. Das Probenmaterial, in diesem Fall in einer Suspension gelöste Malignomzellen, befindet sich in einem laminären Flüssigkeitsstrom bestehend aus einem stark verdünnten Probenstrom im Zentrum und einem umgebenden Hüllstrom, der die Zellen vereinzelt und bündelt (hydrodynamische Fokussierung). Der Flüssigkeitsstrom wird durch einen Mikrokanal in eine Glas-Küvette geleitet und von einem Laser bestrahlt. Dabei werden unterschiedliche Lichtwellenlängen emittiert: Fluoreszenzstrahlung (der von der Strahlung getroffene Partikel absorbiert die Strahlung, wird zur Schwingung angeregt und emittiert ein energetisch ärmeres Photon in einer charakteristischen Wellenlänge), Vorwärtsstreuung (FSC - besonders von Größe und Form des bestrahlten Partikels abhängig) und Seitwärtsstreuung (SSC - reflektiertes und gebrochenes Licht, zu einem geringen Anteil auch durch Beugungseffekte hervorgerufen, abhängig von Struktur der Partikeloberfläche, beispielsweise Granulierung). Die entstehende Fluoreszenz- oder Streustrahlung wird von einem Detektor ausgewertet und in quantitative Informationen umgesetzt.

Im vorliegenden Versuch wurde das BD BrdU FITC Assay sowie das zugehörige BD FACSCalibur-System und die BD CellQuest Pro Software (BD, Heidelberg, GER) verwendet. In unserer durchflusszytometrischen Untersuchung wurden Zellproliferation und deren Alteration nach Bestrahlung analysiert.

Dabei verwendeten wir ein Nukleosid-Analogen, das während der Synthesephase der DNA in diese eingebaut und mithilfe der Durchflusszytometrie durch eine Koppelung mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC nachgewiesen werden konnte.

Grundlage stellt das Bromdesoxyuridin (BrdU) dar, ein Pyrimidin-Analogen des Nukleosids Thymidin, das vom menschlichen Körper für die DNA-Synthese verwendet wird. Mithilfe des Nukleosids sowie von Propidiumiodid konnte die Quantität des Einbaus und damit die Transition durch die G2-Phase des Zellzyklus untersucht werden.

Zur Aufarbeitung der Zellkulturen wurde die Fixierung mittels Ethanol und Permeabilisierung durch Pepsin und 2N HCl gewählt. Dabei wurden die Zellen nach Inkubation mit BrdU in 80 % Ethanol resuspendiert und so über Nacht fixiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 300 g bei 4°C) sowie eine Resuspension der Zellen in 2 ml RNase-Lösung für 10 Minuten in einem 37°C Wasserbad. Nach erneuter

Zentrifugation - immer gefolgt vom Absaugen des Überstandes und anschließendem Vortexen - wurden die Zellen in 2 ml Pepsin-Lösung erneut 10 Minuten im Wasserbad inkubiert (nach 5 Minuten vortexen). Es folgte eine 5-minütige Lagerung in Eiswasser sowie eine Resuspension mit 2 ml 2N HCl für 10 Minuten bei RT nach erneuter Zentrifugation. Nach mehrfachem Waschen gefolgt von Zentrifugation zur Verdünnung und Entfernung des HCl wurde mit 200 µl Primär -Anti-BrdU-Antikörpern 30 Minuten bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren folgten 200 µl des Sekundär-Antikörpers Anti-Rb-M-AK - ebenfalls lichtgeschützt für 30 Minuten bei RT. Nach finaler Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde die Lösung in 250-500 µl Propidiumiodid-Lösung resuspendiert und mindestens 30 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Anschließend war eine FACS Messung möglich.

2.2.9. Knock-Down – siRNA Transfektion

Die Minderung der Genexpression einer oder mehrerer Zellen mittels Lipofektion ist das Ziel dieses Versuches. Die Lipofektion kann durch siRNA (RNAi) erfolgen, die komplementär zur transkribierten mRNA ist.

In diesem Versuch wurde mittels siRNA interferiert; dies hat die Bindung und den vorzeitigen Abbau der Ziel-mRNA zur Folge mit der Intention, die Expression spezifischer zellulärer Gene und somit selektiv die Translation von Proteinen zu verhindern. In unserem Fall wurde diese Methodik verwendet, um den Einfluss eines Knock-Down von hnRNP K auf das Überleben und die noch vorhandene Proteinmenge nach ionisierender Bestrahlung zu untersuchen. Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels Lipofektion durch den Einsatz des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 2000. Letzteres besteht aus überwiegend positiv geladenen Lipiden und bildet mit den negativ geladenen Nukleinsäuren der siRNA Komplexe. Diese lagern sich an die Zellmembran an und können mittels Endozytose ins Zytoplasma geschleust werden.

Im Versuchsaufbau wurden dazu 0,1 Mio. Zellen/60 mm Petrischale gelöst in 4,5ml Medium verwendet. Neben der unbehandelten Kontrolle wurden die Zellen mit Kombinationen aus Lipofectamin und der spezifischen siRNA oder dem Mock-Reagenz inkubiert. Diese wurden dann jeweils auf die 60 mm Petrischalen gegeben und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert (Wirkung des Knock-Down nach 24-48 Stunden). Nach Ablauf der 48 Stunden erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel mit integriertem

Waschvorgang. Die Wirkung des Knock-Downs hält für mindestens 5-7 Tage, somit ausreichend lang für unsere Versuchsreihen an.

Auswertung

Die Auswertung und gleichzeitige Verifikation erfolgte in diesem Versuch mittels Western Blot Verfahren, in dem vergleichend unsere beiden Zelllinien Cal-27 und UPCI-SCC-154 jeweils 48 Stunden nach siRNA und Mock Behandlung sowie die GAPDH Kontrolle dargestellt wurden.

Die Quantifizierung wurde äquivalent zur Auswertung und Statistik des Western Blot (siehe 2.8.) vorgenommen.

2.2.10. Bio-Plex Multiplex - Apoptose Immuno-Assay

Die Multiplex-Analytik stellt eine Form des ELISA-Immuno-Assays dar. Diese verwendet farbkodierte magnetische Beads, die wiederum Antikörper spezifisch binden, um mehrere Analyten in einem Experiment untersuchen zu können. Somit stellt das Verfahren ein ELISA-Derivat dar. Die Proben werden mittels Durchflusszytometrie gemessen, da die Beads aufgrund der spezifischen fluoreszierenden Farbkodierung eine unterschiedliche Signatur aufweisen [76].

In unseren beiden exemplarischen Zelllinien (Cal-27 und UPCI-SCC-154) wurde die Induktion der Apoptose 6 Stunden nach Bestrahlung mithilfe des Multiplex Immunoassays und dem zugehörigen Bio-Plex Pro™ RBM Apoptosis Panel 3 (Bio-Plex®, Bio-Rad Laboratories, München, GER) untersucht. Verwendet wurden dabei die Marker der intrinsisch induzierten Apoptose: Active Caspase-3, Bcl-xL/Bak Dimer, Mcl-1/Bak-Dimer und Survivin.

Der Versuch wurde gemäß dem Hersteller-Protokoll durchgeführt.

Nach der Präparation der Reagenzien mit destilliertem Wasser (dH₂O) und der Erwärmung auf RT folgte die Verdünnung der Standards gemäß Herstellerangaben. Zur Probenanalytik wurde die Proteinkonzentration standardisiert auf 500 µg/ml mittels Verdünnung durch Lyse-Puffer (lysis-dilution-buffer, LDB) eingestellt und anschließend bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend konnten die 96-Well-Platten präpariert werden. Ubiquitär wurden 10 µl Blocking-Puffer vorgelegt sowie 30 µl von Standard, Kontrolle oder Probe bzw. Blank hinzugefügt. Nach Vortexen der Beads wurden 10 µl zu allen Wells zugegeben. Auf die lichtgeschützte Inkubation auf

dem Schüttler (850 rpm für eine Stunde bei RT) folgte eine dreifach wiederholte Aufreinigung der Platten mit 100 µl Assay Puffer (Assay Buffer) in der BioPlex Pro Washing Station. Nach ausführlichem Vortexen wurden 40 µl Detektionsantikörper zu jedem Well zugegeben und ebenfalls für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 20 µl SA-PE (Streptavidin-PE in 1:10 Verdünnung) zugegeben und erneut unter gleichen Bedingungen für 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (3 x 100 µl) wurde in 100 µl Assay Puffer resuspendiert und für 30 Sekunden auf dem Schüttler gemischt. Nach Entfernen der Plattenversiegelung folgte die Messung am Multiplex-Reader nach Herstellervorgaben.

2.2.11. Statistische Datenanalyse

Für die statistische Auswertung der Klonierungstests wurde das Linear-Quadratic Model von Chadwick und Leenhouts für die Messung von Zelltod nach Bestrahlung mit der Dosis D herangezogen, dessen lineare Komponente (α) den Zelltod durch einen singulären direkten DNA-Schaden, dessen quadratischer Anteil (β) den Zelltod nach zwei DNA-Läsionen beschreibt [77]. Dieser initial vermutete Mechanismus wurde als unzutreffend beschrieben, daher bleibt der genaue strahlenbiologische Hintergrund bislang ungeklärt. Dennoch ermöglicht das Modell eine zutreffende Beschreibung von Zelltod nach Bestrahlung und ist als solches in der Auswertung von Klonierungstests allgemein anerkannt. Die α/β -Ratio wird dabei in Gy angegeben und beschreibt die Radiosensitivität der exponierten Zellen. Gemäß dem Modell für die Messung des Zelltodes bzw. Überlebens ($S=e^{-\alpha*D-\beta*D^2}$) wurden die Parameter α und β mittels nicht-linearer Regressionsanalyse in SigmaPlot berechnet.

Für die Berechnungen und die Analyse der verschiedenen Proteinexpressionslevel in Immunhistochemie, BrdU-FACS und Caspase-3 Multiplex-Versuchen verwendeten wir folgende Testverfahren: T-Test, Mann-Whitney-U-Test, One-Way oder Two-Way ANOVA sowie Dunn's multiple comparison post-test bzw. Bonferroni T-Test. Sofern verwendbar wurden GraphPad Software oder SigmaPlot angewandt (siehe Datenverarbeitungsprogramme).

Ein P-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Immunfluoreszenzgekoppelte HPV Verifikation von UPCI-SCC-154

Initial erfolgte die Verifikation von Cal-27 als nicht HPV-assoziierte und UPCI-SCC-154 als HPV-assoziierte HNSCC Zelllinie mittels immunhistochemischer p16INK4A Färbung (p16 als HPV Surrogatmarker) und Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 4). Angefärbt wurde neben p16 auch Phalloidin und DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol).

Phalloidin ermöglicht durch seine hohe Bindungsfähigkeit für Anteile des Zellzytoskeletts insbesondere an Aktinfilamente eine zuverlässige Darstellung der begrenzenden Strukturen der Zellen. DAPI hingegen bindet isoliert über Interkalierungen an AT-reiche Regionen in DNA und RNA. Bei der Bindung an DNA emittiert es Licht bei 461 nm (blau), wohingegen es bei RNA weniger stark fluoresziert (500 nm). DAPI dient somit der Darstellung von Zellkernen. Hier konnte sowohl in HPV-positiven als auch HPV-negativen Linien eine gute Färbung der Zellkerne sowie der Zellgrenzen erfolgen. Mit Blick auf die Alexa-Fluor- gekoppelte p16INK4A-Färbung konnte der Nachweis der p16 Proteins ausschließlich in den HPV-positiven HNSCC (UPCI-SCC-154) erfolgen. In Cal-27 war keinerlei Anfärbbarkeit gegeben. Zusammenfassend ließ sich ausschließlich p16INK4A in der UPCI-SCC-154-Linie darstellen (Abbildung 6).

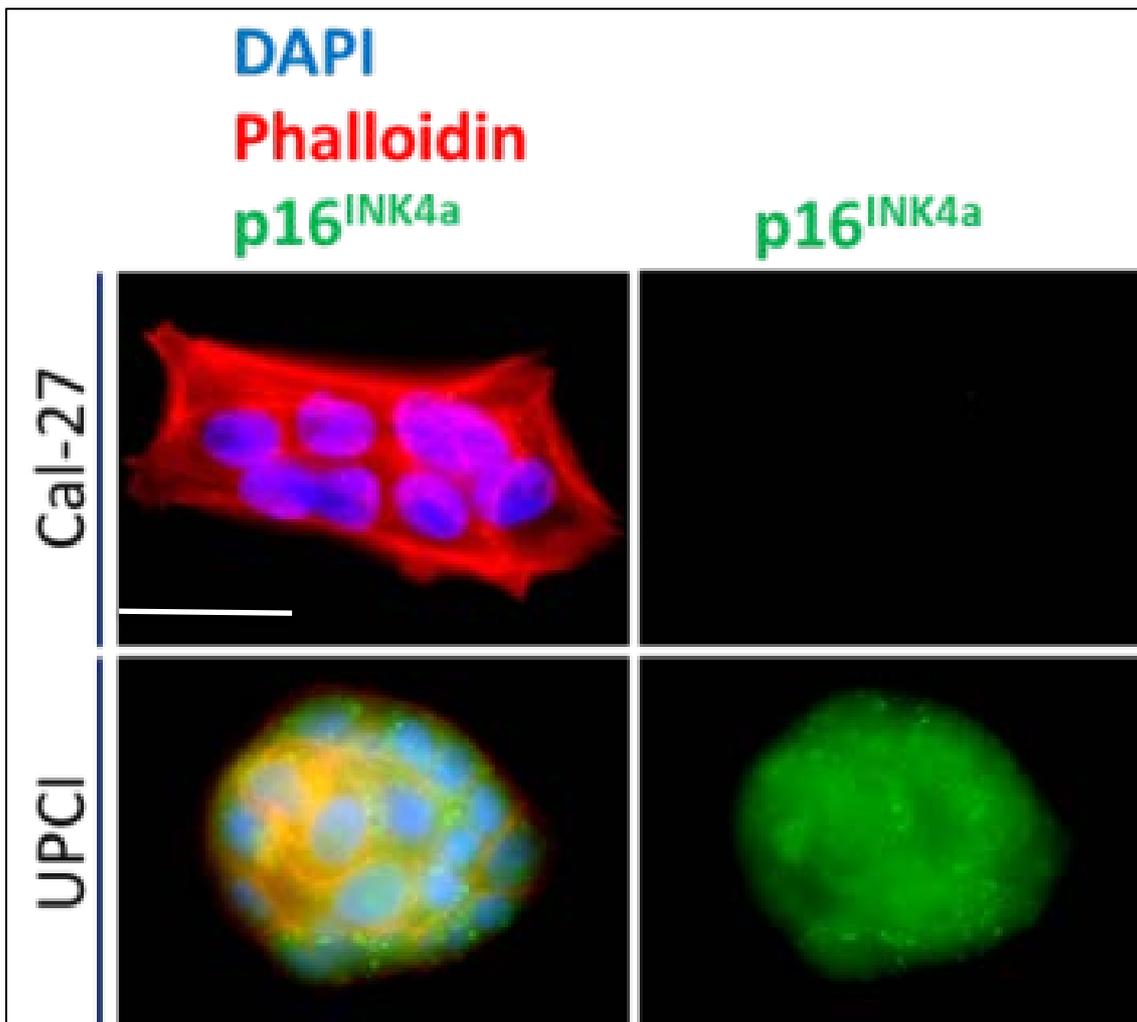


Abbildung 6 Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von HNSCC Zell-Clustern der Zelllinien Cal-27 und UPCI-SCC-154. Diese wurden jeweils nach DAPI (DNA-Nachweis - blau), Phalloidin (Aktin-Zytoskelett - rot) und p16^{INK4a} (HPV - grün) gefärbt (Spalte 1). In Spalte 2 zeigt sich dann die isolierte Darstellung von p16^{INK4a} in denselben Zellen zur Verifikation des HPV-Status von Cal-27 (negativ) und UPCI-SCC-154 (positiv). (Balken = 40 μ m)

3.2. HPV-positive HNSCC-Zelllinien zeigen erhöhte Strahlensensitivität

Im Klonierungstest untersuchten wir, ob sich die aktuelle Studienmeinung und klinische Beobachtung eines verbesserten Ansprechens von HPV-positiven HNSCC auf Strahlentherapie auch innerhalb unserer in-vitro-Versuche bestätigen lassen.

Dazu behandelten wir die beiden exemplarischen Zelllinien mit aufsteigenden Strahlendosen (0 Gy – 6 Gy), um das Überleben der Klone 7 Tage nach Strahlenexposition zu untersuchen. Dabei zeigten sich die HPV-assoziierten UPCI-SCC-154 Zellen radiosensitiver als die HPV-negativen Cal-27 Zellen. Indiziert wurde dies durch die rapide Abnahme des klonogenen Überlebens (Clonogenic Survival) mit steigender Dosis der Bestrahlung (7).

Die Zelllinien sprachen bereits bei der klinisch relevanten Strahlendosis von 2 Gy signifikant stärker auf die Bestrahlung an. Bei der HPV-positiven Zelllinie war eine stärkere Reduktion der Klonierungsfähigkeit als bei der nicht virusinfizierten Zelllinie erkennbar. Die Reduktion des klonogenen Überlebens wurde bei steigender Dosierung weiter aggraviert und wies bei 4 Gy eine Klonierungsfähigkeit von ca. 7% auf. In Cal-27 konnten wir eine äquivalente Klonierungsfähigkeit erst nach der Exposition mit 6 Gy feststellen. Bei einer Strahlendosis von 6 Gy ging der UPCI-SCC-154-Zelllinie die Klonogenität vollständig verloren.

Im Linear-Quadratischen Modell (Linear-Quadratic Model) für das Zellüberleben nach Chadwick und Leenhouts mit Linear (α) und Quadratic (β) können Konstanten für die Dosis-Effekt-Kurven der Klonogenität ermittelt werden (0.997 für Cal-27 und 0.989 für UPCI-SCC-154) [77]. Die resultierende α/β -Ratio [Gy] für die UPCI-SCC-154 Zellen zeigte sich mit 6.39 Gy (0.5164/0.0808) niedriger als in der verglichenen Cal-27 Linie mit 23.63 Gy (0.4395/0.0186). Diese Ergebnisse bestätigten eine erhöhte Strahlensensitivität und eine geminderte fraktionierte Sensitivität bei HPV-assoziierten HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu den nicht HPV-assoziierten Cal-27.

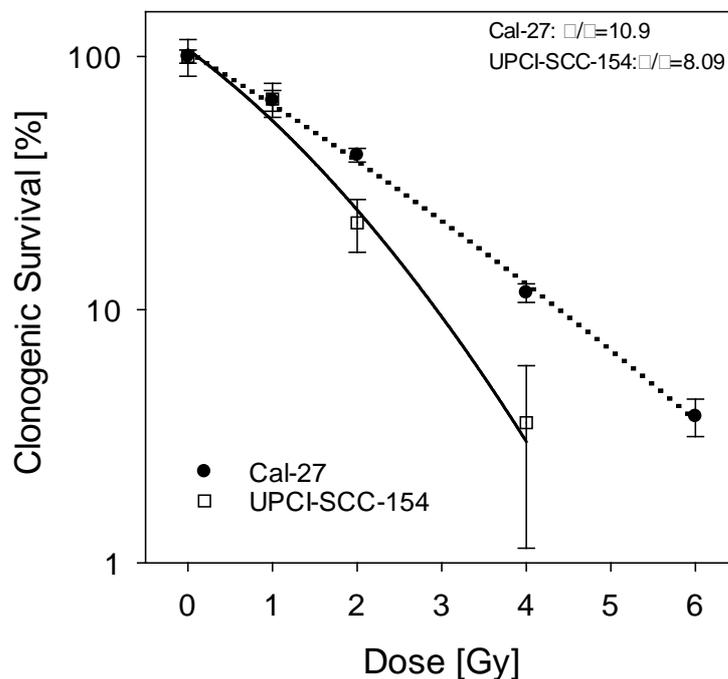


Abbildung 7 Klonierungstest der HNSCC Zelllinien Cal-27 (gepunktete Linie) und UPCI-SCC-154 (durchgezogene Linie) bei Bestrahlungsdosen von 0 – 6 Gy (n=4). Auf der Y-Achse aufgetragen ist dabei das klonogene Überleben in Prozent [%]. Auf der X-Achse die Bestrahlungsdosis in Gray [Gy]. Ausgesät wurden dabei je nach Bestrahlungsdosis unterschiedliche Zellzahlen je Well (0 und 0,5 Gy mit 100 Zellen, 1 Gy mit 150 Zellen, 2 Gy mit 200 Zellen, 3 Gy mit 300 Zellen, 4 Gy mit 600 Zellen und 6 Gy mit 1000 Zellen). Ab einer Dosis von 2 Gy ließ sich ein signifikanter Unterschied der Linien darstellen mit einem verbesserten Ansprechen auf Seite der HPV positiven UPCI-SCC-154. Die Klonalitätsminderung welche Cal-27 nach 6 Gy Bestrahlung aufwies, zeigte sich in UPCI-SCC-154 bereits nach 4 Gy. Bei 6 Gy konnte keine Klonierungsfähigkeit mehr dargestellt werden. Dargestellt ist die Klonogenität nach 9 Tagen Inkubation. Die hier präsentierten Daten entsprechen einem gemittelten SD von 4 unabhängigen Versuchen.

3.3. Expressionszunahme von hnRNP K in HNSCC-Zelllinien nach Bestrahlung

Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass eine akute Exposition der HNSCC-Zelllinien mit einer singulären, unfraktionierten Strahlendosis von 2 Gy in beiden Linien zu einem Anstieg der zellulären hnRNP K-Konzentration führte. Dabei konnte nach Bestrahlung ein Maximum der Proteinkonzentration zwischen 0,5 h (Cal-27) und 1 h (UPCI-SCC-154) beobachtet werden. Nach 24 h erreichten beide Zelllinien erneut das Initialniveau wie vor der Behandlung (Abbildung 8). Diese Rückkehr zeigte sich in Cal-27 mit einem deutlichen Expressionsrückgang bereits nach 60 Minuten mit einem Abflachen der Kurve im 3- bzw. 6-Stunden-Intervall. In UPCI-SCC-154 ließ sich ein Plateau der hnRNP K Expression nach dem Maximum bei 30 Minuten bis über 3 Stunden nach Bestrahlung beschreiben. Die Expression ging nach 6 Stunden deutlich zurück und erreichte wie Cal-27 nach 24 Stunden wieder das Ausgangsniveau der hnRNP K Expression.

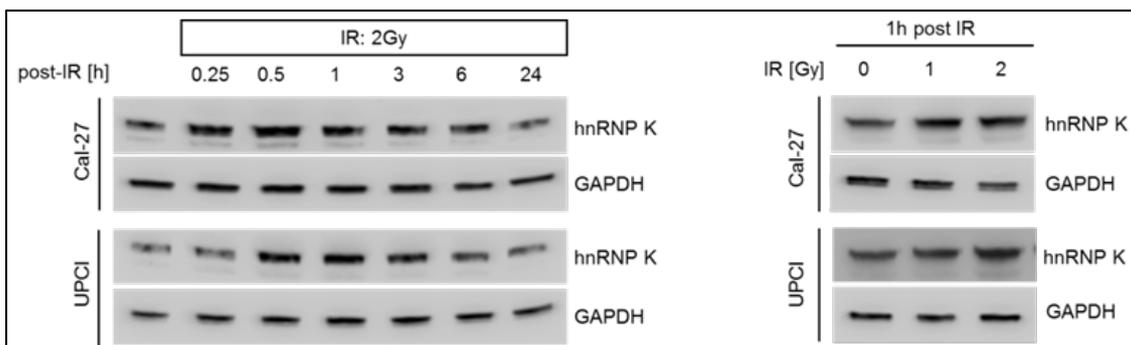


Abbildung 8 Links: Zeit-abhängiger Immunoblot der Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) mit Nachweis einer strahleninduzierten Expressionszunahme zellulären hnRNP Ks mit einem Maximum 30 Minuten nach Bestrahlung und einem Expressionsrückgang auf das Ausgangsniveau innerhalb von 24 Stunden. Rechts: Dosis-abhängiger Immunoblot der Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) mit Akkumulation von zellulärem hnRNP K 1 Stunde nach Bestrahlung (0 – 2 Gy).

Dieser Effekt präsentierte sich dosisabhängig. Die Analyse ergab, dass nach Bestrahlungen in unterschiedlichen Dosen (Abbildung 8) eine Stunde nach dem Strahlenereignis das Maximum der Expression bei 2 Gy Strahlendosis erreicht wurde. Die zelluläre hnRNP K-Expression verweilte auf Baseline-Niveau, sofern die Strahlendosierung 2 Gy überstieg (nicht gezeigt).

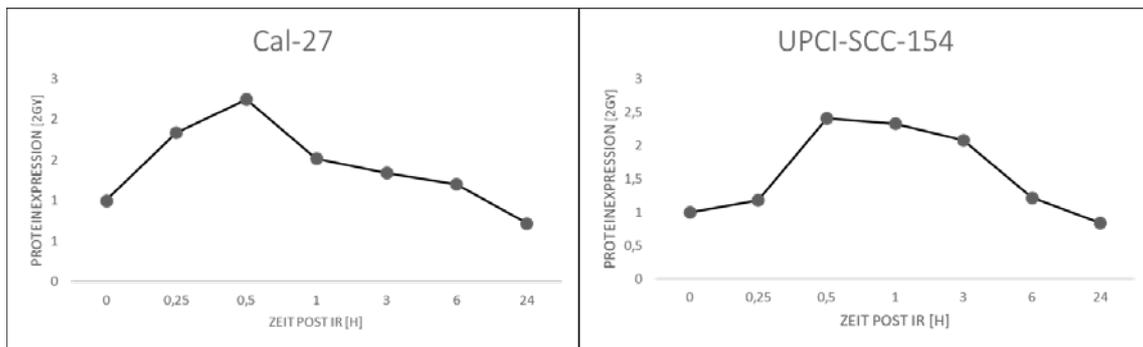


Abbildung 9 Densitometrische Bestimmung der hnRNP K Proteinexpression im Immunoblot.

Links: Zeit-abhängige (X-Achse) Analyse der Proteinexpression (Y-Achse) bei Cal-27 (HPV negativ). Auf einen raschen Anstieg der hnRNP K Expression mit Expressionsmaximum (ca. x 2.5) 30 Minuten nach Bestrahlung (2 Gy) folgt ein erst steiler Rückgang, dann abflachend. Nach 6 - 24 Stunden wurde das Ausgangsniveau erreicht.

Rechts: Zeit-abhängige Analyse (X-Achse) der Proteinexpression (Y-Achse) des Immunoblots bei UPCI-SCC-154 (HPV positiv). Es zeigte sich nach Strahlenexposition ein initial steiler Anstieg der hnRNP K Expression mit Expressionsmaximum (ca. x 2.5) bei 30 Minuten. Die Expression zeigte eine Plateaubildung und verbleibt bis 60 Minuten nach Exposition auf einem nahezu konstanten Niveau und fällt im Verlauf zunehmend schnell ab, bis das Ausgangsniveau ca. 24 Stunden nach IR erreicht wird.

3.4. hnRNP K Expressionszunahme und zytoplasmatischer Verschiebung

Um Veränderungen der hnRNP K Expression näher zu analysieren, führten wir dynamische Immunfluoreszenz-Untersuchungen der beiden Zelllinien durch, in denen wir die subzelluläre Lokalisation vor und 1 Stunde nach Bestrahlung verglichen (Abbildung 9, Abbildung 10). Die applizierte Dosis von 2 Gy ist der klinischen Realität am nächsten (klinisch werden Bestrahlungsdosen fraktioniert und als 1-3 Gy 5x/Woche appliziert); auch in unseren Untersuchungen entspricht sie der Dosis, die die stärkste hnRNP K-Expression hervorrufen konnte. Nach Färbung der Präparate mit DAPI und Phalloidin zur Darstellung des Zellkerns sowie des Zytoskeletts zeigte sich keine Beeinflussung von DNA und des Aktin-Zytoskeletts nach Bestrahlung. Jedoch reagierten beide Zelllinien mit einer Erhöhung der Konzentration von hnRNP K, sowie mit einer Umverteilung von hnRNP K innerhalb der Zelle zu Gunsten des Zytoplasmas. In Bezug auf die basale Expression von hnRNP K der beiden Zelllinien zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied bei 0 Gy (unbestrahlt); dadurch konnten die Ergebnisse aus dem Western Blot bestätigt werden.

Zusammenfassend lassen sich die post-radiogen beobachteten Veränderungen im Sinne einer hnRNP K-Mehrexpression und der intrazellulären Umverteilung zu Gunsten des Zellzytoplasma in vergleichbarer Weise in beiden untersuchten HNSCC-Zelllinien unabhängig von ihrem HPV-Status nachweisen.

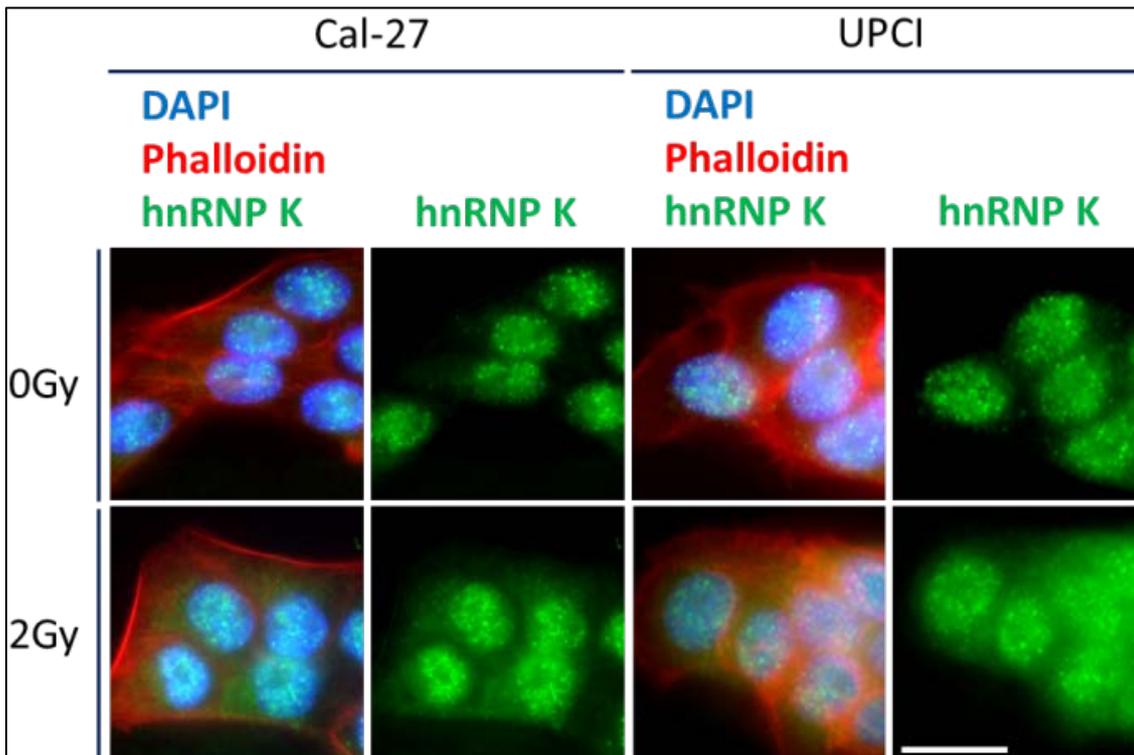


Abbildung 10 Immunfluoreszenzmikroskopie der HNSCC Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) (Zeile 1). Die Exemplarische Darstellung der IHC Färbung (DAPI=blau, Phalloidin=rot, hnRNP K=grün) (Zeile 2) zeigt eine gemeinsame Darstellung aller Färbungen in Spalte 2 und 4, sowie eine isolierte Darstellung von hnRNP K in den Zeilen 3 und 5 mit einer zytoplasmatischen Akkumulation von hnRNP K 1 Stunde nach Bestrahlung (Spalte 1) der Zellen mit 2 Gy. Dieser Effekt lässt sich in der HPV positiven Zelllinie nochmals deutlicher nachweisen, wobei statistische Signifikanz verfehlt wird. (Balken = 20 μ m).

3.5. Verifikation des transienten Knock-Down in HNSCC-Zelllinien

Zur Differenzierung der funktionellen Konsequenzen einer hnRNP K-Reduktion für die Radiosensitivität der HNSCC Zelllinien wurden Knock-Down Versuche durchgeführt, die auf der translational siRNA-vermittelten hnRNP K-Reduktion basieren. UPCI-SCC-154 und Cal-27 wurden mittels Lipofektion mit gegen hnRNP K-gerichtete siRNA transfiziert [78]. Es handelt sich dabei um eine Lipid-basierte Transfektionsmethode, bei der Nukleinsäuren mit Liposomen kombiniert werden. Nach Aufnahme dieser sog. Lipoplexe mittels Endozytose kommt es zur Freisetzung der siRNA im Zytoplasma der HNSCC Zellen. Die siRNA bildet eine komplementäre Bindung an hnRNP K-mRNA, unterbindet so die originäre Funktion und führt zur Induktion des mRNA-Abbaus. Die Effektivität unseres siRNA-medierten Knock-Downs konnte mittels Immunoblot in beiden Zelllinien demonstriert werden (Abbildung 11). So zeigte sich in der jeweiligen Untersuchung unter Transfektion der Kontrollsubstanz (Mock) eine regelgerechte Expression von hnRNP K. Mittels RNAi konnte eine signifikante Reduktion der hnRNP

K-Expression in beiden HNSCC Linien gleichermaßen beobachtet werden. Eine Western Blot-basierte Expressionsmessung von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurde zur Überprüfung der biochemischen Selektivität sowie als Ladekontrolle des Knock-Downs durchgeführt. GAPDH ist ein Protein, das durch seine enzymatische Katalysatorfunktion innerhalb der Glykolyse einen essenziellen zellulären Stellenwert besitzt und daher - klassisch für ein Housekeeping-Protein- ubiquitär stabil exprimiert wird [79]. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Knock-Down von hnRNP K keinen signifikanten Effekt auf die Expression von GAPDH aufwies. Im Western Blot konnte somit ein erfolgreicher Knock-Down von hnRNP K in den Zielzellen dargestellt werden.

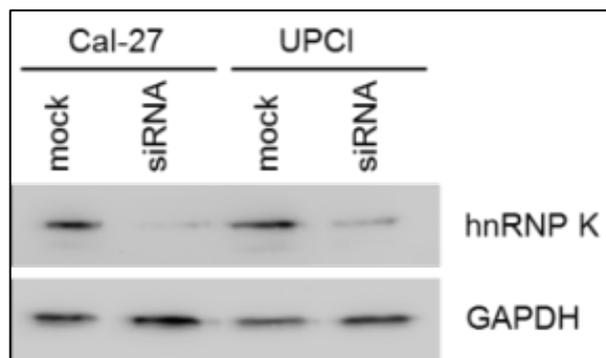


Abbildung 11 Western Blot der Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) zur Verifikation eines effektiven hnRNP K-Knock Downs mittels transienter siRNA Transfektion im Vergleich zur Kontrolle (Mock). Als Kontrolle dient dabei das Protein GAPDH das, als Katalysator der Glykolyse, ubiquitär exprimiert wird.

3.6. hnRNP K Knock-Down führt zu Terminierung der Klonierungsfähigkeit

In der Untersuchung des klonogenen Überlebens nach Knock-Down von hnRNP K zeigte sich in beiden Malignom-Zelllinien eine nahezu vollständige Aufhebung der Klonierungsfähigkeit (Abbildung 12, Abbildung 13). Damit erwies sie sich als unabhängig vom jeweiligen HPV-Status der Mund- und Rachenraumkarzinomzellen. Eine ergänzende Bestrahlung konnte nach Knock-Down somit keinen Strahleneffekt mehr zeigen.

Eine Reduktion der Klonogenität wurde durch eine Bestrahlung (2 Gy) in der Mock-Kontrollgruppe erreicht.

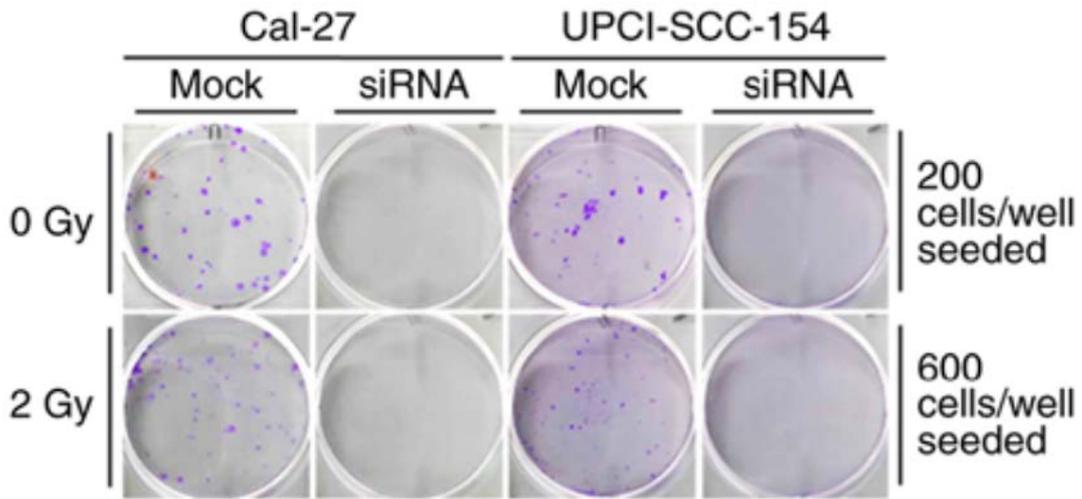


Abbildung 12 Repräsentative Abbildung des Klonierungstests mit 9 Tagen Inkubation nach Bestrahlung sowie hnRNP K Transfektion. Vergleichend werden hier dargestellt: die Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) jeweils mit 0 Gy und 2 Gy Bestrahlung sowie mit durchgeführtem Knock-Down Versuch von hnRNP K in Mock-Kontrolle und in erfolgter Proteinreduktion (siRNA).

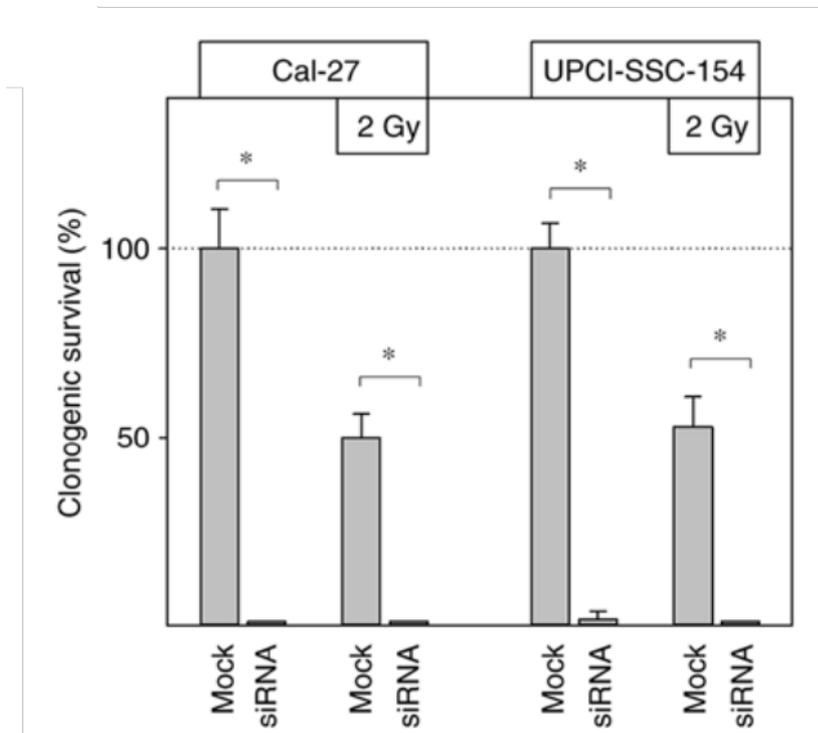


Abbildung 13 Klonierungstest der HNSCC Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) mit Knock-Down (siRNA) sowie gegen die Kontrolle ohne Transfektion (Mock). Auf der Y-Achse aufgetragen ist dabei das klonogene Überleben der Zellen in Prozent [%]. Auf der X-Achse aufgetragen sind zum einen die Mock-Kontrolle und der siRNA Knock-Down sowie die beiden verglichenen Zelllinien, beginnend mit Cal-27, folgend UPCI-SCC-154. $n = 4$, $*p < 0.05$ (Kruskal Wallis Test, Tukey's Post Hoc Test)

3.7. hnRNP K-Knock-Down ohne Einfluss auf Zellzyklusprogression

Der Zellzyklus ist eine Abfolge aufeinander aufbauender Aktivitäts- und Entwicklungsphasen in einer Zelle mit dem Ziel der Teilung. Dazu muss im Vorfeld die DNA der Zelle verdoppelt werden, um in der Mitose auf zwei Tochterzellen verteilt werden zu können. Malignomzellen weisen oft einen unkontrollierten Zellzyklus auf, bei dem sich die entarteten Zellen unabhängig eines Stimulus (WF) teilen.

Die dargestellte geminderte Klonierungsfähigkeit der UPCI-SCC-154-Zellen bei Bestrahlung soll durch diese Untersuchung näher spezifiziert werden. So soll differenziert werden, ob Bestrahlung bzw. siRNA-Transfektion zu einem Arrest innerhalb des Zellzyklus führen. Dieser Arrest würde per FACS-Analyse durch eine Akkumulation von Zellen nach Behandlung in einer bestimmten Phase des Zyklus sichtbar (Abbildung 14) gemacht.

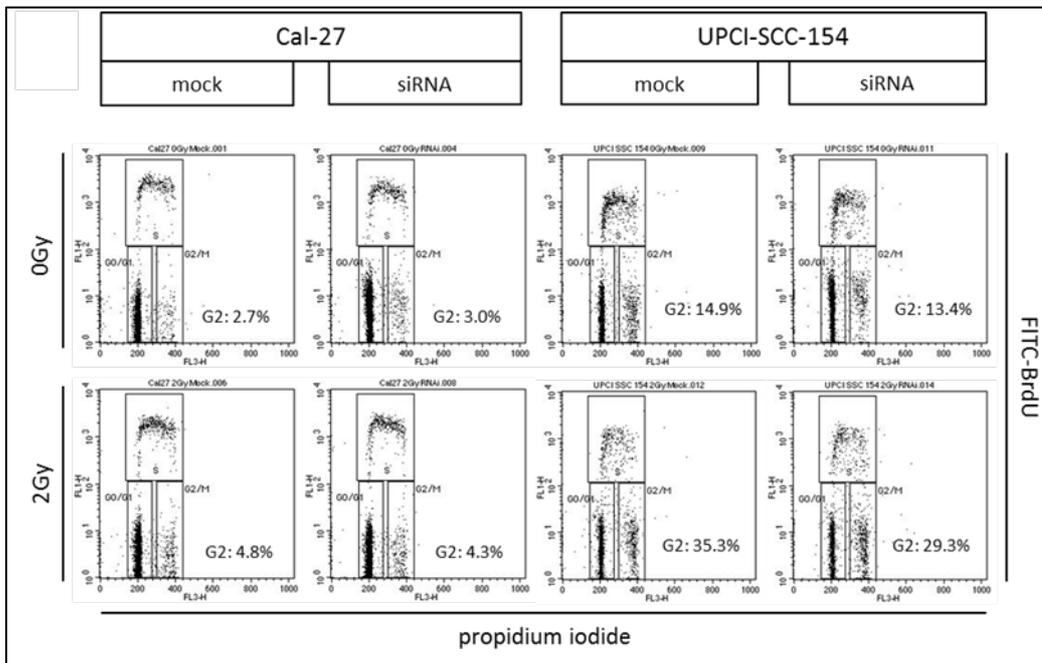


Abbildung 14 Analyse der Zellzyklusprogression mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von FITC-BrdU und Propidium-Iodid (PI)-Markierung. Wir untersuchten dabei die Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv), jeweils unter Bestrahlung (2 Gy) sowie ohne Bestrahlung. Parallel evaluiert wurde der Effekt eines siRNA medierten transienten hnRNP K Knock-Downs, verglichen mit der Mock-Kontrolle. Es zeigte sich dabei keine signifikante Veränderung der G2 Phase Verzögerung zwischen hnRNP K Knock-Down und der Kontrollgruppe. In der HPV positiven Linie zeigte sich jedoch eine deutliche Zunahme der G2 Phase Zellen nach Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe, dieser Effekt war mit und ohne Knock-Down zu beobachten.

In der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus zeigte sich eine heterogene Verteilung der untersuchten HPV-positiven bzw. -negativen Zellen innerhalb der Phasen des Zellzyklus. Insbesondere in der Cal-27-Linie liegt der Schwerpunkt in der G1-Phase (Gap 1: postmitotische Phase vor DNA-Synthese, in dieser Phase werden die

Bestandteile der Zelle vermehrt (z.B. Organellen, mRNA, Zytoplasma)). Hier befinden sich 75,7% der nachgewiesenen Zellen innerhalb des Zellzyklus. Betrachtet man hingegen die UPCI-SCC-154 Linie, befindet sich ebenfalls ein großer Anteil der Zellen in der G1-Phase, jedoch mit einer breiteren Verteilung zugunsten der übrigen Phasen des Zellzyklus. In der G1-Phase befinden sich hingegen nur 47,56% der Zellen. Werden die Zelllinien bestrahlt, kommt es in Cal-27 zu einer Reduktion der G1-Phase-Zellen (72,88%), signifikante Differenzen können jedoch nicht nachgewiesen werden. Andererseits konnte in UPCI-SCC-154 eine Reduktion der G1 Phase-Zellen auf 27,62% beobachtet werden. Mit Blick auf die transfizierten Zellen zeigt sich, dass der Verlust von hnRNP K in der Cal-27-Zelllinie zu einem Anstieg der G1-Phase-Zellen (82,52%) führt. In der HPV-positiven Linie bleibt hingegen die G1 Phase nahezu unverändert (45,59%). Kombiniert man Bestrahlung und Knock-Down, liegen die HPV-negativen Cal-27 bei 76,36% und die UPCI-SCC-154-Zellen bei 27,89%. Somit weisen beide Zelllinien eine nicht-signifikante Reduktion der Zellen in der G1 Phase auf (Abbildung 15).

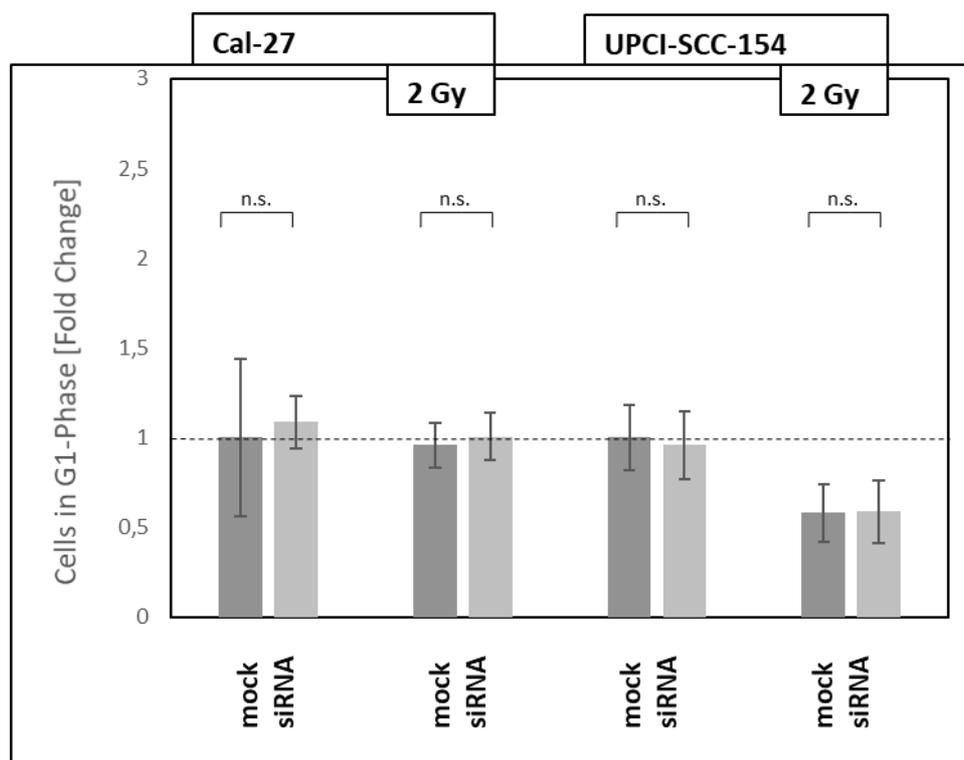


Abbildung 15 Auswertung der Zellen in der G1 Phase im Vergleich zwischen unseren untersuchten Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) jeweils mit Bestrahlung (2 Gy) oder ohne Bestrahlung. Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss eines hnRNP K Knock-Down mittels siRNA Transfektion. Ein Knock-Down des zellulären hnRNP K zeigte in unserer Untersuchung in beiden Zelllinien keine signifikanten Veränderungen in der G1-Phase im Vergleich zur Mock Transfektion (Kontrolle) (n.s.=nicht signifikant; $p < 0.05$; $n \geq 3$).

In der S-Phase (Synthesephase, DNA-Replikation) kann keine signifikante Differenz zwischen den untersuchten Zelllinien aufgezeigt werden. Cal-27 weist eine konstante Verteilung in der S-Phase auf (11,02%), die von Bestrahlung (6,98%), isoliertem hnRNP K-Knock-Down (10,23%) und der Kombination aus beiden (8,94%) geringer beeinflusst wird als die UPCI-SCC-154-Linie. In Letzterer zeigt sich eine weniger homogene Verteilung innerhalb der S-Phase (9,70%), die nach Bestrahlung (8,66%) nochmals an Schärfe verliert und die Zellzahl in der S-Phase ausgedünnt wird. Die Reduktion von hnRNP K (12,25%) sowie eine Kombination der Behandlungen (10,19%) haben keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung im Zellzyklus (Abbildung 16).

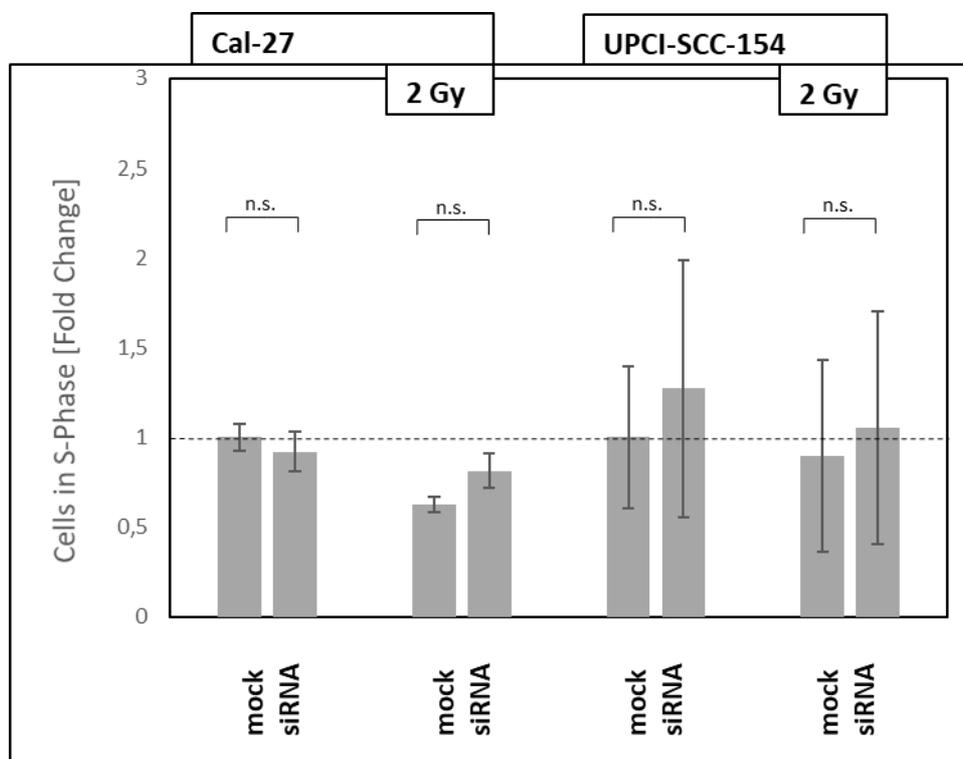


Abbildung 16 Auswertung der S-Phase im Vergleich zwischen den untersuchten Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) jeweils mit Bestrahlung (2 Gy) oder ohne Bestrahlung. Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss eines hnRNP K Knock-Down mittels siRNA-vermittelten Transfektion. Ein Knock-Down des zellulären hnRNP K zeigte in unserer Untersuchung in beiden Zelllinien keine signifikanten Veränderungen in der S-Phase im Vergleich zur Mock Transfektion (Kontrolle) (n.s.=nicht signifikant; $p < 0.05$; $n \geq 3$)

In der Betrachtung der G2/M-Phase (Gap 2: Postsynthese, Prämitose, Vorbereitung der Zellteilung, Proteinsynthese, Volumenzunahme der Zelle, M: Mitosephase: Teilung von Chromosomen, Zellkern und Zytoplasma) wird deutlich, dass beide untersuchten Zelllinien auf die Bestrahlung mit 2 Gy ansprechen und eine Umverteilung innerhalb des Zellzyklus zugunsten der G2/M-Phase auf (Cal-27 2,7%, bei 0 Gy zu 4,8% bei 2 Gy) (Abbildung 17) stattfindet. Dies ist insbesondere in den HPV-positiven Zellen mit

einem signifikanten Anstieg zu beobachten (UPCI-SCC-154 14,9% bei 0 Gy zu 35,3% bei 2 Gy). In der HPV-negativen Linie lässt sich wiederum keine signifikante Beeinflussung durch die siRNA Transfektion nachweisen; dies gilt sowohl für die bestrahlten, als auch für die unbestrahlten Ansätze (0 Gy: 2,7% mock zu 3,0% siRNA; 2 Gy: 4,8% mock zu 4,3% siRNA). In der UPCI-SCC-154- Linie zeigt sich ebenfalls keine signifikante Umverteilung innerhalb des Zellzyklus als zelluläre Antwort auf die Transfektion; dies gilt singular, aber auch in Kombination mit Bestrahlung (0 Gy: 14,9% mock zu 13,4% siRNA; 35,3% mock zu 29,3% siRNA).

In der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus zeigte sich somit weder in der unbehandelten Kontrolle noch im siRNA medierten Knock-Down ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlter und unbestrahlter Zelllinie. Auch die Reduktion der hnRNP K-Expression führte zu keiner signifikanten Veränderung des Zellzyklus-progresses in beiden Zelllinien (Abbildung 14).

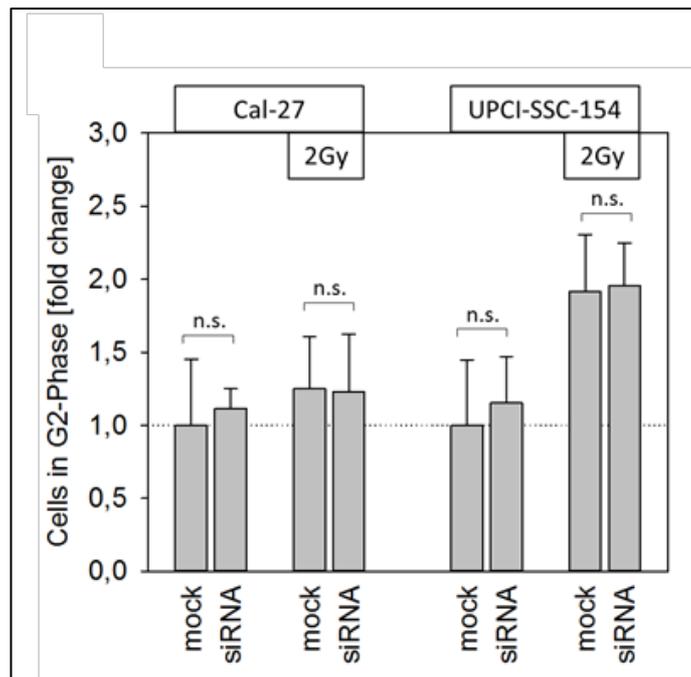


Abbildung 17 Auswertung der Zellen in der G2 Phase im Vergleich zwischen unseren untersuchten Zelllinien Cal-27 (HPV negativ) und UPCI-SCC-154 (HPV positiv) jeweils mit Bestrahlung (2 Gy) oder ohne Bestrahlung. Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss eines hnRNP K Knock-Down mittels siRNA Transfektion. Ein Knock-Down des zellulären hnRNP K zeigte in unserer Untersuchung in beiden Zelllinien keine signifikanten Veränderungen in der bestrahlungsinduzierten G2-Phasen-Verzögerung im Vergleich zur Mock Transfektion (Kontrolle) (n.s.=nicht signifikant; $p < 0.05$; $n \geq 3$).

3.8. hnRNP K-Knock-Down induziert Apoptose

Nach erfolgter Analyse des Zellzyklus und der Zellteilung untersuchten wir zur weiteren Spezifizierung des Klonogenitätsverlustes die Apoptose nach Behandlung der Zellen. Dazu bedienten wir uns eines Assays von BioRad, dessen Kern die Analyse von Active-Caspase-3 darstellt, einer Protease und Effektor-Caspase des Apoptose-Weges, die die Proteinstrukturen der Zelle bei Aktivierung des Zelltodes aufspaltet [67, 68].

In der ELISA-basierten Untersuchung mit dem BioPlex-Reader wurden die Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression von Active-Caspase-3 untersucht. Dies entspricht einer Apoptose-Analyse mittels ELISA-basierter Analytik.

Bereits nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung konnte in beiden untersuchten Zelllinien unabhängig ihres HPV Status‘ in den Kontrollmessungen (Mock) ein signifikanter Anstieg der Active-Caspase-3-Expression bis zum Faktor ~1.3 nachgewiesen werden (Abbildung 18). Der siRNA-medierte Verlust von hnRNP K führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der aktiven Form von Caspase-3 um das 2-3-fache im Vergleich zur jeweiligen Mock Kontrolle. Dieses Ergebnis ließ sich in beiden untersuchten Zelllinien, Cal-27 und UPCI-SCC-154 beobachten. Die Mehrexpression von Active-Caspase-3 ist jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt: so führt die Transfektion in der HPV-negativen Linie zu einem stärkeren Active-Caspase-3-Anstieg als in der HPV-positiven Linie. Die Ergebnisse verfehlen jedoch statistische Signifikanz. Eine zur hnRNP K-Reduktion zusätzliche Applikation von 2 Gy ionisierender Röntgenstrahlung hatte in beiden untersuchten Zelllinien einen synergetischen Effekt, der sich in einem intensivierten Anstieg der Active-Caspase-3-Level im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen darstellte. Statistische Signifikanz konnte dabei jedoch nur für Cal-27 erreicht werden. Insbesondere in den HPV-positiven Zellen, die transfiziert und bestrahlt wurden, zeigte sich eine größere Variabilität der Active-Caspase-3-Induktion, sodass im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen keine signifikant erhöhte Active-Caspase-3-Expression zu beschreiben war.

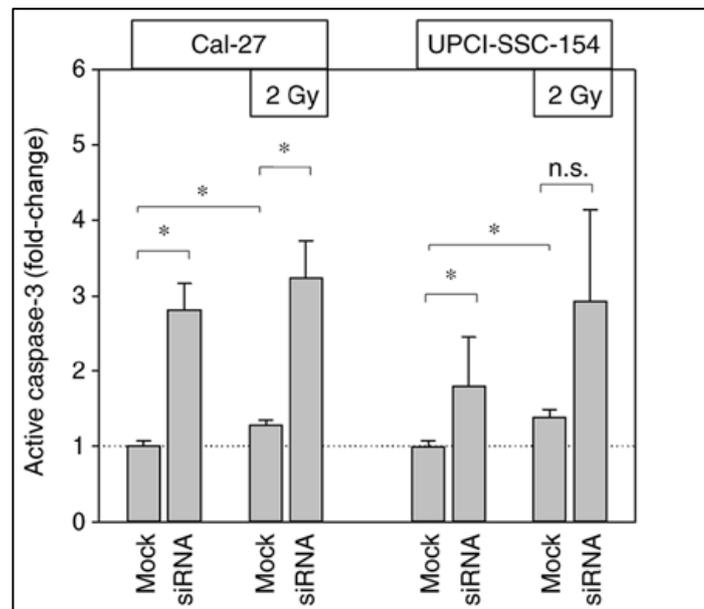


Abbildung 18 ELISA basierte Multiplex-Analyse der Expression von Active-Caspase-3, einer Effektorcaspase im Apoptoseprozess. Auf der Y-Achse aufgetragen ist dabei die Konzentration der Active-Caspase-3, einer Effektorcaspase im Prozess der Apoptose. Auf der X-Achse aufgetragen sind die Vergleichsgruppen mit der Mock-Kontrolle und der RNAi-Transfektion mit hnRNP K Knock-Down. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des zytoplasmatischen Caspase-3 Levels in Cal-27 und UPCI-SSC-154 Zellen bei hnRNP K Knock-Down (Kruskal Wallis Test, Holm-Sidak Post Hoc Test, n.s.=not significant; * $p < 0.05$, $n=6$).

4. Diskussion

Diese Arbeit versteht sich als Bindeglied zwischen der klinischen Beobachtung einer erhöhten Strahlensensitivität von HPV-positiven gegenüber HPV-negativen HNSCC und der Bedeutung von hnRNP K in Malignomen im Allgemeinen [37, 45, 80, 81]. So konnte hnRNP K in verschiedenen soliden Tumorentitäten, beispielsweise Pankreas und Ösophagus, aber auch in Leukämien mit einer prokarzinogenen Wirkung assoziiert werden [23, 43, 48, 51, 82, 83]. Auch wurde das Ribonukleoprotein bereits mit der Strahlensensibilität im Spezifischen, in Kolorektalen Karzinomen und Malignen Melanomen in Verbindung gebracht [37, 43, 45]. So konnte in einer immunhistochemischen Studie an HNSCC-Tumorpräparaten von 117 Patienten eine Assoziation von sowohl nukleärem als auch zytoplasmatischem hnRNP K mit fortgeschrittenem Tumorstadium und männlichem Geschlecht demonstriert werden [1]. Inwieweit die in früheren Untersuchungen bei männlichen HNSCC-Patienten beobachtete höhere Mortalität mit einer gesteigerten hnRNP K-Konzentration des Tumorgewebes korreliert, ist derzeit jedoch noch nicht abschließend geklärt [84].

In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass hnRNP K auch für die Homöostase von HNSCC-Zellen eine große Bedeutung hat. So führt ein transienter, siRNA-mediierter hnRNP K Knock-Down zu einer signifikanten Reduktion der Klonalität der untersuchten Zelllinien, ein Effekt, der so bereits in Malignen Melanomen und Kolorektalen Karzinomen beschrieben werden konnte [43, 45]. So zeigten Eder et. al. in Kolonkarzinomen nach hnRNP K-Verlust bei reduzierter Klonogenität eine Apoptoseinduktion [43]. Aufgrund signifikant erhöhter Level von Active-Caspase-3 nach zellulärem hnRNP K-Knock-Down führten wir die verminderte Fähigkeit zur Bildung von Tumorklonen ebenfalls auf eine Einleitung der Apoptose zurück und bestätigen damit die Induktion des programmierten Zelltodes als Reaktion auf den Verlust von hnRNP K auch in HNSCC-Zelllinien. Eine vergleichbare Initiation von Apoptose nach hnRNP K-Knock-Down konnte neben kolorektalen Karzinomen bereits in anderen Tumorzellen, beispielsweise in Blasenkarzinomen, nachgewiesen werden [39-44].

In einer aktuellen Studie wurden die in unseren Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse mit Hilfe eines *in-vivo* CAM-Assays untersucht. Es zeigte sich eine reduzierte Klonogenität und Tumorbildung nach hnRNP K Knock-Down im HNSCC Xenograft-Modell [1]. So konnte sowohl eine Reduktion des Proliferationsindex‘ als auch der Angiogenese beschrieben werden. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits von Eder et al. bei CAM-Experimenten mit Kolorektalen Karzinomen demonstriert [43]. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete reduzierte Tumorwachstum im CAM-Modell ist die Störung der Tumolvaskularisation durch den Knock-Down von hnRNP K, welcher bereits in einer Vielzahl von Tumoren eine Rolle von hnRNP K bei der Angiogenese indizierte [50, 85]. Ursächlich wird dabei eine hnRNP K-abhängige Expression von VEGF diskutiert, welches die Bildung von Gefäßendothel über die Bindung an einen Tyrosinkinase-Rezeptor vermittelt [86-88]. Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen das Intermediärfilament Desmin, einem Surrogatmarker für Gefäßendothelien, konnten in den CAM-Experimenten eine reduzierte Vaskularisation in HNSCC-Tumorgewebe bestätigen [50, 89]. Eine Abnahme des Proliferationsindex‘ auf Basis zellulärer Minderperfusion durch das Ausbleiben von Angiogenese stellt eine Hypothese dar [1]. Zum Ausschluss eines Zellzyklusarrestes erfolgte eine BrdU-basierte FACS-Analyse des Zellzyklus‘, wobei kein Zellzyklusarrest durch transiente hnRNP K Reduktion nachgewiesen werden konnte. Somit scheint in Zusammenschau eine Apoptosezunahme der Klonogenitätsreduktion zugrundeliegend [1].

So zeigt sich, dass hnRNP K in verschiedenen Malignomen, inklusive HNSCC, eine Schlüsselrolle in der zellulären Homöostase spielt. Das Vorhandensein des Ribonukleoproteins ist in Malignomen für Tumorbildung, Proliferation und Angiogenese von zentraler Bedeutung [23, 48, 50, 85, 90]. Eine klinische Verwendung als immunhistochemischer Biomarker in histologischen Untersuchungen bzw. als serologisches Screening-Antigen erscheint denkbar. Der diagnostische Mehrwert hängt jedoch von Sensitivität und Spezifität der Zuordnung zu Malignomen im Allgemeinen bzw. einer Tumorentität im Speziellen ab. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren nur wenige Untersuchungen, die hnRNP K in diesem Zusammenhang beleuchten, so wird hnRNP K beispielsweise in Kombination mit dem Tumormarker AFP in der Früherkennung von HCC bei chronischen Lebererkrankungen diskutiert [23, 91-93]. Diesbezüglich bedarf es tiefergehender Untersuchungen, sodass eine fundierte

Evaluation einer Verwendung von hnRNP K als Tumormarker zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgegeben werden kann.

Weiter konnte durch Kaehler et al. (2020) die Intensität der hnRNP K-Expression in HNSCC mit dem vorliegenden Tumorstadium nach UICC korreliert werden. Höhergradige Malignome (Stadien III / IV - Nodalbefall, Metastasierung oder infiltrativer Primarius) exprimieren signifikant mehr zytoplasmatisches hnRNP K als diese der Stadien I / II (lokal begrenzter Tumor) [1]. Eine hnRNP K-Mehrexpression in Malignomen wurde bereits zuvor, jedoch unabhängig vom Tumorstadium, mit einer Verschlechterung des Outcomes in Verbindung gebracht [23]. hnRNP K wird dabei mit Tumormigration und der Bildung Invasivität-fördernder Metalloproteasen assoziiert [50]. Auch konnte erstmalig eine signifikante hnRNP K-Mehrexpression in männlichen gegenüber weiblichen HNSCC-Patienten dargestellt werden [1]. Dieses Erkenntnis wiegt umso schwerer, da das Patientengeschlecht in HNSCC prognostisch eine wichtige Rolle spielt. So sind männliche Patienten in den untersuchten Kohorten signifikant überrepräsentiert und weisen eine erhöhte Malignom-assoziierte Mortalität auf [41, 84]. Ein direkter Zusammenhang bedarf weitergehender Untersuchungen, jedoch ist dies ein möglicher Hinweis darauf, dass der geschlechtsspezifische Expressionsunterschied zur schlechteren Prognose in männlichen HNSCC-Patienten beiträgt.

Mittels Immunoblot konnten wir eine von der applizierten Strahlendosis abhängige hnRNP K Expression nachweisen. So stellte sich in beiden untersuchten Zelllinien nach applizierten 2 Gy, einer auch im klinischen Setting gebräuchlichen Strahlendosis, eine erhöhte Proteinexpression mit zeitabhängig dynamischem Expressionsverlauf dar. Unsere Ergebnisse decken sich mit dosis- und zeitabhängigen hnRNP-K-Konzentrationen nach Exposition mit ionisierender Strahlung aus früheren Untersuchungen mit Melanom- und kolorektalen Karzinomzellen [43, 45]. Korreliert man diese Resultate mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzmikroskopie, zeigt sich als Strahlenfolge neben der zeitabhängigen Mehrexpression auch eine Verlagerung von hnRNP K aus dem Nucleolus ins Zytoplasma. Betrachtet man die Expressionsdynamik von hnRNP K nach Strahlenexposition bzw. bei DNA-Schädigung, ist sowohl eine Dosis- als auch Zeit-abhängige Umverteilung zugunsten des Zellzytoplasma nachzuweisen. Dies ist konkordant zu den mit hnRNP K assoziierten Funktionen im Rahmen des Zellzyklusarrests [37]. In seiner Rolle als Mediator von p53 erfolgt nach einer Schädigung der Erbinformation, hier beispielsweise durch ionisierende Strahlung,

die Phosphorylierung mittels ATM, was einen Abbau durch Ubiquitylierung verhindert und neben einer induzierten Mehrexpression die beobachtete Akkumulation hervorruft [34, 35]. Die Initiation des Zellzyklusarrests erfolgt durch Co-Rekrutierung mit dem ebenfalls phosphorylierten p53 an der Promotor-Region von p21 und einer Akzeleration der Transkription [34, 35]. Die Cyklin-abhängige Kinase p21 ist ein potenter Mediator von DNA-Damage-Repair-Prozessen sowie der Kontrolle der Zellzyklusprogression [94, 95]. Als Strahlenfolge kommt es zu einer deutlichen Mehrexpression von DNA-Damage-Repair-mRNA, an deren Splicing, Shuttling und Translation wiederum hnRNP K beteiligt ist. Dies führt zu einer zytoplasmatischen Umverteilung des Ribonukleoproteins, welche in unseren immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der HNSCC-Zelllinien zu bestätigen ist [16, 20, 21, 90].

Auch wird die Aggregation von hnRNP K zusammen mit anderen Ribonukleoproteinen in sogenannten Stress Granula diskutiert. Es handelt sich dabei um Protein-RNA-Zusammenschlüsse im Zytoplasma der Zelle [45, 96]. Ein Auftreten wurde in vitro bei verschiedenen physikalischen, biologischen, chemischen und biochemischen Stressoren beschrieben (beispielsweise Temperaturschwankungen, oxidativem Stress, Bestrahlung, Akkumulation toxischer Substanzen oder Translations- bzw. Transkriptionseinhibition, bakterielle oder virale Infektionen) [97]. Die Funktion dieser Molekül-Komplexe ist Gegenstand aktueller Forschung, wobei sie, durch Aggregation von Ribosomen, mRNA, Transkriptionsfaktoren und andere RNA bindende Proteine in einer membranlosen Struktur mit dem Schutz sowie der Beschleunigung intrazellulärer Interaktionen in Abwehr- und Reparaturprozessen assoziiert werden [98, 99].

Der transiente Knock-Down von hnRNP K mittels Lipofektion zeigte sich hinsichtlich einer Reduktion der Klonalität sehr effektiv. Dies erschwerte eine Demonstration der Auswirkung auf die Strahlensensibilität in den untersuchten HNSCC, zumal nur in einer Zelllinie nach Knock-Down eine Restklonierungsfähigkeit gegeben war. Unsere Beobachtung in HNSCC ist dabei konkordant zu Untersuchungen in hepatozellulären Karzinomen, in denen hnRNP K, p53 unabhängig, mit einer Suppression von Caspasen im Sinne einer Apoptoseinhibition in Verbindung gebracht werden konnte [36]. Auf der anderen Seite fungiert hnRNP K durch seine Rolle im DNA-Damage-Repair-Prozess, im Zusammenspiel mit p53, als Tumorsuppressor, indem es den Zellzyklus mediiert und Apoptose induziert [34, 95]. In Knock-Down Zellen ist folglich keine hnRNP K-medierte Aktivierung von p21 mit Zellzyklusarrest mehr möglich. Diese Interpretation deckt sich mit dem Ausbleiben signifikanter Zellzyklusveränderungen im Sinne eines

Arrests nach Knock-Down in den FACS-Untersuchungen. Ein Zusammenwirken verschiedener Aspekte der hnRNP K-Interaktion ist wahrscheinlich. Die genauen Abläufe und Wechselwirkungen bei transienter Reduktion bedürfen jedoch weiterführender Untersuchungen.

Der HPV-Status stellt auch aufgrund einer veränderten Radiosensitivität einen etablierten prognostischen Biomarker in HNSCC dar [80]. Als eine mögliche Ursache wird ein vermindertes Vorhandensein von nukleärem p53 in HPV+ HNSCC diskutiert, was zu einer Beeinträchtigung der zellulären Homöostase nach Bestrahlung führt [35]. Da hnRNP K in der Literatur als ein wichtiger Ko-Faktor von p53 beschrieben wurde [33, 35, 36], lag ein zweiter Schwerpunkt der Untersuchungen auf einer möglichen Korrelation von HPV-Status und zellulärer hnRNP K-Expression [32, 36]. Nach Verifikation des HPV-Status der untersuchten Zelllinien mittels p16 Surrogatfärbung konnte immunhistochemisch kein Unterschied hinsichtlich des UICC-Stadiums, des Geschlechtes oder der intrazellulären Verteilung von hnRNP K, abhängig von einer HPV Infektion, dargestellt werden. Im vergleichenden Klonierungstest (Linear-Quadratic Model von Chadwick und Leenhouts) verhielten sich die untersuchten HNSCC-Zelllinien mit HPV-Infektion entsprechend der klinischen wie experimentellen wissenschaftlichen Erkenntnisse, mit einer HPV-typisch erhöhten Radiosensitivität [80].

In den Untersuchungen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen abhängig vom Vorhandensein einer HPV Infektion. Trotz der unterschiedlichen Radiosensitivität der HNSCC-Zelllinien im Sinne einer reduzierten Klonogenität zeigte sich die Dynamik der strahleninduzierten hnRNP K-Dynamik in Expressionsintensität und Lokalisation nicht durch eine Infektion mit dem Humanen Papillomavirus alteriert. So lässt sich weder eine signifikant differente Proteinexpression in Zeit- oder Dosisabhängigkeit noch eine divergente intrazelluläre Verschiebung des heterogenen Ribonukleoproteins als Reaktion auf Bestrahlung nachweisen. Auch zeigten Zellzyklus und Apoptoseinduktion keine HPV abhängige Alteration nach Bestrahlung oder Knock-Down. Fluoreszenzmikroskopisch ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der zellulären Reaktion auf die Exposition mit siRNA und/oder ionisierender Strahlung darstellbar. Somit scheint die klinisch beobachtete und durch uns experimentell zu bestätigende erhöhte Radiosensitivität sowie von HPV-positiven HNSCC nicht direkt auf hnRNP K zurückzuführen sein. Eine Beteiligung des Ribonukleoproteins im Rahmen von Signalkaskaden ist jedoch nicht auszuschließen. Unabhängig davon bedarf

es weiterer Untersuchungen, um die Hintergründe der differenten Radiosensitivität aufzudecken.

Literaturverzeichnis

1. Kähler, J., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is overexpressed and contributes to radioresistance irrespective of HPV status in head and neck squamous cell carcinoma*. Int J Mol Med, 2020. **46**(5): p. 1733-1742.
2. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
3. Franceschi, S., et al., *Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy*. Cancer Res, 1990. **50**(20): p. 6502-7.
4. Ang, K.K. and E.M. Sturgis, *Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma*. Semin Radiat Oncol, 2012. **22**(2): p. 128-42.
5. Chaturvedi, A.K., *Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers*. Head Neck Pathol, 2012. **6 Suppl 1**: p. S16-24.
6. Chaturvedi, A.K., et al., *Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States*. J Clin Oncol, 2011. **29**(32): p. 4294-301.
7. Brouwer, A.F., M.C. Eisenberg, and R. Meza, *Age Effects and Temporal Trends in HPV-Related and HPV-Unrelated Oral Cancer in the United States: A Multistage Carcinogenesis Modeling Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151098.
8. Fakhry, C., et al., *Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(4): p. 261-9.
9. Bernard, H.U., et al., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-9.
10. Bzhalava, D., C. Eklund, and J. Dillner, *International standardization and classification of human papillomavirus types*. Virology, 2015. **476**: p. 341-344.
11. Mallen-St Clair, J., et al., *Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease*. Biochim Biophys Acta, 2016. **2**: p. 141-150.
12. Liu, C., et al., *The molecular mechanisms of increased radiosensitivity of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC): an extensive review*. J Otolaryngol Head Neck Surg, 2018. **47**(1): p. 59.
13. Moody, C.A. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 550-60.
14. Chiantore, M.V., et al., *Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer-related microRNAs: additional evidence in HPV-induced tumorigenesis*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(8): p. 1751-63.
15. Collins, L.J., et al., *The modern RNP world of eukaryotes*. J Hered, 2009. **100**(5): p. 597-604.
16. Han, S.P., Y.H. Tang, and R. Smith, *Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives*. Biochem J, 2010. **430**(3): p. 379-92.
17. Stains, J.P., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses transcription from a cytosine/thymidine-rich element in the osteocalcin promoter*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 613-23.
18. Cao, W., et al., *Control of alternative splicing by forskolin through hnRNP K during neuronal differentiation*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(16): p. 8059-71.
19. Bomsztyk, K., et al., *Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein*. FEBS Lett, 1997. **403**(2): p. 113-5.
20. Geuens, T., D. Bouhy, and V. Timmerman, *The hnRNP family: insights into their role in health and disease*. Hum Genet, 2016. **135**(8): p. 851-67.

21. Bomsztyk, K., O. Denisenko, and J. Ostrowski, *hnRNP K: one protein multiple processes*. Bioessays, 2004. **26**(6): p. 629-38.
22. Michael, W.M., P.S. Eder, and G. Dreyfuss, *The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein*. EMBO J, 1997. **16**(12): p. 3587-98.
23. Barboro, P., N. Ferrari, and C. Balbi, *Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression*. Cancer Lett, 2014. **352**(2): p. 152-9.
24. Ostrowski, J., et al., *Insulin alters heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein binding to DNA and RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9044-9.
25. Schullery, D.S., et al., *Regulated interaction of protein kinase Cdelta with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15101-9.
26. Van Seuningen, I., et al., *The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26976-85.
27. Chang, Y.I., et al., *Identification of the methylation preference region in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein arginine methyltransferase 1 and its implication in regulating nuclear/cytoplasmic distribution*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(3): p. 865-9.
28. Chen, Y., et al., *Arginine methylation of hnRNP K enhances p53 transcriptional activity*. FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1761-5.
29. Chiou, Y.Y., et al., *Direct mass-spectrometric identification of Arg296 and Arg299 as the methylation sites of hnRNP K protein for methyltransferase PRMT1*. Protein J, 2007. **26**(2): p. 87-93.
30. Ostareck-Lederer, A., et al., *c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4535-43.
31. Ostareck-Lederer, A., et al., *Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 11115-25.
32. Lee, S.W., et al., *SUMOylation of hnRNP-K is required for p53-mediated cell-cycle arrest in response to DNA damage*. EMBO J, 2012. **31**(23): p. 4441-52.
33. Pelisch, F., et al., *DNA damage-induced heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K sumoylation regulates p53 transcriptional activation*. J Biol Chem, 2012. **287**(36): p. 30789-99.
34. Moumen, A., et al., *ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage*. Cell Cycle, 2013. **12**(4): p. 698-704.
35. Moumen, A., et al., *hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage*. Cell, 2005. **123**(6): p. 1065-78.
36. Xiao, Z., et al., *hnRNP K suppresses apoptosis independent of p53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors*. Carcinogenesis, 2013. **34**(7): p. 1458-67.
37. Haley, B., et al., *Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionising radiation and their involvement in DNA damage repair*. Int J Radiat Biol, 2009. **85**(8): p. 643-55.

38. Proepper, C., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K interacts with Abi-1 at postsynaptic sites and modulates dendritic spine morphology*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27045.
39. Carpenter, B., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2006. **95**(7): p. 921-7.
40. Chen, L.C., et al., *The antiapoptotic protein, FLIP, is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and correlates with poor overall survival of nasopharyngeal carcinoma patients*. Cell Death Differ, 2010. **17**(9): p. 1463-73.
41. Wu, C.S., et al., *Heterogeneous ribonucleoprotein K and thymidine phosphorylase are independent prognostic and therapeutic markers for oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2012. **48**(6): p. 516-22.
42. Chen, X., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is associated with poor prognosis and regulates proliferation and apoptosis in bladder cancer*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(7): p. 1266-1279.
43. Eder, S., et al., *Baseline MAPK signaling activity confers intrinsic radioresistance to KRAS-mutant colorectal carcinoma cells by rapid upregulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)*. Cancer Lett, 2017. **385**: p. 160-167.
44. Matta, A., et al., *Heterogeneous ribonucleoprotein K is a marker of oral leukoplakia and correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2009. **125**(6): p. 1398-406.
45. Eder, S., et al., *Radiosensitization and downregulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) upon inhibition of mitogen/extracellular signal-regulated kinase (MEK) in malignant melanoma cells*. Oncotarget, 2015. **6**(19): p. 17178-91.
46. Wiesmann, N., et al., *Knockdown of hnRNPK leads to increased DNA damage after irradiation and reduces survival of tumor cells*. Carcinogenesis, 2017. **38**(3): p. 321-328.
47. Takimoto, M., et al., *Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro*. J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 18249-58.
48. Gallardo, M., et al., *Aberrant hnRNP K expression: All roads lead to cancer*. Cell Cycle, 2016. **15**(12): p. 1552-7.
49. Roychoudhury, P. and K. Chaudhuri, *Evidence for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overexpression in oral squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2007. **97**(4): p. 574-5; author reply 576.
50. Gao, R., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) promotes tumor metastasis by induction of genes involved in extracellular matrix, cell movement, and angiogenesis*. J Biol Chem, 2013. **288**(21): p. 15046-56.
51. Zhou, R., et al., *Increased expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in pancreatic cancer and its association with the mutant p53*. Int J Cancer, 2010. **126**(2): p. 395-404.
52. Strozynski, J., *Proteomic identification of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as irradiation responsive protein related to migration*. Proteomics, 2015(113): p. 154-61.
53. Fridman, J.S. and S.W. Lowe, *Control of apoptosis by p53*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9030-40.

54. Messias, A.C., et al., *The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation*. J Mol Biol, 2006. **361**(3): p. 470-81.
55. Harms, K.L. and X. Chen, *The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 2014-30.
56. Medina-Medina, I., et al., *p53 promotes its own polyubiquitination by enhancing the HDM2 and HDMX interaction*. Protein Sci, 2018. **27**(5): p. 976-986.
57. Fischer, M., *Census and evaluation of p53 target genes*. Oncogene, 2017. **36**(28): p. 3943-3956.
58. Tchelebi, L., H. Ashamalla, and P. Graves, *Mutant p53 and the Response to Chemotherapy and Radiation*. Sub-cellular biochemistry, 2014. **85**: p. 133-159.
59. Gottlieb, T.M. and M. Oren, *p53 and apoptosis*. Semin Cancer Biol, 1998. **8**(5): p. 359-68.
60. Iwakuma, T. and G. Lozano, *MDM2, an introduction*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 993-1000.
61. Vignard, J., G. Mirey, and B. Salles, *Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up*. Radiother Oncol, 2013. **108**(3): p. 362-9.
62. Mena, S., A. Ortega, and J.M. Estrela, *Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis*. Mutat Res, 2009. **674**(1-2): p. 36-44.
63. Saisho, Y. and A. Ito, *Mathematical models of the generation of radiation-induced DNA double-strand breaks*. J Math Biol, 2013. **67**(3): p. 717-36.
64. Sauermost, R., *Lexikon der Biologie*, in *Lexikon der Biologie*, D. Freudig, Editor. 1999, Spektrum, Akademischer Verlag: Heidelberg.
65. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
66. Hasenjäger, A., et al., *Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-xL in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells*. Oncogene, 2004. **23**(26): p. 4523-4535.
67. Lowe, S.W. and A.W. Lin, *Apoptosis in cancer*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 485-95.
68. Wilson, J.H. and T. Hunt, *Molecular biology of the cell, 4th edition : a problems approach*. 2002, New York; London: Garland Science.
69. Ichim, G. and S.W. Tait, *A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(8): p. 539-48.
70. McGuire, S., *World Cancer Report 2014*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. Adv Nutr, 2016. **7**(2): p. 418-9.
71. Taberna, M., et al., *Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer*. Ann Oncol, 2017. **28**(10): p. 2386-2398.
72. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
73. Pillai-Kastoori, L., A.R. Schutz-Geschwender, and J.A. Harford, *A systematic approach to quantitative Western blot analysis*. Analytical Biochemistry, 2020. **593**: p. 113608.
74. Ramos-Vara, J.A., *Principles and Methods of Immunohistochemistry*. Methods Mol Biol, 2017. **1641**: p. 115-128.
75. Liebau, S., et al., *An SK3 channel/nWASP/Abi-1 complex is involved in early neurogenesis*. PloS one, 2011. **6**(3): p. e18148-e18148.
76. Morgan, E., et al., *Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology*. Clin Immunol, 2004. **110**(3): p. 252-66.

77. Bodgi, L., et al., *Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review.* J Theor Biol, 2016. **394**: p. 93-101.
78. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
79. Barber, R.D., et al., *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.* Physiol Genomics, 2005. **21**(3): p. 389-95.
80. Mirghani, H., et al., *Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives.* Cancer Treat Rev, 2015. **41**(10): p. 844-52.
81. Salazar, C.R., et al., *Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma survival: a comparison by tumor site and initial treatment.* Head Neck Pathol, 2014. **8**(1): p. 77-87.
82. Klimek-Tomczak, K., et al., *Editing of hnRNP K protein mRNA in colorectal adenocarcinoma and surrounding mucosa.* Br J Cancer, 2006. **94**(4): p. 586-92.
83. Hatakeyama, H., et al., *Protein clusters associated with carcinogenesis, histological differentiation and nodal metastasis in esophageal cancer.* Proteomics, 2006. **6**(23): p. 6300-16.
84. Fakhry, C., *The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer.* . Cancer, 2017(123(9)): p. 1566-1575.
85. Chen, Y., et al., *Role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development.* J Cell Biochem, 2019. **120**(9): p. 14296-14305.
86. Feliers, D., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K contributes to angiotensin II stimulation of vascular endothelial growth factor mRNA translation.* Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(2): p. F607-15.
87. Sataranatarajan, K., *PKCdelta regulates the stimulation of vascular endothelial factor mRNA translation by angiotensin II through hnRNP K.* . Cell Signal, 2008(20): p. 969-77.
88. Kliche, S. and J. Waltenberger, *VEGF receptor signaling and endothelial function.* IUBMB Life, 2001. **52**(1-2): p. 61-6.
89. Chan-Ling, T., et al., *Desmin ensheathment ratio as an indicator of vessel stability: evidence in normal development and in retinopathy of prematurity.* Am J Pathol, 2004. **165**(4): p. 1301-13.
90. Lu, J. and F.H. Gao, *Role and molecular mechanism of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development and progression.* Biomed Rep, 2016. **4**(6): p. 657-663.
91. Guo, Y., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a tissue biomarker for detection of early hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis.* J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 37.
92. Mojtahedi, Z., et al., *Immunoproteomics of HER2-Positive and HER2-Negative Breast Cancer Patients with Positive Lymph Nodes.* OMICS: A Journal of Integrative Biology, 2011. **15**(6): p. 409-418.
93. Qi, Z., et al., *Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in aplastic anemia.* Annals of Hematology, 2010. **89**(12): p. 1255-1263.
94. Karimian, A., Y. Ahmadi, and B. Yousefi, *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage.* DNA Repair (Amst), 2016. **42**: p. 63-71.
95. Engeland, K., *Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM.* Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 114-132.

96. Jain, S., et al., *ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure*. *Cell*, 2016. **164**(3): p. 487-498.
97. Aulas, A., et al., *Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci*. *J Cell Sci*, 2017. **130**(5): p. 927-937.
98. Protter, D.S.W. and R. Parker, *Principles and Properties of Stress Granules*. *Trends Cell Biol*, 2016. **26**(9): p. 668-679.
99. Campos-Melo, D., et al., *The Integral Role of RNA in Stress Granule Formation and Function*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021. **9**.

Danksagung

Mein Dank gilt Claudia Schlosser, Roland Ridi und Andreas Hübsch für die exzellente technische Assistenz und Barbara Couson sowie Jianqing Chen für die Durchführung der Klonierungstests.

Danken möchte ich auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Dennis Nowak für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Mentor Dr. Stefan Eder für die ausgezeichnete Betreuung und Anleitung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit von der Idee bis zum finalen Produkt.

Affidavit

Kähler, Justus Carl Paul

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Die Bedeutung des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K hinsichtlich der Radiosensitivität von Plattenepithelkarzinomzelllinien des Mund- und Rachenraumes in Abhängigkeit vom HPV-Status“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus diesem 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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München den 28.04.2023

Justus Kähler
Justus Carl Paul Kähler

Veröffentlichungen und Eigenanteil

Die folgenden Publikationen gingen aus den Arbeiten um diese Dissertationsschrift hervor und weisen auch Inhalte aus Forschungskooperationen im Rahmen der Dissertation auf.

Publikation:

International Journal of Molecular Medicine (IJMM)

Kähler J, Hafner S, Popp T, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is overexpressed and contributes to radioresistance irrespective of HPV status in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med.* 2020;46(5):1733-1742.

doi:10.3892/ijmm.2020.4718

Abstract:

Wehrmedizinische Monatsschrift der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie (DGWMP)

Kähler J. für das Institut für Radiobiologie der Bundeswehr (InstRadBioBw), München. Expression des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K fördert karzinogene Eigenschaften von Mund- und Rachenraumkarzinomen, Wehrmedizinische Monatsschrift 12/2018, im Rahmen des Heinz-Gerngroß-Förderpreises 2018 der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie (DGWMP), Abstract: *Wehrmedizinische Monatsschrift* 62 (2018), 12/2018 442-443 (2018).

Der Promovend war an der Feindefinition der Fragestellung sowie der Methodenauswahl beteiligt, wurde in alle genannten Methodiken eingearbeitet und hat diese zu ca. 30% selbstständig ausgeführt. Dabei wurde er durch die labortechnischen Assistenten Claudia Schlosser, Roland Ridi, Andreas Hübsch und Barbara Couson sowie Jianqing Chen unterstützt. Grafiken, Statistik und Literaturrecherche sind in Zusammenarbeit des Doktoranden mit promovierten und habilitierten Mitarbeitern des Institutes sowie beteiligter Partnerinstitute entstanden.

Des Weiteren war der Promovend an der zellulären Vorbereitung der in-vitro CAM-Versuche beteiligt.