

Aus der
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Rita Engenhart-Cabillic
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Strahlensensitivierung von Kopf-Hals-Tumorzellen durch den
dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Viola Balzer
aus Eckernförde

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
17.11.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan i.V. der Prodekan:	Prof. Dr. R. Müller
Referent:	Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic
1. Korreferent:	Prof. Dr. R. Mandic

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	9
1.1	Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region	9
1.1.1	<i>Einführung</i>	9
1.1.2	<i>Epidemiologie und Ätiologie</i>	9
1.1.3	<i>Tumorgenese HPV-negativer und -positiver HNSCC</i>	9
1.2	Therapie	11
1.3	Strahlenbiologische Aspekte	12
1.3.1	<i>Radiobiologische Grundlagen</i>	12
1.3.2	<i>DNA-Schädigung</i>	12
1.3.3	<i>DNA-Reparatur</i>	12
1.3.4	<i>Zellinaktivierung</i>	14
1.4	Prognose von HPV-negativen und -positiven HNSCC	15
1.5	Gezielte Therapie	16
1.6	Molekulare Charakteristika von HPV-negativen und -positiven HNSCC	16
1.7	Der PI3K/mTOR-Signalweg	16
1.8	Dualer PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235	18
1.9	Fragestellungen der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	<i>Geräte</i>	20
2.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	21
2.1.3	<i>Software</i>	21
2.1.4	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	21
2.1.5	<i>Allgemeine Puffer und Reagenzien</i>	22
2.1.6	<i>Zellkulturmedium</i>	23
2.1.7	<i>Zellkulturlinien</i>	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	<i>Zellkultivierung</i>	23
2.2.2	<i>Bestrahlung</i>	24
2.2.3	<i>Behandlung der Zellen</i>	24
2.2.4	<i>Koloniebildungstest</i>	24
2.2.5	<i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	24
2.2.6	<i>Mikroskopische Auswertung</i>	25
2.2.7	<i>Statistische Auswertung</i>	25
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Wirkung von BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit	27
3.2	DSB-Reparatur in HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zellen	28
3.2.1	<i>Quantifizierung der DSB durch den γH2AX-Assay</i>	28
3.3	Wirkung von BEZ235 auf die DSB-Reparatur HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zellen	33
3.4	Assoziation zwischen residuellen DSB und Zellüberleben	36
4	Diskussion	37
4.1	Wirkung von BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit	37
4.2	Wirkung von BEZ235 auf die DSB-Reparatur	37
4.3	Klinische Relevanz	39
5	Zusammenfassung	40
6	Summary	42
7	Literaturverzeichnis.....	44

8	Anhang	52
8.1	Curriculum Vitae	52
8.2	Liste der Publikationen	53
8.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer	54
8.4	Danksagung	55
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	56

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1: PI3K/Akt/mTOR-Signalweg.....	17
Abb.2: Wirkung von BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit.....	27
Abb.3: Nachweis von DSB mittels γ H2AX-Assay in Kombination mit CenpF.....	29
Abb.4: Verteilung der γ H2AX-Foci in unbehandelten und bestrahlten G1-Phase-Zellen.....	30
Abb.5: Verteilung der γ H2AX-Foci in unbehandelten und bestrahlten G2-Phasezellen.....	31
Abb.6: DSB-Reparatur in HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zellen.....	32
Abb.7: γ H2AX-Foci in bestrahlten HPV-negativen und positiven HNSCC-Zellen.....	33
Abb.8: Wirkung von BEZ235 auf die DSB-Reparatur.....	34
Abb.9: Assoziation zwischen residuellen DSB und Zellüberleben.....	35

TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1: Auflistung der verwendeten Geräte	20
Tab.2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	21
Tab.3: Auflistung der verwendeten Software	21
Tab.4: Auflistung der verwendeten Chemikalien.	21
Tab.5: Übersicht über die verwendeten HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Linien.....	23
Tab.7: Bestrahlungsparameter.	24
Tab.8: Zusammensetzung der γ H2AX-Immunfluoreszenz	25
Tab.9: Anteil der Zellen mit ≥ 5 Foci in unbehandelten und bestrahlten Zellen	32

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alphabetische Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen.

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BAK	BCL-2 homologous antagonist/killer
BCA	Bicinchoninsäure
BEZ235	NVP-BEZ235, Dactolisib
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
BRCA	Breast cancer 1
BSA	Bovines Serum Albumin
CDDP	Cisplatin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CT	Chemotherapie
D10	Bestrahlungsdosis, bei der die SF 10 % beträgt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
DDR	DNA-Schadensantwort
DER	dose enhancement ratio
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
ERCC1	Excision repair cross-complementing 1
F	weiblich
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Frameshift
FSC	Forward Scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDM2	Human double minute 2
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papilloma Virus
HR	Homologe Rekombination
hTERT	Humane telomerase reverse transkriptase
IFN	Interferon
M	männlich
M-Stadium	Fernmetastasen
MHC I	Major Histokompatibilitätskomplex I
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mTORC1	Mammalian target of Rapamycin 1
MW	Mittelwert
N-Stadium	Lymphknotenstatus
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCR	Nicht-kodierende Region
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nicht-Homologe Endverknüpfung
nM	Nanomolar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PerCP	Peridinin-chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastom Protein
PS	Petrischale
PY	Packungsjahr

Q1-4	Quadrant 1-4
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
RT	Radiotherapie
SCC	Sideward Scatter
SF	Überlebensfraktion
SF2RT	Überlebensfraktion nach Radiatio mit 2 Gy
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSB	DNA-Einzelstrangbrüche
STR	Short tandem repeats
T-Stadium	Tumorgröße
TF	Transkriptionsfaktor
UB	unbehandelt
UD	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
UM	Universität von Michigan
UA	Universität von Amsterdam
UT	Universität von Turku
V	Viabilität
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VZ	Verdopplungszeit
wt	Wildtyp
ub	unbekannt
γ H2AX	Phosphoryliertes Histon 2AX

1 EINLEITUNG

1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

1.1.1 Einführung

Kopf-Hals-Tumore (HNSCC) umfassen eine sehr heterogene Gruppe von Tumorerkrankungen. Seit den 1980er Jahren wird zwischen den Noxen-induzierten (HPV-negativ) und den durch die Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV-positiv) ausgelösten HNSCC unterschieden. Hinsichtlich Tumorbiologie, Therapieansprechen und Prognose handelt es sich bei HPV-negativen und HPV-positiven Tumoren um zwei eigenständige Entitäten, die bislang identisch therapiert werden.

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Maligne Tumore der Kopf-Hals-Region sind weltweit die sechsthäufigste Tumorentität mit weiterhin steigender Inzidenz. In über 90 % handelt es sich um verhornende und nicht-verhornende Plattenepithelzellkarzinome [44]. Nach dem Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 erkrankten in Deutschland im Jahr 2013 etwa 18000 Patienten an einem Tumor des oberen Aerodigestivtrakts, davon etwa 13000 Männer und 4500 Frauen [5]. Anhand ihrer anatomischen Lokalisation können die Karzinome in Tumore der Nasenhaupt- und Nebenhöhlen, Mundhöhle, Naso-, Oro- und Hypopharynx sowie des Larynx [65] unterteilt werden.

Ätiologisch gelten bei den HPV-negativen HNSCC als gesicherte Risikofaktoren langjähriger Nikotin- und Alkoholkonsum [50] sowie bei den HPV-positiven HNSCC die chronische Infektion mit den Humanen Papillomaviren - hier vor allem durch die *High-risk* Typen 16 und 18. Alkohol fungiert als ein Co-Karzinogen ohne eigenständiges malignes Potenzial [91]. Weitere Risikofaktoren sind die berufliche Exposition gegenüber Stäuben - vor allem Eichen- und Buchholzstäuben [81] -, Asbest, Nickel, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen [6] sowie mangelhafte Ernährung und schlechte Mundhygiene [39].

Während die Prävalenz der Noxen-induzierten Tumore aufgrund des rückläufigen Nikotinkonsums in der westlichen Welt stagniert, zeigen HPV-positive HNSCC eine steigende Inzidenz [14]. Hierbei handelt es sich vor allem um Oropharynx- und Mundhöhlenkarzinome [26, 56]. Der Anteil HPV-positiver Tumore an allen HNSCC variiert zwischen 20 bis 30 % [1, 56, 68, 80].

Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei etwa 60 Jahren [80] und es erkranken deutlich mehr Männer als Frauen [26, 80]. Die Mortalitätsrate liegt in Deutschland bei etwa 7200/Jahr, davon ca. 5500 Männer und 1700 Frauen [5, 38].

1.1.3 Tumorgenese HPV-negativer und -positiver HNSCC

Die Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess mit Anhäufung diverser genetischer Veränderungen und Beeinflussung zellulärer Prozesse wie Zellteilung, Zellwachstum und Zelltod [89]. Nach dem Modell der Karzinogenese von Hanahan und Weinberg gibt es zehn zentrale Angriffspunkte (Hallmarks) in der Zellhomöostase, in denen Mutationen auftreten müssen, damit ein Tumor entstehen kann [29, 30].

Während die Tumorgenese in HPV-negativen HNSCC diesem Annahmemodell folgt, unterscheidet sich der Prozess in HPV-positiven Tumoren deutlich. Die Unterschiede führen zur Ausbildung molekularer Besonderheiten, die für das verschiedenartige

Therapieansprechen, insbesondere auf eine Radiochemotherapie, verantwortlich gemacht werden.

In HPV-negativen HNSCC werden durch die lang andauernde Exposition pathogener Substanzen Epithelreaktionen wie Hyperplasie und Hyperkeratose begünstigt. Über eine Reihe definierter histopathologischer Stadien entwickelt sich der Tumor vom normalen Epithel bis hin zum invasiven Karzinom mit Potenzial zur Metastasenbildung [16, 56]. Durch Selektionsprozesse entstehen Zellklone, die eine Vielzahl willkürlich über das gesamte Genom verteilter Mutationen beinhalten [87]. Vielfach involviert sind hierbei das Tumorsuppressorprotein p53 und das Protoonkogen pRb. Sie bewirken die Inhibition zelleigener Kontrollmechanismen im Zellzyklus und führen damit zur unkontrollierten Tumorprogression [41, 50]. Weitere Mutationen umfassen die verstärkte Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (epidermal growth factor receptor, EGFR) [77] sowie nachgeschalteter Signalwege. Auch Mutationen im PIK3CA-Gen konnten in großer Anzahl in HPV-negativen Tumoren nachgewiesen werden [87]. Durch ihren Einfluss u.a. auf die Zellproliferation tragen sie entscheidend zur Tumorentstehung bei.

Der Karzinogenese HPV-positiver HNSCC liegt ein anderer Mechanismus zugrunde. Von den mittlerweile mehr als 150 identifizierten Subtypen der Papillomaviren befallen etwa 30-40 die orale oder anogenitale Mukosa. Entsprechend ihres malignen Potenzials werden sie in Low-risk- und High-risk-Typen unterteilt. Zu der Low-risk-Gruppe gehören die HPV-Typen 6, 11, 42, 43 und 44 [86, 98], während die High-risk-Gruppe u.a. die Typen 16, 18, 33 und 35 umfasst [86, 98].

In Bezug auf den physiologischen Lebenszyklus der Papillomaviren kann die HPV-assoziierte Karzinogenese als „biologischer Unfall“ angesehen werden. Im ersten Schritt kommt es zu einer Infektion der epithelialen Basalzellschicht [87]. Für die Vollendung des Lebenszyklus ist die weitere Differenzierung der Epithelzellen erforderlich, wobei die Virusgenexpression während des Durchlaufens der unterschiedlichen Zellschichten strikt reguliert ist. Während die HPV-Infektion in der Regel durch das Immunsystem beseitigt wird, kann es in einigen Fällen zu einer persistierenden oder abortiven Infektion kommen [87]. Ausgelöst wird der Prozess zumeist durch die Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom, welche als Prädisposition für die maligne Entartung angesehen wird [87].

Die Integration der Virus-DNA in das Genom der Wirtszelle führt zur Überexpression der Virusonkogene E6 und E7, die eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung spielen [57] und Einfluss auf den Zellzyklus und die DNA-Reparatur nehmen [59, 67, 71].

E7, ein etwa 11 kDa großes Onkogen, blockiert die Funktion des Retinoblastomproteins (Rb) durch physikalische Bindung und konsekutiven proteasomalen Abbau [59, 89]. Unter physiologischen Umständen schützt das Retinoblastom-Protein die Zelle vor der Replikation beschädigter DNA und blockiert den G1/S-Phasen-Übertritt durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie (E2F1-8) [89]. Durch proteasomalen Abbau von pRb kommt es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und die Zellproliferation verläuft ohne Gegensteuerung. Über verschiedene Interaktionspartner beeinflusst E7 nahezu alle von Hanahan und Weinberg beschriebenen Hallmarks, u.a. die Induktion proangiogenetischer Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), die Induktion von Matrix-Metalloproteasen (prometastatisch), die Inhibition der DNA-Schadenserkennung sowie der DNA-Reparatur und die Inhibition des Interferon-Signalwegs (immunsuppressiv) [59].

E6 ist ein etwa 16-18 kDa großes Onkogen, das über Polyubiquitinierung und proteasomalen Abbau die Aktivität des Tumorsuppressors p53 verhindert. In gesunden Zellen wird p53 durchgehend translatiert, aber durch HDM2 (humane double minute proteine) ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Erst wenn in der Zelle geschädigte DNA vorliegt, akkumuliert p53 und steuert als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Genen, die den Zellzyklus arretieren, die DNA-Reparatur einleiten und bei irreparablen Schäden den programmierten Zelltod initiieren. Über die Bindung von E6 an p53 wird der Tumorsuppressor strukturell verändert und ist nicht fähig, an geschädigte DNA zu binden [59].

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Karzinogenese ist die Immortalisierung von Zellen. High-risk E6 steigert zusätzlich die transkriptionelle Aktivierung von hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase), der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase. Dadurch wird die kontinuierliche Verkürzung der Telomere während der DNA-Replikation verhindert [59].

E5, ein kleines, hydrophobes Protein bestehend aus ca. 83 Aminosäuren, hat vor allem unterstützenden Einfluss auf E6 und E7. Durch seine Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum verzögert es u.a. den Abbau von Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGFR [59]. Darüber erhöht sich deren Anteil und Aktivität und bedingt eine verstärkte Zellproliferation.

1.2 Therapie

Bei der leitliniengerechten Therapie von Tumoren der Kopf-Hals-Region wird seit den 1990er Jahren ein stadienabhängiges, multimodales Therapiekonzept aus den drei Säulen Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie angewendet [93], welches unter Berücksichtigung des Allgemeinzustands und bestehender Komorbiditäten in interdisziplinärer Zusammenarbeit erfolgen sollte [92].

Lediglich bei Tumoren in den frühen Stadien (I und II) erfolgt eine unimodale Therapie bei der entweder eine operative Versorgung oder alternativ eine primäre Radiotherapie durchgeführt werden kann.

Bei fortgeschrittenen Tumorstadien erfolgt eine risikoadaptierte Therapie, wobei die Tumoresektion entweder mit einer alleinigen Radiotherapie oder bei speziellen Risikokonstellationen mit einer Radiochemotherapie oder Immuntherapeutika kombiniert wird [92]. Zugelassene Substanzen für HNSCC sind Cisplatin, 5-Fluoruracil (5-FU), Mitomycin C, Docetaxel und Cetuximab. Aufgrund der verbesserten Prognose wird bereits ohne den klinischen Nachweis lymphatischer Metastasierung eine „Neck Dissection“ empfohlen, bei der zusätzlich die zervikalen Lymphknoten entfernt werden [93].

Die Radiotherapie ist ein zentrales Element bei der Behandlung der Kopf-Hals-Tumore. Ziel ist es, durch die Strahlentherapie eine lokale Tumorkontrolle durch Inaktivierung aller Tumorzellen zu erreichen [21]. Die Gesamtdosis variiert dabei in Abhängigkeit des Therapiekonzepts und liegt beim unimodalen Ansatz bei 72-74 Gy und im adjuvanten Setting bei 60 Gy. Je nach Zielsetzung und Therapiekonzept erfolgt die Behandlung mit einer konventionellen Fraktionierung (1,8 - 2 Gy/d, 5 d/Woche), einer akzelerierten Fraktionierung (>10 Gy/Woche) oder hyperfraktioniert (1,1 - 1,2 Gy zweimal/Tag) [73, 92].

Das derzeit angewandte Therapieregime geht oft mit toxischen Nebeneffekten einher. Dazu gehören die strahlentherapieinduzierte Stomatitis, schmerzhafte Dysphagie und Xerostomie. In einigen Fällen, insbesondere als Folge einer Chemotherapie, werden auch hämatologische Effekte wie Neutropenien beobachtet [9, 62].

1.3 Strahlenbiologische Aspekte

1.3.1 Radiobiologische Grundlagen

Über die Jahre konnten die Kenntnisse über die strahlenbiologischen Grundlagen der Strahlentherapie erheblich ausgeweitet werden. Dies beinhaltet das Verständnis der Signaltransduktion, der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Reparatur [21].

Die Wirkung der Strahlentherapie auf Zellen und Gewebe beruht in erster Linie auf der Schädigung der DNA durch direkte Ionisation oder die indirekte Strahlenwirkung [21, 27, 63]. Hierbei absorbiert ein Wassermolekül die Strahlenenergie und bedingt unter Radikalbildung die Umwandlung des Wassermoleküls in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie beispielsweise Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$), Superoxid ($\text{O}_2\cdot^-$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese äußerst reaktiven chemischen Verbindungen interagieren mit Makromolekülen (DNA, Proteine, Lipide) in direkter Umgebung und induzieren so DNA-Schäden [4].

1.3.2 DNA-Schädigung

Sowohl der direkte als auch der indirekte Effekt führen zu zahlreichen DNA-Schäden wie Einzelstrangbrüche (SSB), Doppelstrangbrüche (DSB), Basenschäden (BD), Schäden am Zuckerrückgrat sowie DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen [72].

Bei einem DNA-Doppelstrangbruch ist die Zuckerphosphatkette in einem Abstand von 6-7 Basenpaaren oder weniger auf den gegenüberliegenden Strängen gestört. Bei einer Photonenbestrahlung werden pro Zelle und einer Dosis von 1 Gy im Mittel 30 Doppelstrangbrüche erzeugt. Bei Tumorzellen kann diese Zahl aufgrund veränderter Chromatinstruktur um 50% variieren [19].

1.3.3 DNA-Reparatur

Um die Stabilität des Genoms zu gewährleisten, kommt es nach Bestrahlung oder DNA-Schädigung zur Aktivierung eines Netzwerks zellulärer Signalwege, die den DNA-Schaden erkennen, prozessieren und reparieren. Die Gesamtheit der Schadensantwort wird als *DNA damage response* (DDR) zusammengefasst [7]. An der Induktion ist primär das Protein Akt beteiligt, welches zum einen in der PI3K-Signalkaskade und zum anderen durch Bestrahlung selbst aktiviert wird. Als nachgeschaltete Zielstrukturen des Akt-Proteins und zentrale Elemente der DDR sind die Proteine ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) sowie die DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) involviert [49].

Während DNA-Schäden, die nur einen DNA-Strang betreffen, sehr gut von den Reparaturmechanismen der Zellen erkannt und nahezu fehlerfrei entfernt werden [20], gehören DNA-Doppelstrangbrüche zu den schwerwiegendsten Schäden und gefährden die Integrität des Genoms und das Zellüberleben. Je nach Schadenstyp stehen der Zelle verschiedene Reparaturmechanismen zur Verfügung, wobei aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit vorwiegend auf die vier Hauptmechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur eingegangen werden soll.

Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ)

NHEJ ist der wichtigste Hauptreparaturmechanismus in Säugetierzellen und in allen Zellzyklusphasen aktiv. Ohne Verwendung einer homologen Vorlage (bspw. Schwesterchromatid) erfolgt eine direkte Verknüpfung der beiden DNA-Bruchenden [33, 35].

Der Signalweg startet mit Bindung eines Proteinkomplexes bestehend aus Ku70 und Ku80 (Ku70/Ku80-Heterodimer) [17, 19] an die offenen Enden des Doppelstrangbruchs, die dadurch stabilisiert und vor weiterem Abbau durch Proteasen geschützt sind [17]. Über Rekrutierung und Komplexbildung mit der DNA-PKcs, der katalytischen Untereinheit der DNA-PK [24, 37], entsteht der aktive DNA-PK-Komplex [88]. Nach Aktivierung weiterer endverarbeitender Enzyme und Polymerasen besteht der letztlich entstandene Ligase-Komplex vorwiegend aus der DNA-Ligase IV (Lig IV) sowie den Cofaktoren XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) sowie XLF (*XRCC4-like factor*) und bewirkt die Ligation der Bruchenden [17, 33]. Liegen nicht direkt verknüpfbare Bruchenden vor, werden weitere Proteine zu deren Prozessierung rekrutiert [10]. Ohne Vorlage von Sequenzhomologien und fehlender Kontrolle der Bruchenden ist der Reparaturweg fehleranfällig, insbesondere, wenn multiple und eng beieinanderliegende DSB im Genom vorliegen [33, 35].

Defekte von Proteinen des NHEJ gehen mit einem Anstieg von Chromosomenaberrationen, reziproken Translokationen und persistierenden DNA-Brüchen einher und sind im Mausmodell mit der Induktion von Lymphomen und Leukämien assoziiert. In klinischen Proben korreliert die Aktivität der DNA-PKcs mit dem Auftreten genomischer Instabilität und einem Anstieg der Krebsinzidenz [17].

Homologe Rekombination (HR)

DSB-Reparatur über die HR erfolgt hingegen fehlerfrei, indem die DNA-Sequenz des unbeschädigten Schwesterchromatids als Vorlage genutzt wird. Sie ist daher auf die späte S- und G2-Phase beschränkt. [19, 33].

Im initialen Schritt bindet der MRN-Komplex (Mre11-RAD50-NBS1-Proteinkomplex) als primärer Sensor an Stellen geschädigter DNA [94]. Die Proteine Mre11 und CtIP (*C-terminal binding protein interacting protein*) erzeugen lange 3'-Einzelstrangüberhänge an den Bruchenden, die anschließend durch die kombinierte Aktivität der Exonuklease 1 (Exo1), Dna2 sowie BLM [21] weiter prozessiert und im Anschluss durch RPA-Proteine (Replication-Protein A) stabilisiert werden. Die so entstehenden Nukleoprotein-Filamente rekrutieren das ATR-interagierende Protein (ATRIP), welches wiederum ATR aktiviert. Im Anschluss kommt es mit Hilfe von RAD52, BRCA1 und BRCA2 zum Austausch von RPA durch das RAD51-Protein [79]. Die DNA-abhängige ATPase RAD51 vermittelt die Suche homologer Sequenzen auf einem unbeschädigten DNA-Strang. Die Invasion des Einzelstrangs in den homologen DNA-Strang wird durch RAD52 und die Helikase RAD54 katalysiert [31, 37]. Nach der Wirkung von weiteren Polymerasen, Nukleasen, Helikasen und anderen Komponenten kommt es zur DNA-Ligation durch syntheseabhängiges Strang-Annealing (SDSA) [85].

Defekte in Schlüsselproteinen der homologen Rekombination sind mit einem erhöhten Krebsrisiko verbunden und viele dem Reparaturweg zugehörige Proteine sind als Hochrisikogene bekannt. Dazu gehören BRCA1 und BRCA2, p53 und ATM. Die Reparaturkapazität in BRCA2-defizienten Zellen ist eingeschränkt und führt zur

Anhäufung von Chromosomenaberrationen und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines hereditären Mamma- oder Ovarialkarzinoms [31]. Ziemann et al. [97] konnten zeigen, dass HPV-positive HNSCC einen Defekt in der HR aufweisen, was die verminderte DSB-Reparatur dieser Zellen bewirkt.

Alternative Reparaturwege

Neben den klassischen Reparaturwegen sind noch weitere Varianten in Säugerzellen, wie das Single-strand Annealing (SSA) und das alternative Endjoining (Alt-EJ), beschrieben.

SSA mit RAD52 als Schlüsselprotein erfordert homologe Sequenz-Wiederholungen (Tandem Repeats) auf beiden Seiten des Bruchs. Dabei werden die jeweiligen Bruchenden des DSBs zunächst exonukleolytisch reseziert und die gegenüberliegenden Enden auf kurze Homologien untersucht. Dabei kommt es immer zum Verlust aller Sequenzen, die sich zwischen Bruch und den beiden Tandem-Repeats befinden, weshalb der Reparaturmechanismus ein großes Mutationspotenzial hat [19].

Das Alt-EJ wird von Zellen zur Reparatur eines DSB genutzt, wenn vor allem ein Defekt im klassischen NHEJ vorliegt [55]. Schlüsselproteine sind das PARP1, XRCC1 sowie die Ligase III. Wesentlich für diesen Reparaturweg sind seine verlangsamte Kinetik sowie die Entstehung von Deletionen und Insertionen an der Bruchstelle. Daher könnte dieser Mechanismus eine wichtige Quelle für onkogene Mutationen darstellen sowie möglicherweise die zelluläre Strahlenempfindlichkeit beeinflussen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass ein Knock-Down des PARP1-Proteins zu einer vollständigen Unterdrückung des Reparaturwegs führen kann [19].

Die Aktivität der verschiedenen Reparaturwege wird normalerweise durch eine funktionale Hierarchie in Abhängigkeit von Zellzyklus und der DDR- und DSB-Reparaturwege selbst organisiert, wodurch eine schnelle und angemessene Reparatur von DSBs sichergestellt wird [54]. In asynchronen Zellen ist das NHEJ der primäre Reparaturweg und unterdrückt während seiner Aktivität sowohl die HR als auch das SSA. Liegt ein Defekt des NHEJ vor, wird die Reparatur auf das Alt-EJ umgeschaltet, wie kürzlich für ein Panel von Tumorzelllinien aus verschiedenen Entitäten gezeigt wurde. Dieser Wechsel wurde auch in HNSCC beobachtet [21].

Nachweis der DNA-Doppelstrangbrüche

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden ist es heute möglich, einzelne strahleninduzierte DSB in einer Zelle nachzuweisen. Dafür wird die posttranslationale Modifikation von Histonen und DDR-Reparaturproteinen in der unmittelbaren Umgebung des DSBs genutzt. Vermittelt wird die Reaktion durch die Proteinkinasen ATM, ATR sowie die DNA-PK. Zusammen mit dem MRN-Komplex sind sie direkt an der Erkennung der DSB beteiligt und phosphorylieren u.a. das Histon H2AX an der Stelle Serin139, folglich als γ H2AX bezeichnet. Die Phosphorylierung breitet sich von dort über Rückkopplungsereignisse radial bis zu einer Entfernung von 2 Megabasenpaaren aus. γ H2AX rekrutiert weitere Proteine der Schadenserkennung und der DNA-Reparatur wie 53BP1, den MRN-Komplex, RAD51 und BRCA1 [72]. Die daraus resultierende Komplexbildung kann als nukleäre Foci nach Antikörpermarkierung nachgewiesen werden.

1.3.4 Zellinaktivierung

Werden die DSB nach der Bestrahlung nicht oder nur fehlerhaft repariert, kann die bestrahlte Zelle wesentlich durch drei Mechanismen an der Zellteilung gehindert werden: mitotischer Zelltod, primäre Apoptose sowie der Zellzyklusarrest.

Der mitotische Zelltod wird als Hauptmechanismus des strahleninduzierten Zelltods mit Defekten in der Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur diskutiert und entsteht durch aberrante und unkoordinierte Mitosen. Der Verlust an genetischem Material (azentrische Fragmente) oder unmittelbar durch Chromosomenaberrationen (Anaphasenbrücken) führen letztlich zum Verlust der Teilungsfähigkeit. Bei der Bestrahlung von G1-Phase-Zellen können drei relevante Aberrationstypen auftreten: die terminale und die interstitielle Deletion sowie das dizentrische Chromosom. Dabei entstehen die terminale Deletion aus nicht reparierten und die anderen beiden Aberrationen aus unvollständig reparierten DSBs. Die geschädigten Fragmente werden letztlich als Mikrokern aus der Zelle ausgeschleust und durch den Verlust von DNA und essentiellen Proteinen stellt die Zelle nach nur wenigen Teilungen die Proliferation irreversibel ein [20].

Eine weitere Möglichkeit der Zellinaktivierung ist die Einleitung der Apoptose (programmierter Zelltod). Obgleich sehr unterschiedlich auslösender Signale, werden in der Folge stets die gleichen Zelltod-Proteasen (Caspasen) und Nukleasen über eine definierte Reihenfolge aktiviert. Diese Reihenfolge ist abhängig von einem intaktem p53-Protein, so dass der Mechanismus in Zellen mit mutiertem oder vollständig deletiertem p53 nicht stattfinden kann [20]. Demnach spielt dieser Weg auch in HNSCC nachweislich keine Rolle, da hier p53 entweder mutiert (HPV-negative) oder durch E6 vollständig inaktiviert (HPV-positive) vorliegt.

Bestrahlung führt in Säugerzellen zu einem Arrest im Zellzyklus, wobei zwischen einem transienten und einem permanenten Arrest unterschieden wird. Der transiente Arrest kann in allen Zellzyklusphasen ausgelöst werden und dient dazu, geschädigte DNA zu reparieren, bevor die Zelle wieder in die S-Phase eintritt, während der permanente Arrest zur Zellinaktivierung führt. Beide Formen sind p53-abhängig und führen zu einer vermehrten Expression von p21, welches Komplexe aus Cyclin E und cyklinabhängiger Kinase Cdk2 -Proteins bindet und so die Phosphorylierung des Rb-Proteins verhindert. Die wichtigste Funktion des Rb-Proteins ist die Blockierung der transkriptionellen Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F, der die Expression von Genen reguliert, die für den Übergang von der G1 zur S-Phase notwendig sind. Der G1-Arrest wurde vorwiegend für normale humane Fibroblasten mit intaktem p53 beschrieben, nicht aber für andere Normalzellen oder Tumorzellen [20]. Dennoch zeigen einige wenige Tumorzelllinien nach Bestrahlung vermehrt seneszente Zellen, d.h. einen permanenten Arrest in der G1-Phase, der Telomer-unabhängig ist und p53-abhängig gesteuert wird.

1.4 Prognose von HPV-negativen und -positiven HNSCC

Für HPV-negative und HPV-positive HNSCC wird ein deutlich unterschiedliches Ansprechen auf die bisherigen Therapieregime beobachtet. Während das Gesamtüberleben in HPV-positiven HNSCC nach 5 bis 8 Jahren Beobachtungszeit bei über 70 % liegt, zeigen bei gleicher Therapie Patienten mit einem HPV-negativen HNSCC nur Überlebensraten von etwa 30 % [1, 48, 62].

Die aktuellen Behandlungsregime sind aber für beide Patientengruppen mit z.T. erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Ziel neuer Therapien für HPV-negative und -positive HNSCC ist daher vor allem die Reduktion von Kurz- und Langzeitnebenwirkungen mit deutlich verbesserter Lebensqualität bei gleichbleibender oder verbesserter Prognose [40, 90].

1.5 Gezielte Therapie

Aufgrund molekularbiologischer und biomedizinischer Fortschritte versprechen Target-Therapien (gezielte Krebstherapien) eine Verbesserung bei der Behandlung von HNSCC. Molekulare Ziele sind charakteristische Mutationen oder erhöhte Aktivitäten von Krebsgenen. Bei Kombination mit einer Strahlentherapie bedeutet dies die Anwendung von Substanzen oder Inhibitoren, durch die gezielt die Strahlenempfindlichkeit der Tumore gesteigert wird.

Große Chancen wurden beim HNSCC hinsichtlich des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) gesehen. Bei 90% der HNSCC liegt EGFR im Sinne einer Überexprimierung vor, was mit einer gesteigerten Zellproliferation und Tumorprogression einhergeht [9]. Durch eine Blockade des EGFR, wie z.B. mit Hilfe des Antikörpers Cetuximab, kann eine Steigerung der zellulären Strahlenempfindlichkeit erreicht werden [9]. Die beeindruckenden klinischen Erfolge einer Kombination aus Strahlentherapie und Cetuximab [8, 9, 40] konnten allerdings in Folgestudien nicht bestätigt werden [8, 9, 40, 65]

1.6 Molekulare Charakteristika von HPV-negativen und -positiven HNSCC

Das bessere Ansprechen der HPV-positiven HNSCC wird auf eine höhere zelluläre Strahlensensitivität dieser Tumore zurückgeführt [2, 42, 69]. Als Ursache hierfür wird nicht der verstärkte Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 in den HPV-positiven Zellen [76] angesehen, sondern ein Defekt der DNA-Doppelstrangbruchreparatur [36, 66, 67], insbesondere der Homologen Rekombination [97]. Auch Möller et al. [58] finden in einer Studie mit 89 HNSCC, dass in den HPV-positiven Proben die Expression von wichtigen Regulatoren der homologen Rekombination wie ATM, ATR und RAD51 reduziert ist.

Bisherige Annahmen, dass die Strahlensensitivität in einer unterschiedlichen genomischen Instabilität von HNSCC begründet liegt, konnten in neuesten Studien in unserem Labor widerlegt werden [3]. Dabei zeigen Chromosomenanalysen keinen signifikanten Unterschied bezüglich numerischer Chromosomenaberrationen. Alle untersuchten HNSCC weisen unabhängig vom HPV-Status eine deutliche Aneuploidie mit einem hyperdiploiden bis hypertriploiden Chromosomensatz auf [3]. Die Ergebnisse sind mit anderen Studien [32, 78] vereinbar. Signifikante Unterschiede zeigen sich allerdings in der Ausbildung struktureller Chromosomenaberrationen. Während sich in HPV-negativen HNSCC-Zellen ein heterogenes Bild abzeichnet, in dem nahezu alle Chromosomen unterschiedlich stark an Translokationen beteiligt sein können, beschränken sich diese in HPV-positiven Tumoren auf wenige Chromosomen unter der besonderen Beteiligung von Chromosom 3 [3]. Chromosom 3 enthält eine Vielzahl von Genen, die für die Tumorprogression als auch für die Reparatur von DSB verantwortlich sind.

1.7 Der PI3K/mTOR-Signalweg

Aufgrund der ausbleibenden Erfolge bei der Etablierung einer neuen zielgerichteten und wirksamen Therapie für HNSCC besteht weiterhin ein großer Bedarf, neue Zielstrukturen für eine verbesserte Behandlung zu identifizieren und mögliche Kombinationen zu evaluieren.

Eine für HNSCC sehr wichtige Zielstruktur ist der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg (Abb.1).

Er ist neben der EGFR-Signalkaskade einer der am häufigsten in HNSCC mutierten Signaltransduktionswege [83] mit Veränderungen sowohl in HPV-negativen als auch -positiven HNSCC [87]. Während in HPV-positiven Tumoren vor allem aktivierende Mutationen des PI3K/Akt/mTOR-Weges gefunden werden, liegen in Noxen-induzierten Tumoren vorwiegend Mutationen von PTEN, einem Inhibitor des PI3K, vor. Durch die Inhibierung von PTEN kommt es zu einer fortlaufenden Stimulierung der Signalkaskade und damit zur Tumorprogression.

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg leitet nach Aktivierung Wachstumssignale von außerhalb der Zelle ins Zellinnere [18, 34]. Die Initiation geschieht an der Zellmembran durch die Bindung spezifischer Liganden an ein membranständiges Rezeptortyrosinkinasedimer. Zu diesen gehören u.a. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie EGFR und IGF-1R bzw. Zelladhäsionsmoleküle und Onkogene. Durch die Ligandenbindung wird das Enzym PI3K an die Membran rekrutiert und aktiviert, woraufhin durch die p110-Untereinheit das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert wird. PIP₃ ist ein Second Messenger in der Zelle, der u.a. an Proteine wie die PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase 1) sowie die Serin/Threoninkinase Akt bindet, so dass es zur Verlagerung dieser Proteine an die Zellmembran kommt. Antagonist der Reaktion ist der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*). Er sorgt für die Dephosphorylierung von PIP₃ zurück zu PIP₂ und unterbindet damit die Aktivierung der PDK1 und Akt [52].

Akt phosphoryliert ERK und aktiviert eine Vielzahl von Proteinen, die eine wesentliche

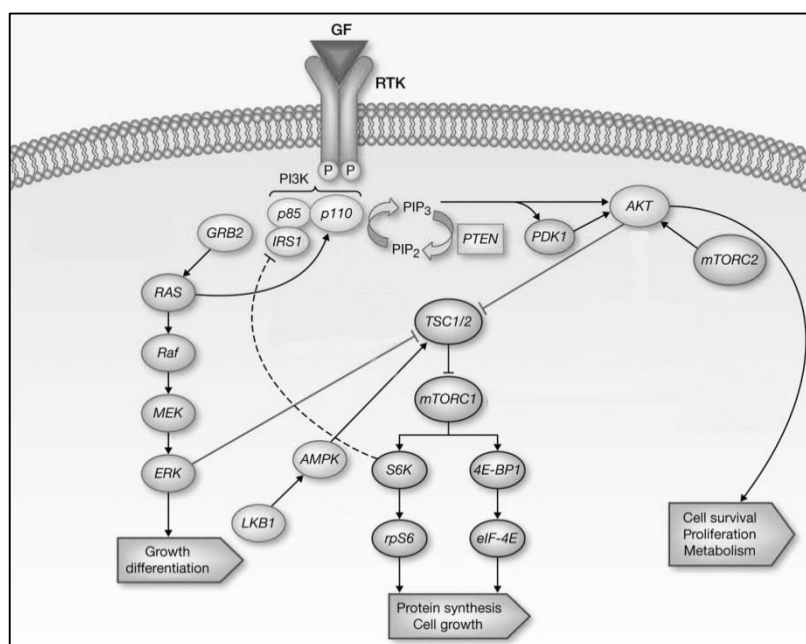


Abb. 1: PI3K/Akt/mTOR-Signalweg.

Die Graphik wurde der Arbeit (Dienstmann et al. 2014, Mol Cancer Ther) entnommen und leicht verändert. Abgedruckt mit Genehmigung von American Association for Cancer Research.

Schlüsselrolle auf das Zellwachstum, die Proliferation sowie das Zellüberleben haben. Für diese Funktion muss das Protein selbst zunächst an zwei bestimmten Aminosäuren phosphoryliert werden, was im ersten Schritt durch die PDK1 an der Aminosäure Thr308 und im zweiten Schritt durch Akt selbst an der Position Ser473 initiiert wird [52].

Das Enzym mTOR ist eines der wichtigsten nachgeschalteten Proteine von Akt. Die Aktivierung des Enzyms kann sowohl direkt durch Akt als auch indirekt durch TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2, tuberin*) erfolgen. Physiologisch liegt es in zwei verschiedenen Komplexen vor: als mTOR1, wenn an das Enzym Raptor gebunden oder als mTOR2, wenn es an das Enzym Rictor gebunden ist. Der mTOR1-Komplex beeinflusst weitere nachgeschaltete Effektoren, wie die S6 Kinase 1 (S6K1) sowie 4E-BP1 [52]. Beide Enzyme wirken stimulierend auf die Proteintranslation und führen so zur Synthese von Schlüsselproteinen der Zellproliferation und des Zellwachstums. Zudem kann die S6K1 den mTOR1-Komplex stimulieren und die Aktivierung aufrechterhalten. Der mTOR2-Komplex wirkt ebenfalls durch eine positive Rückkopplungsschleife stimulierend auf das Akt-Protein, in dem es dieses an der Position Ser473 phosphoryliert.

PI3K-Mutationen haben nicht nur Einfluss auf die Tumorgenese, sondern korrelieren mit einer schlechteren Prognose sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie [83]. Somit bietet eine Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs einen wichtigen Ansatzpunkt zur Überwindung einer Therapieresistenz mit dem erklärten Ziel einer Therapie-Deeskalation und konsekutiver Senkung von Kurz- und Langzeitnebenwirkungen. Zahlreiche Studien an soliden Tumoren zeigen bereits beeindruckende Erfolge im Therapieansprechen durch PI3K-Inhibitoren *in vitro*. Dabei wurden diese Ergebnisse entweder durch die Monotherapie mit spezifischen Inhibitoren als auch in Kombination mit Bestrahlung erreicht. Zu den Inhibitoren der ersten Generation gehören Substanzen, die äußerst spezifisch einzelne Proteine des Signalwegs inhibieren wie z.B. LY294002 und Wortmannin [13], die gegen die katalytische Untereinheit der PI3K gerichtet sind, wohingegen Rapamycin und seine Derivate (Everolimus, Temsirolimus) ihre Wirkung vorwiegend über die Blockade der mTOR-Funktion erzielen [18].

In vielen Experimenten zeigte sich allerdings, dass es bei Hemmung einzelner Schritte des Signalwegs paradoxerweise zu einem verbesserten Überleben der Tumorzellen nach Behandlung kommt [68]. Dies lässt sich durch die Induktion von Rückkopplungsmechanismen und einer folglich übersteigerten Aktivität des Akt-Proteins erklären [61]. Außerdem zeigen einige der Inhibitoren der ersten Generation nur eine geringe Spezifität, Stabilität oder Löslichkeit in Wasser, was in Mausmodellen zu starken Nebenwirkungen wie Lethargie und Atemdepression geführt hat [28, 66].

1.8 Dualer PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235

Um eine effektive Inhibition des PI3K/mTOR-Signalweges zu erreichen, muss der Inhibitor an möglichst mehreren Stellen gleichzeitig angreifen [18]. Eine dieser Substanzen der neuen Generation ist der duale ATP-kompetitive Inhibitor NVP-BEZ235 (BEZ235, Dactolisib) [53, 82]. Es handelt sich dabei um ein Imidazoquinolinderivat, welches über eine hohe Spezifität gegenüber dem katalytischen Zentrum der PI3K-Kinase sowie dem Enzym mTOR verfügt. Dies ist möglich, da die DNA-Sequenz der Kinase-Domäne beider Proteine hochkonserviert und strukturell sehr ähnlich ist [61]. Darüber kann BEZ235 simultan beide Kinasen schon bei Dosen im nanomolaren Bereich inhibieren [61].

Bereits in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien an verschiedenen soliden Tumoren konnte die potente antiproliferative Wirkung von BEZ235 auf Tumorzellen nachgewiesen werden [15, 43, 53, 82]. Es zeigte sich, dass bei Hemmung des PI3K/mTOR-

Signalweges durch BEZ235 auch eine Strahlensensibilisierung erreicht werden kann [15, 23, 25, 43, 95], die vom jeweiligen Behandlungsprotokoll und der damit einhergehenden Wirkdauer abhängt [45, 46].

Die strahlensensibilisierende Wirkung von BEZ235 ist dabei nicht auf eine erhöhte Apoptose [23, 43, 45, 46], sondern vor allem auf eine Behinderung der DSB-Reparatur [23, 25, 61] zurückzuführen. Diese Behinderung scheint auf einer Hemmung der zur Familie der PI3KK gehörenden Kinasen ATM und DNA-PKcs zu beruhen. Dabei handelt es sich um Schlüsselproteine der DNA-Reparatur, wodurch sowohl das NHEJ als auch HR blockiert werden kann [61]

1.9 Fragestellungen der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollte erstmalig geklärt werden, ob durch den dualen Inhibitor BEZ235 sowohl in HPV-negativen als auch -positiven HNSCC-Zellen eine effektive Strahlensensibilisierung erreicht werden kann und ob und inwieweit allein die Hemmung der DSB-Reparatur dafür verantwortlich ist. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob diese Hemmung sowohl auf eine Unterdrückung des NHEJ als auch der HR zurückzuführen ist.

Um Unterschiede in den Zelllinien zu erfassen, sollten diese Untersuchungen an insgesamt vier HPV-negativen und vier HPV-positiven Linien durchgeführt werden.

Grundsätzlich sollten somit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Kann durch den dualen Inhibitor BEZ235 sowohl in HPV-negativen als auch -positiven HNSCC-Zellen eine effektive Strahlensensibilisierung erreicht werden?
2. Kann durch den dualen Inhibitor BEZ235 eine Hemmung der DSB-Reparatur erreicht werden?
3. Beruht die Hemmung der DSB-Reparatur des Inhibitors BEZ235 auf einer Hemmung des NHEJ oder der HR?
4. Kann die Strahlensensibilisierung der HNSCC-Zellen nach Inhibition des PI3K/mTOR-Signalwegs durch BEZ235 allein auf die Hemmung der DSB-Reparatur zurückgeführt werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab.1: Auflistung der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
Analoger Rollenmischer	RS-TR 5	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	INCO153med	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Dispenser	Isopenser	ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Deutschland
Feinwaage	Summit SI-64	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Gefrierschrank -20 °C	MediLine LKPv 6520	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Herafreeze Typ HFU 586 Basic	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Heizblock	ThermoCell CHB-202	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China
Mikroskop	Motorised research inverted system microscope IX81	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Kleinbrutschrank	Heraeus B 15	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kühl-Gefrier-Kombination	Comfort	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Magnetrührer	MIX 1 eco	2mag AG, München, Deutschland
Mikroliterpipetten	Reference® 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge	Heraeus FRESCO 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pipettierhelfer	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Präzisionswaage	MXX-412	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Röntgenbestrahlungsanlage	X-RAD 320 iX	Precision X-Ray Inc., North Branford, CT, USA
Sterilbank	HERASAFE KS 12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS UW 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Universalzentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vertikaler Standautoklav	V-65	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Vortex-Schüttler	MX-S	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wippender Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen,

 Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab.2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
Deckgläser	15 mm x 15 mm	VWR International, Radnor, PA, USA
Einmalspritzen	20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Flaschenaufsatzfilter	Durapore 0,22 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Mikroreaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SuperFrost®Plus Objektträger	L 76 x B 26 mm x 1 mm.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Soda-Glas, 150 mm	LLG Labware GmbH, Meckenheim, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen	5 ml für Durchflusszytometrie	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Membranfilter 0,2 µm PTFE	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zellkulturgefäße	TC-Schale 60 mm / 100 mm Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Software

Tab.3: Auflistung der verwendeten Software.

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA	Statistik, Visualisierung
Microsoft Office 2010 Professional	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA	Datenauswertung

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tab.4: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung (Abkürzung)	Hersteller
Accutase®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Alkylphenylpolyethylenglykol (Triton® X-100)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland

Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium, ohne Magnesium (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut, unvergällt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut, vergällt	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS superior)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Glycerol, reinst	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MEM Non Essential Amino Acids Solution 100x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
NVP-BEZ235	Selleckchem, München, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween® 20)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI-1640 Medium ohne L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure 37 % (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Stabiles Glutamin 200 mM	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
Trypsin-EDTA 1x	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid 35 % (H_2O_2)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien

2.1.5 Allgemeine Puffer und Reagenzien

Ethanol 70 % für Reinigungszwecke

Ethanol absolut, vergällt 3,5 l
vollentsalztes Wasser ad 5 l

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 10x, pH 7,4

zur Zubereitung von 1xPBS 1:10 mit vollentsalztem Wasser verdünnt

NaCl 80 g
KCl 2 g
 Na_2HPO_4 14,4 g
 KH_2PO_4 2,4 g
vollentsalztes Wasser ad 1 l

2.1.6 Zellkulturmedium

<i>Zellkulturmedium</i>	<i>Lagerung bei +4 °C</i>
Roswell's Park Memorial Institute (RPMI-1640)	500 ml
Fetales Kälberserum	50 ml
MEM Non Essential Amino Acids Solution 100x	5 ml
Stabiles Glutamin 200 mM	5 ml

2.1.7 Zellkulturlinien

Tab.5: Übersicht über die verwendeten HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Linien

HPV-negativ							
<i>Zelllinie</i>	<i>Alter/ Geschlecht</i>	<i>p53- Status</i>	<i>TNM</i>	<i>Grading</i>	<i>Loka- lisation</i>	<i>Therapie</i>	<i>Quelle</i>
UM-SCC-3	73 / f	p53mut	T1N3M0	G3	Nase	kT	UM
UM-SCC-6	37 / m	p53mut	T2N0M0	G2-G3	Zunge	kT	UM
UM-SCC-11b	65 / m	p53mut	T2N2aM0	ub.	Larynx	CT	UM
UT-SCC-33	86 / f	p53mut	T2N0M0	G2	Mund- höhle	kT	UT
HPV-positiv							
UD-SCC-2	58 / m	p53wt	T1N3M0	G3	Hypo- pharynx	ub.	DU
UM-SCC-47	53 / m	p53wt	T3N1M0	G1-G2	Zunge	ub.	UM
UM-SCC-104	56 / m	p53wt	T4N2bM0	G2	Mund- höhle	RT/CT	UM
93VU-147T	58 / m	p53wt	T4N2M0	ub.	Mund- höhle	kT	UA

UD, Universität Düsseldorf; UT, Universität Turku; UM, Universität Michigan; UA, Universität Amsterdam;

kT, keine Therapie; CT, Chemotherapie; RT, Radiotherapie; ub., unbekannt;

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Die einzelnen Zelllinien wurden in Petrischalen (PS) mit einem Durchmesser von 10 cm und einer Wachstumsfläche von 58 cm² unter Verwendung des oben beschriebenen Zellkulturmediums gehalten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung in wassergesättigter Atmosphäre. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte zweimal wöchentlich über maximal 20 Passagen.

Zum Passagieren der Zellen wurde verbrauchtes Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Ein Ablösen der adhären wachsenden Zellen erfolgte nach Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA und einer Inkubationszeit von 5-15 Minuten, abhängig von der verwendeten Zelllinie. Die Enzymreaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 7 ml Zellkulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine 4-minütige Zentrifugation bei 300 g. Der entstandene Überstand wurde anschließend abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Aussaat der Zellen in ein neues Kulturgefäß erfolgte in definierter Zellzahl in Abhängigkeit von den Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinie.

2.2.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur mit Hilfe der Röntgenbestrahlungsanlage X-RAD 320iX im strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) mit den in Tab.7 angegebenen Spezifikationen. Zur Aufhärtung des Strahls wurde ein Kupfer-/Aluminiumfilter mit jeweils 0,5 mm Dicke verwendet. Die Verifikation der Bestrahlungsprotokolle erfolgte in regelmäßigen Abständen durch Medizinphysikexperten der Abteilung.

Tab.7: Bestrahlungsparameter.

Eigenschaft	Wert
Energiedosis	2 Gy, 4 Gy
Anodenspannung	320 kV
Stromstärke	10 mA
Dosisrate	1,2 Gy/min
Fokus-Objekt-Abstand	60 cm
Filter	0,5 mm Kupfer, 0,5 mm Aluminium

2.2.3 Behandlung der Zellen

50 mg NVP-BE235 wurden in DMSO in einer Konzentration von 500 μ M gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung von 50 nM wurde die Stocklösung für die jeweiligen Versuche durch Verdünnung in Zellkulturmedium jeweils frisch hergestellt. Für die Lösungsmittelkontrolle wurde die gleiche Menge an DMSO zu den Zellen gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit 0 Gy bzw. 2 Gy bestrahlt. Nach einer Reparaturzeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und über 15 Minuten auf dem Taumelschüttler mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) inkubiert und anschließend nach dreimaligen Waschen mit PBS über jeweils 10 Minuten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Permeabilisierung der Zellwand wurden die Zellen mit der in Tab. 8 angegebenen Lösung über 10 Minuten auf dem Taumelschüttler inkubiert und anschließend mit einer 3 % BSA/PBS-Lösung zur Blockierung des unspezifischen Hintergrunds über eine Stunde behandelt.

2.2.4 Koloniebildungstest

Dazu wurden Einzelzellen in definierter Anzahl ausgesät und nach der Behandlung so lange inkubiert, bis sich Kolonien mit mindestens 50 Zellen gebildet hatten. Eine unbehandelte Kontrollgruppe diente zur Bestimmung der zelllinienspezifischen Plattierungseffizienz und ermöglichte die Berechnung der Überlebensfraktion nach Einwirken der Noxe.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Falls nicht anders angegeben wurde bei den folgenden Arbeitsschritten mit einem Volumen von jeweils 1 ml / Well bei Raumtemperatur (RT) gearbeitet. Zur Aussaat der Zellen wurden sterile Deckgläser (DG) aus Glas mit einem Durchmesser von 15 mm in 12-Well-Platten gelegt und die Zellen mit einer Zellzahl von 2×10^4 Zellen/ cm^2 in das Well gesät. Für jede Zelllinie wurden pro Experiment jeweils zwei 12-Well-Platten verwendet. Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank bis zum Versuchsstart inkubiert.

DNA-Doppelstrangbrüche wurden mittels γ H2AX-Technik fluorometrisch nachgewiesen und die Zellzyklusphasen über die Signalstärke des Zentromer-spezifischen Proteins CenpF bestimmt. Die Expression von CenpF beginnt in der frühen S-Phase und erreicht ihr Maximum in der G2-Phase.

Die primären Antikörper (AK) wurden in einem Verhältnis von 1:500 (γ H2AX) und 1:750 (CenpF) verdünnt und die DG mit der Zellseite nach unten in einem Gesamtvolumen von jeweils 40 μ l für eine 1 Stunde unter Lichtabschluss in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die DG mit der Zellseite nach oben zurück in die 12-Well-Platten überführt und dreimal mit einer 0,5 % Tween® 20/PBS Waschlösung gewaschen. Die sekundären AK wurden unter vollkommenen Lichtabschluss in einem Verhältnis von jeweils 1:800 (Alexa Fluor 594) und 1:1200 (Alexa Fluor 488) verdünnt und analog dem zuvor beschriebenen Vorgehen verwendet. Final wurden die DG in jeweils 5 μ l Eindeckmedium (ProLong Gold mit DAPI, Thermo Scientific) auf Objektträger mit der Zellseite nach unten eingebettet. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) diente hierbei zur Gegenfärbung der Zellkerne.

Die Objektträger wurden bis zur Auswertung bei 4°C unter Lichtabschluss gelagert. Die verwendeten Lösungen und Antikörper sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tab.8: Zusammensetzung der γ H2AX-Immunfluoreszenz

NVP-BEZ235	Selleckchem, München, Deutschland Cat. No. S1009, LOT Nummer 11
Permeabilisierungslösung	1 x PBS ; 1 % BSA ; 0,2 % Triton X-100
Blockierlösung	1 x PBS; 3 % BSA
Waschlösung	1 x PBS; 0,5 % Tween® 20
Antikörperlösung	1 x PBS; 1 % BSA; 0,5 % Tween® 20
Primäre Antikörper	Mouse anti-phospho-Histone H2AX –Klon JBW310, Millipore Rabbit anti-CenpF antibody – LS-B275 LSBio Lifespan Biosciences
Sekundäre Antikörper	Alexa Fluor-594 conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) – Invitrogen A-11005 Alexa Fluor-488 conjugated donkey anti-rabbit IgG (H+L)– Invitrogen A-21206
Eindeckmedium	ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI – ThermoFisher Scientific P36931

2.2.6 Mikroskopische Auswertung

Zur Quantifizierung der DSB erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX81) bei 60-facher Vergrößerung. Repräsentative Zellen wurden fotografiert und Z-Stapel zur Abbildung des gesamten Zellkerns mit der *Xcellence Imaging Software* angefertigt. Bei diesem Verfahren wird das Präparat optisch in axiale Bildstapel aus verschiedenen Fokusebenen geschnitten. Auf Basis von Algorithmen werden die scharfen Details jeder Einzelaufnahme extrahiert und rechnerisch wieder zusammengefügt, was zu einem detailreichen und durchgehend scharfen Bild hoher Qualität führt. Zellen mit starkem pannukleären Signal wurden in der Analyse nicht berücksichtigt. Für jede Probe wurden mindestens 100 Zellkerne ausgewertet. Die manuelle Auszählung der γ H2AX-Foci erfolgte am Computer nach Konvertierung der Bilder in ein PNG-Format.

2.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Daten der einzelnen Untersuchungen in

Excel übertragen. Die Berechnung des arithmetischen Mittelwerts, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) wurden ebenfalls mit dieser Software berechnet.

Im Anschluss wurden die Daten für die weitere statistische Auswertung und zur Generierung der Abbildungen in das Programm Graph Pad Prism überführt. Bei einem P-Wert < 0,05 gelten die Daten als statistisch signifikant bei P < 0,001 als hoch signifikant, was in den Abbildungen mit den Symbolen (* bzw. **) gekennzeichnet wird.

3 ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit

Erstes Ziel der Arbeit war es, die Wirkung von BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit der HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zellen zu untersuchen.

Für diese Versuche wurde das Überleben der Zellen mittels Koloniebildungstest bestimmt (Abb. 2A). Abb. 2B zeigt den Einfluss von 50 nM BEZ235 auf die

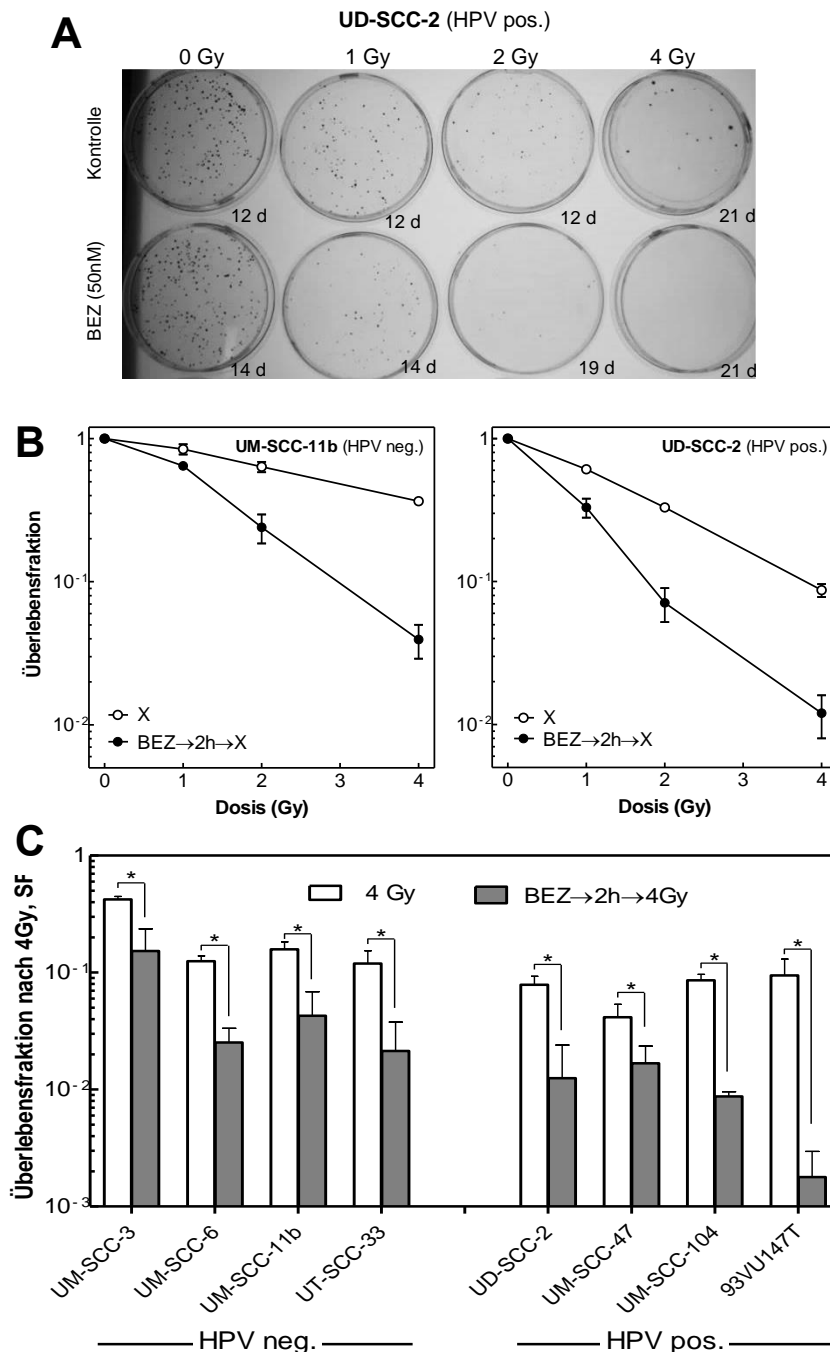


Abb.2: Wirkung von BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit.

A) Nachweis des Zellüberlebens mittels Koloniebildungstest. B) UM-SCC-11b und UD-SCC-2 Zellen wurden mit und ohne 50 nM BEZ235 inkubiert und nach 2 Stunden mit Dosen bis zu 4 Gy bestrahlt. C) Zellen wurden mit und ohne 50 nM BEZ235 inkubiert und nach 2 Stunden mit 4 Gy bestrahlt.

Strahlenempfindlichkeit einer HPV-negativen (UM-SCC-11b) und einer HPV-positiven (UD-SCC-2) Zelllinie. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit 50 nM BEZ235 inkubiert und dann nach 2 Stunden mit Röntgendosen bis zu 4 Gy bestrahlt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bis zu 21 Tage, so dass auch in behandelten Zellen eine ähnlich große Koloniegröße wie in unbehandelten Zellen (Abb. 2A) heranwachsen konnte. In Vorversuchen war bereits geklärt worden, dass diese Konzentration von BEZ235 ausreicht, um den PI3K/mTOR-Signalweg effizient zu unterdrücken [75]. Es wurde deutlich, dass BEZ235 allein keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate hat, wohl aber die Strahlenempfindlichkeit der beiden ausgewählten Zelllinien deutlich steigert.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von BEZ25 auf die Strahlenempfindlichkeit aller vier HPV-negativen und vier HPV-positiven HNSCC-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen - mit und ohne Vorbehandlung über 2 Stunden mit 50 nM BEZ235 - mit 4 Gy bestrahlt und wiederum die Überlebensraten mit Hilfe des Koloniebildungstests bestimmt. Ohne Vorbehandlung mit BEZ235 wurde eine signifikant höhere ($P=0,012$) Überlebensrate in HPV-negativen Zellen ($MW = 0,206 \pm 0,072$) im Vergleich zu HPV-positiven Zellen ($MW = 0,075 \pm 0,012$) ermittelt (Abb. 2C).

Die alleinige Behandlung mit 50 nM BEZ235 hatte keinen deutlichen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen. Lediglich für die HPV-positiven HNSCC-Zellen wurde eine geringe Abnahme auf im Mittel $80 \pm 5\%$ gemessen. Wurde BEZ235 dagegen mit einer Bestrahlung von 4 Gy kombiniert, so konnte für alle Linien eine klare Abnahme der Überlebensraten gemessen werden (Abb. 2C). Dies galt sowohl für HPV-negative als auch für HPV-positive HNSCC-Zellen. Damit spiegeln diese Daten wider, dass unabhängig vom HPV-Status durch BEZ235 eine deutliche Steigerung der Strahlenwirkung erreicht werden konnte.

3.2 DSB-Reparatur in HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zellen

3.2.1 Quantifizierung der DSB durch den γ H2AX-Assay

Mit Hilfe der γ H2AX-Technik sollte die Wirkung von BEZ235 auf die Reparatur der DSB bestimmt werden. Dazu wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt, so dass die Kerne bei Anregung mit ultraviolettem Licht blaues Licht emittieren, wie es in Abb. 3A und B dargestellt ist. Bei Co-Färbung der γ H2AX-Foci mit dem H2AX-spezifischen Antikörper bzw. dessen Fluoreszenzmarker Alexa594 (rot) und dem S- und G2-Phase-abhängigen Protein CenpF bzw. dessen Fluoreszenzmarker Alexa488 (grün) konnte so das Signal spezifisch im Kern lokalisiert werden.

Abb. 3A und B zeigen den mit dieser Methode möglichen Nachweis von DSB in unbehandelten sowie mit 2 Gy bestrahlten Zellen einer HPV-negativen (UM-SCC-11b) sowie einer HPV-positiven Zelllinie (UM-SCC-104). Zu erkennen ist, dass sich bereits in den unbehandelten Zellen ein endogener Zellschaden (roter γ H2AX-Foci) nachweisen lässt. Nach Bestrahlung mit 2 Gy und anschließender Reparaturinkubation von 24 Stunden liegt eine deutliche höhere Zahl an Foci vor. Da nach dieser Inkubationszeit die Reparatur der DSB bereits nahezu abgeschlossen ist, stellen diese ausschließlich sogenannte residuelle Reparaturfoci dar.

Dank der immunhistochemischen Färbung mit CenpF ist zusätzlich eine Unterscheidung bezüglich der Zellzyklusphasen möglich. Zellen, die kein CenpF exprimieren und ausschließlich durch den DNA-Farbstoff DAPI (blau) detektiert werden,

sind der G1-Phase zuzuordnen. Zellen hingegen, die ein starkes CenpF-Signal zeigen, sind der G2-Phase und Zellen, die ein schwaches CenpF-Signal zeigen, der S-Phase zuzuordnen.

Bei Überlagerung aller drei Farben (Abb. 3A und B, letzte Spalte) konnte somit bestimmt werden, wie viel residuelle γ H2AX-Foci jeweils in G1-, S- bzw. G2-Phase-Zellen vorliegen. Abb. 3A und B machen aber auch deutlich, dass bei schwacher CenpF-Expression nicht immer eine eindeutige Zuordnung zur S-Phase möglich ist. Daher wurden im Folgenden nur solche Zellen ausgewertet, die aufgrund einer eindeutig

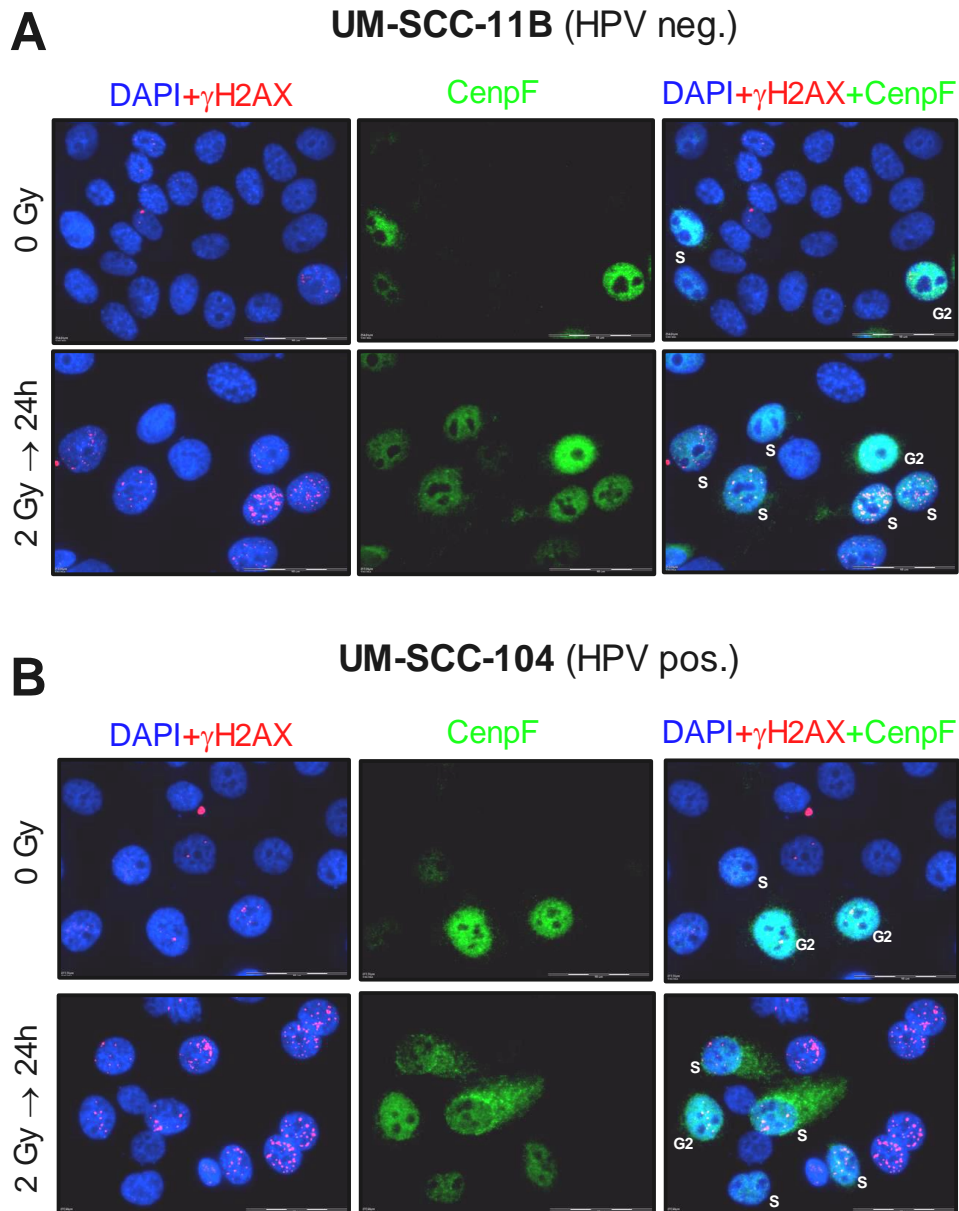


Abb.3: Nachweis von DSB mittels γ H2AX-Assay in Kombination mit CenpF. Unbehandelte (0 Gy) sowie bestrahlte Zellen mit anschließender Reparaturinkubation für 24 Stunden (2 Gy → 24 h) wurden fixiert und die γ H2AX-Reparaturfoci mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. Die Differenzierung der Zellzyklusphase erfolgte durch Nachweis des Zentromer-spezifischen Proteins F (CenpF). G1-Zellen zeigen kein CenpF, S-Phase-Zellen eine moderate und G2-Phase-Zellen eine starke CenpF-Färbung. Zur besseren Übersicht wurden lediglich S- und G2-Phase-Zellen gekennzeichnet. A). UM-SCC-11b (HPV-negativ); B. UD-SCC-2 (HPV-positiv).

negativen CenpF-Färbung der G1-Phase bzw. bei einer ausgeprägten CenpF-Färbung der G2-Phase zugeordnet werden konnten.

Ausgehend von diesen Detektionsmöglichkeiten wurde die Zahl der residuellen γ H2AX-Foci in unbehandelten sowie mit 2 Gy bestrahlten Proben bestimmt, wobei unterschieden wurde, ob diese in G1- oder G2-Phase-Zellen vorlagen.

Abb. 4 und 5 zeigen die Häufigkeitsverteilungen, wie sie in einzelnen Versuchen für UM-SCC-11b bzw. UD-SCC-2-Zellen entnommen wurden. Abb. 4 zeigt dabei die Verteilungen, wie sie sich für G1-Phase-Zellen (CenpF-) ergaben. Aufgetragen wurde hierbei jeweils der Anteil der G1-Phase-Zellen mit einer bestimmten Zahl an Foci. Ohne

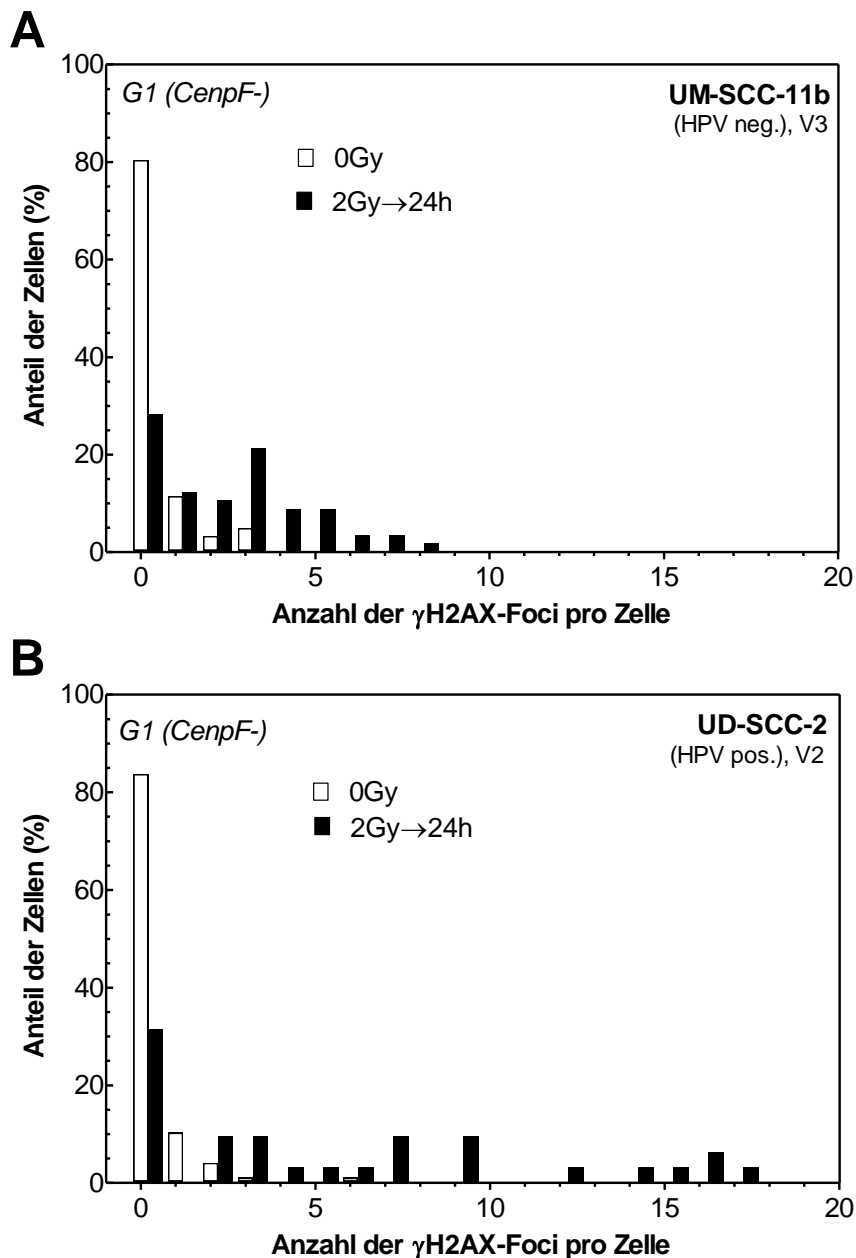


Abb.4: Verteilung der γ H2AX-Foci in unbehandelten und bestrahlten G1-Phase-Zellen. Unbehandelte (0 Gy) sowie bestrahlte Zellen mit anschließender Reparaturinkubation für 24 Stunden (2 Gy → 24 h) wurden fixiert und die γ H2AX-Reparaturfoci mittels Immunhistochemie in G1-Phase-Zellen (CenpF-) nachgewiesen. A). UM-SCC-11b (HPV-negativ), 3. Versuch (V3); B). UD-SCC-2 (HPV-positiv), 2. Versuch (V2).

Behandlung lag in den weitaus meisten G1-Phase-Zellen kein γ H2AX-Signal vor. Nur in wenigen Zellen wurden ein oder sogar mehrere Foci gemessen. Für bestrahlte G1-Phase-Zellen dagegen zeigte sich eine breite Verteilung mit bis zu 17 Foci, wie es für die HPV-positive Linie UD-SCC-2-Zellen in der G1-Phase ermittelt wurde.

Die entsprechenden Verteilungen für G2-Phase-Zellen sind in Abb. 5A und B dargestellt. Auch bei unbehandelten G2-Phase-Zellen lagen nur sehr wenige γ H2AX-Foci vor. Allerdings war deren Anzahl im Vergleich zu G1-Phase-Zellen im Mittel deutlich höher. In bestrahlten G2-Phase-Zellen wurden wiederum deutlich höhere Werte gemessen mit einer sehr breiten Verteilung von bis zu 20 Foci pro Zelle.

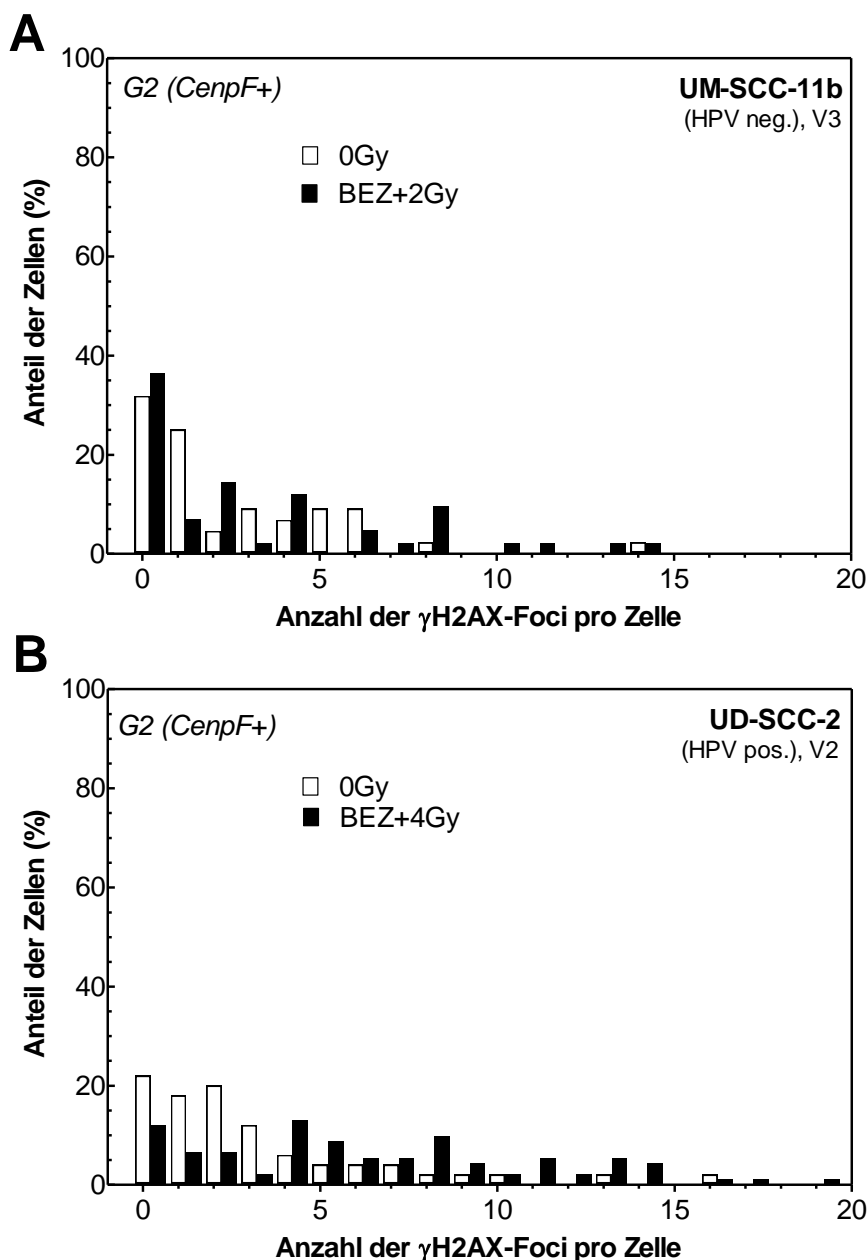


Abb.5: Verteilung der γ H2AX-Foci in unbehandelten und bestrahlten G2-Phasezellen. Unbehandelte (0 Gy) sowie bestrahlte Zellen mit anschließender Reparaturinkubation für 24 Stunden (2 Gy \rightarrow 24 h) wurden fixiert und die γ H2AX-Reparaturfoci mittels Immunhistochemie in G2-Phase-Zellen (CenpF+) nachgewiesen. A). UM-SCC-11b (HPV-negativ), 3. Versuch (V3); B). UD-SCC-2 (HPV-positiv), 2. Versuch (V2).

Um diese Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen zu erfassen, wurde ein Schwellenwert von 5 Foci pro Zelle definiert. Entsprechend dieses Schwellenwerts wurde jeweils der Anteil der Zellen mit mehr als 5 Foci bestimmt. Für die in den Abbildungen 4 und 5 dargestellten Verteilungen wurden die so ermittelten Werte in der Tabelle 9 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass der Anteil mit mehr als 5 Foci pro Zelle bei den bestrahlten Zellen deutlich höher ist als bei den unbehandelten und insgesamt bei der HPV-positiven Linie UD-SCC-2 höher ist als bei der HPV-negativen Linie UM-SCC-11b.

Tab.9: Anteil der Zellen mit ≥ 5 Foci in unbehandelten und bestrahlten Zellen

Dosis (Gy)	UM-SCC-11b (HPV neg.), V3		UD-SCC-2 (HPV pos.) V2	
	G1 (CenpF-)	G2 (CenpF+)	G1 (CenpF-)	G2 (CenpF+)
0	0	29	1	28
2	26	39	48	59

Abb. 6 zeigt die jeweiligen Anteile, die in G1- und G2-Phase-Zellen für die jeweils vier HPV-negativen und -positiven HNSCC-Linien bestimmt wurden. In unbehandelten G1-Phase-Zellen wurden für beide Entitäten in der Regel sehr niedrige Werte gemessen,

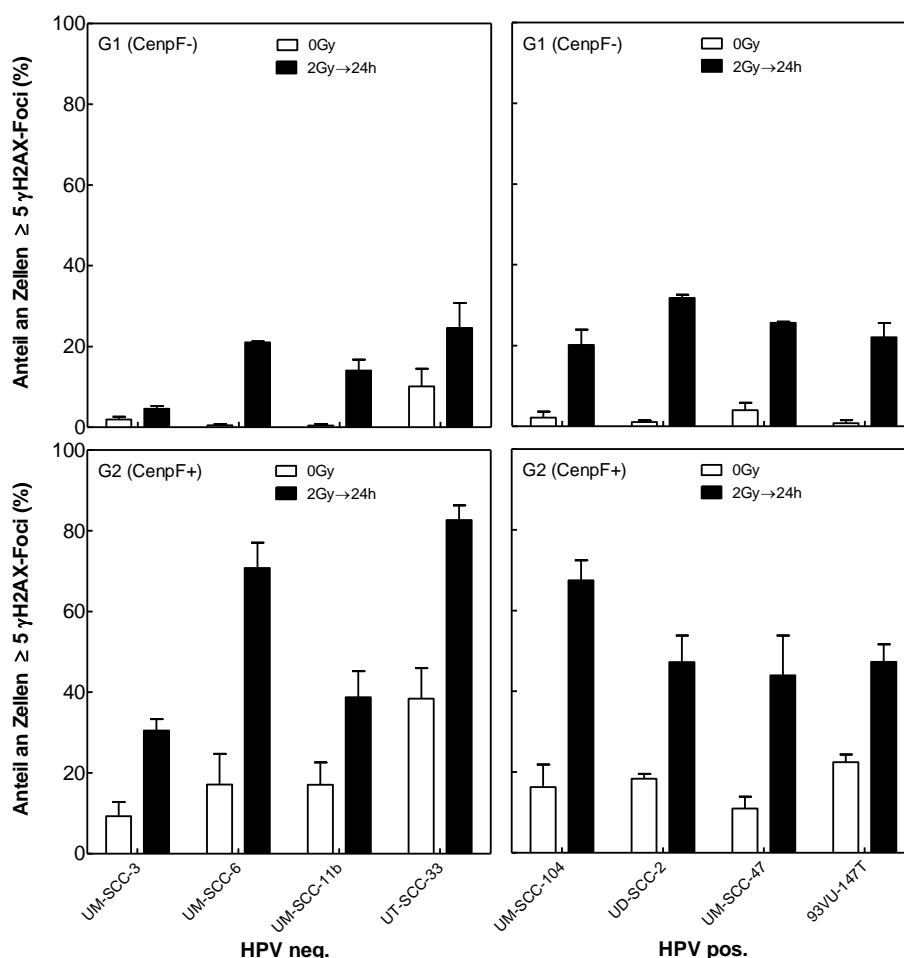


Abb.6: DSB-Reparatur in HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zellen.

Unbehandelte (0 Gy) sowie bestrahlte Zellen mit anschließender Reparaturinkubation für 24 Stunden (2 Gy → 24 h) wurden fixiert und die γ H2AX-Reparaturfoci mittels Immunhistochemie in G1- (CenpF-) sowie G2-Phase-Zellen (CenpF+) nachgewiesen.

mit einem Mittelwert von 2%. Lediglich in der Linie UT-SCC-33 lag ein sehr hoher Wert von 10% vor. Deutlich höhere Anteile dagegen wurden für unbehandelte G2-Phase-Zellen ermittelt. Hier lag der Anteil der Zellen mit $5 \geq$ Foci im Mittel bei 15% und in der Linie UT-SCC-33 sogar bei 38%.

Um die alleinige Wirkung der Strahlung erkennen zu können, war es erforderlich, den Anteil nach Bestrahlung jeweils um den entsprechenden Anteil der unbehandelten Zellen zu korrigieren. Die so bestimmten Werte zeigt Abbildung 7. Im Mittel war für beide Entitäten eine breite Streuung zu erkennen. In G1-Phase-Zellen variierten diese Werte für HPV-negative Zellen zwischen 3 und 21%, mit einem Mittelwert von $13 \pm 4\%$. Für HPV-positive Zellen lagen diese Werte signifikant höher ($P=0,028$) mit einem Mittelwert von $23 \pm 3\%$.

Für G2-Phase-Zellen wurden für beide Entitäten im Mittel deutlich höhere Anteile gemessen, wobei sich die Mittelwerte nicht signifikant unterschieden (HPV-negative MW = 35 ± 8 ; HPV-positive MW = 35 ± 6 ; $P = 0,474$). Damit zeigten diese Daten, dass nur in G1-Phase-Zellen zwischen den beiden Entitäten ein deutlicher Unterschied in der DSB-Reparatur zu erkennen war, nicht aber in G2-Phase-Zellen.

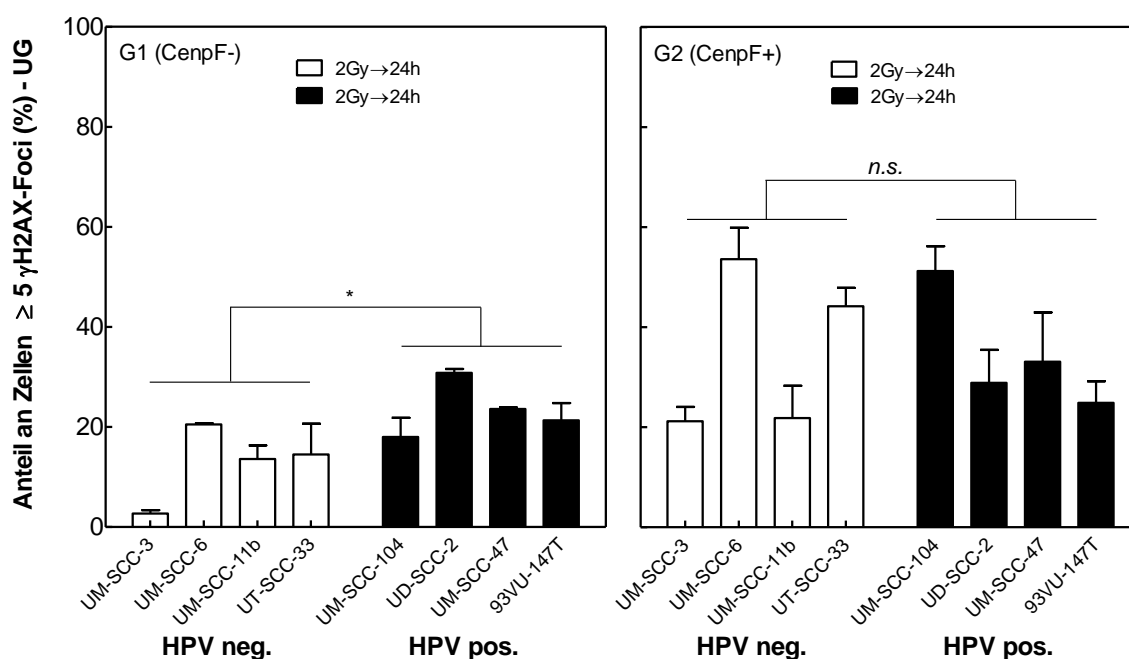


Abb.7: γ H2AX-Foci in bestrahlten HPV-negativen und positiven HNSCC-Zellen.

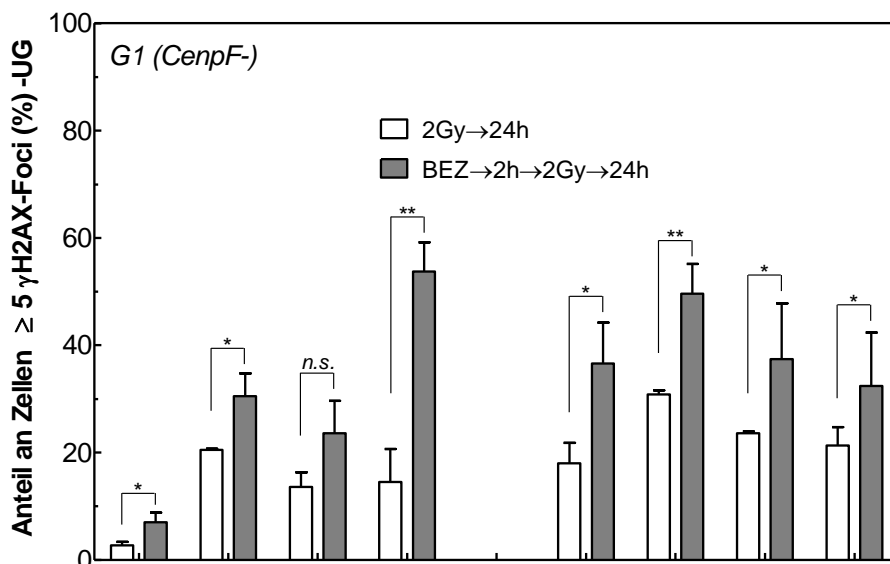
Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und nach Reparaturinkubation für 24 Stunden die Zahl der γ H2AX-Foci mittels γ H2AX-Technik bei Unterscheidung von G1- (CenpF-) und G2-Phase-Zellen (CenpF+) bestimmt. Der Wert der bestrahlten Zellen wurde jeweils um den Untergrund (UG), bestimmt mit unbestrahlten Zellen, korrigiert. Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) sind mit * markiert; n.s., nicht signifikant.

3.3 Wirkung von BEZ235 auf die DSB-Reparatur HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zellen

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von BEZ235 auf die Reparatur von DSB bestimmt. Hierfür wurden die Zellen einen Tag nach Aussaat zunächst für 2 Stunden mit 50 nM BEZ235 inkubiert, bevor sie mit 2 Gy bestrahlt wurden bzw. als Kontrolle unbestrahlt blieben. Nach einer weiteren Inkubation für 24 Stunden wurde mit Hilfe des

γ H2AX-Assays die Zahl der residuellen DSB ermittelt und mittels CenpF-Färbung wiederum zwischen G1- und G2-Phase-Zellen unterschieden. Für die Analyse der Daten wurde erneut der Schwellenwert von ≥ 5 Foci pro Zelle verwendet.

A



B

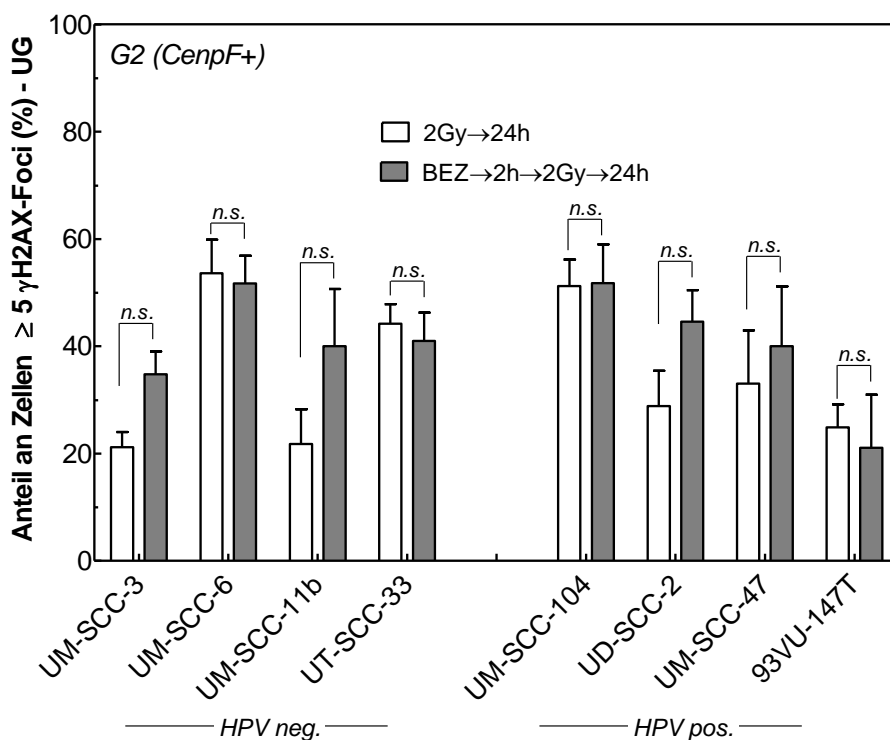


Abb.8: Wirkung von BEZ235 auf die DSB-Reparatur.

Unbehandelte (0 Gy) sowie bestrahlte Zellen mit anschließender Reparaturinkubation für 24 Stunden (2 Gy → 24 h) wurden fixiert und die γ H2AX-Reparaturfoci mittels Immunhistochemie in G1- (CenpF-) sowie G2-Phase-Zellen (CenpF+) nachgewiesen. Der Wert der bestrahlten Zellen wurde jeweils um den Untergrund (UG), bestimmt durch die unbehandelten Zellen, korrigiert.

Abb. 8 zeigt die Daten, wie sie insgesamt für die vier HPV-negativen und vier HPV-positiven HNSCC-Zellen gemessen wurden. Für die G1-Phase-Zellen wurde bei Behandlung mit BEZ235 mit Ausnahme der Zelllinie UM-SCC-11b jeweils ein signifikanter z.T. sogar hoch-signifikanter Anstieg, im Anteil der Zellen mit ≥ 5 Foci ermittelt (Abb. 8A). Dies galt sowohl für HPV-negative als auch für HPV-positive

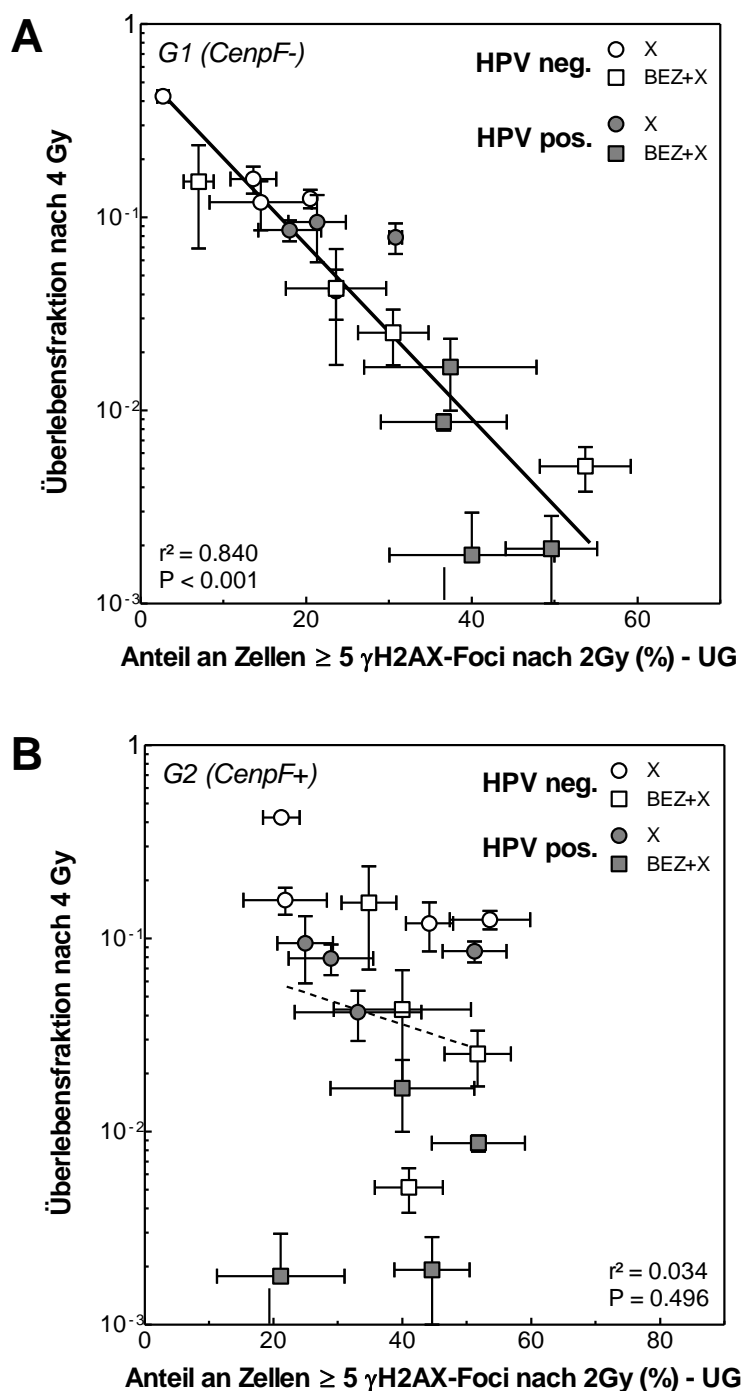


Abb.9: Assoziation zwischen residuellen DSB und Zellüberleben.

Aufgetragen ist für HPV negative und positive HNSCC-Zellen die Überlebensrate nach 4 Gy bzw. BEZ235 + 4Gy gegen den entsprechenden Anteil der Zellen mit ≥ 5 Foci. Daten wurden aus Abb.2. und Abb.7 übernommen. A) Assoziation in G1-Phasezellen; B) Assoziation für G2-Phasezellen. Die Regression wurde jeweils für die logarithmierten Werte berechnet.

Zelllinien. Für die G2-Phase-Zellen zeigte sich dagegen ein anderes Bild (Abb.8 B). Hier wurde in keiner der Zelllinien ein signifikanter Anstieg gemessen. In der Hälfte der Linien zeigte sich unabhängig vom HPV-Status entweder keine Veränderung oder sogar eine geringfügige Abnahme. Damit belegen diese Daten, dass BEZ235 sowohl in HPV-negativen als auch in HPV-positiven Zellen eine deutliche Hemmung der DSB-Reparatur bewirkte, dies aber nur in den G1-Phase-Zellen und nicht in den G2-Phasezellen sichtbar wurde.

3.4 Assoziation zwischen residuellen DSB und Zellüberleben

Eine zweistündige Vorbehandlung mit 50 nM BEZ235 bewirkte in beiden Entitäten sowohl eine deutliche Strahlensensibilisierung (Abb.2) als auch eine deutliche Hemmung der DSB-Reparatur (Abb.8). Letzteres wurde ausschließlich für G1-Phase-Zellen beobachtet.

Um zu prüfen, inwieweit die Strahlensensibilisierung durch BEZ235 auf die Hemmung der DSB-Reparatur zurückgeführt werden kann, wurde eine Assoziationsanalyse der beiden Parameter durchgeführt. Hierfür wurde für jede Zelllinie die jeweilige Überlebensrate nach 4 Gy bzw. nach der Kombinationsbehandlung (BEZ235 und 4 Gy) gegen den jeweiligen Anteil der Zellen mit ≥ 5 Foci nach 2 Gy sowohl für G1- als auch für G2-Phase-Zellen aufgetragen (Abb. 9).

Bei Assoziation der Überlebensrate mit dem Anteil der Zellen mit mehr als 5 Foci zeigte sich für G1-Phase-Zellen eine sehr gute Korrelation der beiden Parameter, nicht jedoch für G2-Phase-Zellen ($r^2=0,840$, $P<0,001$ vs. $r^2=0,034$, $P<0,496$). Darüber hinaus konnte für G1-Phase-Zellen festgestellt werden, dass die Daten, wie sie nach kombinierter Behandlung gemessen wurden (Abb. 9A, gefüllte Symbole) offensichtlich durch die gleiche Assoziation beschrieben werden können wie die Daten nach alleiniger Bestrahlung (Abb. 9A, offene Symbole). Für beide Datensätze gilt, dass die Abnahme der Überlebensrate jeweils mit einer gleichen Zunahme im Anteil der stark geschädigten Zellen einherging.

Für G2-Phase-Zellen zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Überlebensrate und dem Anteil der Zellen mit ≥ 5 Foci, weder für die alleinige Bestrahlung noch für die kombinierte Behandlung mit BEZ235. Insgesamt belegen die Daten, dass die Strahlensensibilisierung, wie sie sowohl für HPV-negative als auch HPV-positive Zellen durch eine Vorbehandlung mit 50 nM BEZ235 erreicht werden konnte, durch eine Hemmung der DSB-Reparatur verursacht wurde, die aber allein für G1-Phase-Zellen detektierbar war.

4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich durch die gezielte Beeinflussung des PI3K/mTOR-Signalwegs mittels des dualen Inhibitors BEZ235 die Strahlenempfindlichkeit von HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zellen steigern lässt und inwieweit hieran die Hemmung der DSB-Reparatur beteiligt ist.

HNSCC-Tumore zeichnen sich durch eine ausgeprägte Variabilität bezüglich des therapeutischen Ansprechens auf Bestrahlung aus [2, 42, 69]. Dabei gibt es zum einen Unterschiede zwischen den beiden Entitäten – mit einer stärkeren Strahlensensitivität der HPV-positiven Tumore – zum anderen auch unter den einzelnen Zelllinien beider Entitäten.

Um die in Vorarbeiten beschriebene Heterogenität von HNSCC auch in dieser Arbeit abzubilden, war die Untersuchung einer hinreichenden Anzahl von Zelllinien erforderlich. Dafür wurde jeweils ein Panel aus vier repräsentativen HPV-negativen (UM-SCC-3, UM-SCC-6, UM-SCC-11b, UM-SCC-33) und vier HPV-positiven Zelllinien (UM-SCC-104, UD-SCC-2, UM-SCC-47, 93VU-147) analysiert und gegenübergestellt. Die ausgewählten HNSCC-Zelllinien gehören zu den weltweit für die Forschung etablierten Zelllinien, deren molekularbiologisches Profil bereits in zahlreichen präklinischen Modellen gezeigt wurde [2, 11, 69, 76, 97].

4.1 Wirkung von BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit

Nach Bestrahlung allein wurde für die HPV-positiven Zellen im Vergleich zu den HPV-negativen Zellen eine signifikant höhere Strahlenempfindlichkeit gefunden. Damit wurde der Unterschied aus früheren Arbeiten bestätigt [2, 42, 69].

Es wurde gezeigt, dass durch eine zweistündige Vorinkubation mit dem dualen Inhibitor BEZ235 bereits bei einer Konzentration von 50 nM eine deutliche Strahlensensibilisierung sowohl für HPV-negative als auch für HPV-positive HNSCC-Zellen erreicht werden kann. In vorangehenden Versuchen war festgestellt worden, dass diese Konzentration von BEZ235 ausreicht, um eine effektive Hemmung des PI3K/mTOR-Signalweges zu bewirken [75]. Für die Strahlensensibilisierung durch BEZ235 zeigte sich dabei keine Abhängigkeit vom HPV-Status.

Eine Strahlensensibilisierung nach Vorbehandlung mit BEZ235 wurde zuvor auch für andere Tumorzellen beobachtet, insbesondere für Glioblastomzellen [25, 61], aber auch für kolorektale Karzinomzellen [15], Blasenkrebszellen [23], Brustkrebszellen [46] sowie auch für orale Plattenepithelkarzinomzellen [95]. Mit dieser Arbeit wurde jetzt erstmalig gezeigt, dass auch für HNSCC-Zellen eine effektive Strahlensensibilisierung erreicht werden kann, unabhängig vom HPV-Status der Zelle.

4.2 Wirkung von BEZ235 auf die DSB-Reparatur

Es wurde überprüft, ob die Strahlensensibilisierung nach Vorinkubation mit BEZ235 auf eine Hemmung der DSB-Reparatur zurückgeführt werden kann. Der Nachweis der DSB erfolgte dabei mit Hilfe der γ H2AX-Technik.

Aktuell stehen für den Nachweis von DSB zahlreiche Methoden zur Verfügung. Dazu zählen z.B. die Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay), die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) sowie die Neutrale Elutionstechnik [47]. Während mit diesen Methoden DSB erst nach sehr hohen Strahlendosen von bis zu 30 Gy

nachgewiesen werden können, erlaubt der γ H2AX-Assays den Nachweis bereits nach sehr kleinen Dosen und sogar die Detektion einzelner DSB [51]. Höhere Strahlendosen, wie sie für die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) benötigt werden, bergen das Risiko zur Auslösung der Apoptose, insbesondere in Kombination mit Bestrahlung und damit eine geminderte Abbildung residueller DNA-Schäden [51]. Unter allen verwendeten Verfahren zeigt die γ H2AX-Methode ihre Vorteile in einer vergleichbar einfachen Anwendung sowie in der äußersten Präzision in der Abbildung von Doppelstrangbrüchen mit einer fast 100-fach höheren Sensitivität gegenüber der des Comet Assays [36]. Weiterhin kann die Methode auch in intakten Zellen zur besseren Abbildung des Tumorverhaltens verwendet werden [70].

Ein weiterer Vorteil der Immunfluoreszenz ist die Verbindung mit anderen Verfahren zur doppelten Verifizierung der Ergebnisse [47]. Die Methode bietet außerdem die Möglichkeit, durch eine Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen das Zentromer-spezifische Protein F (CenpF) zwischen G1- und G2-Phase-Zellen zu unterscheiden. CenpF lagert sich am Zentromer-Kinetochor-Komplex an, der sich während der S-Phase ausbildet und sein Maximum in der G2-Phase erreicht. Die mit diesem Marker angefärbten Zellen zeigen eine unterschiedlich ausgeprägte Intensität in der Fluoreszenz und erlauben so die eindeutige Differenzierung zwischen G1-Phase-Zellen (keine CenpF-Färbung) und G2-Phase-Zellen (starke CenpF-Färbung). Zellen der S-Phase können aufgrund der mittleren bis schwachen CenpF-Expression nicht immer eindeutig von G1-Phase-Zellen diskriminiert werden, weshalb in dieser Arbeit auf die Auswertung dieser Zellen verzichtet wurde.

Das Ausmaß der DNA-Schädigung durch DSB wurde in dieser Arbeit quantifiziert, indem jeweils der Anteil der Zellen mit ≥ 5 Foci bestimmt wurde. Solch ein Parameter wurde auch in zahlreichen anderen Arbeiten genutzt [22, 96].

Mit Hilfe des γ H2AX-Assays wurde gezeigt, dass BEZ235 in der Lage ist, die DSB-Reparatur zu hemmen. Dieser Effekt wurde allerdings nur bei Analyse der G1-Phase-Zellen beobachtet, nicht aber für G2-Phase-Zellen. Dieser wichtige Befund deutet an, dass die Wirkung von BEZ235 auf die DSB-Reparatur zellzyklusabhängig ist. Dabei scheint die DSB-Reparatur nur in G1-Phase-Zellen behindert zu sein, nicht aber in G2-Phase-Zellen. Auch von anderen Autoren wurde gefunden, dass BEZ235 die Reparatur der DSB hemmen kann [23, 25, 46, 61].

Durch eine Assoziationsanalyse konnte zudem gezeigt werden, dass die Hemmung der DSB, wie sie für G1-Phase-Zellen beobachtet wurde, sehr gut mit der entsprechenden Radiosensibilisierung korreliert. Damit wurde erstmalig gezeigt, dass dieser Effekt von BEZ235 allein auf die Hemmung der DSB-Reparatur zurückgeführt werden kann.

Die DSB-Reparatur kann in Säugetierzellen über verschiedene Reparaturwege erfolgen, wobei die Nicht-homologe-Endverknüpfung (NEJ) und die Homologe Rekombination (HR) die beiden wichtigsten Prozesse sind [17, 19]. Während das NHEJ in allen Zellzyklusphase aktiv ist, kann die HR allein in der späten S- oder der G2-Phase DSB reparieren [31]. Da gefunden wurde, dass BEZ235 vor allem die DSB-Reparatur in der G1-Phase hemmt, aber nicht in der G2-Phase, deuten diese Daten daraufhin, dass der Inhibitor vor allem das NHEJ unterdrückt, aber nicht die HR. Dagegen wurde für Glioblastomzellen gefunden, dass BEZ235 auch in der Lage ist die HR zu inhibieren [61].

Durch seinen dualen Wirkmechanismus ist NVP-BEZ235 nachweislich in der Lage,

die Phosphorylierung von Akt1 an Serin437 potent zu unterdrücken, wie auch in parallelen Untersuchungen gezeigt wurde [75]. Dies bewirkt insbesondere eine reduzierte Phosphorylierung der DNA-PKcs [60, 64, 84]. Da die DNA-PKcs ein zentrales Enzym des NHEJ ist, würde dieser Effekt von BEZ235 vor allem zu einer Inhibition des NHEJ in Übereinstimmung mit dem Zellzyklus-abhängigen Effekt führen, wie er in dieser Arbeit beobachtet wurde.

In einer vorangehenden Arbeit aus dem Labor wurde gezeigt, dass HPV-positive Zellen einen Defekt im HR aufweisen [97]. Dementsprechend wurde in der Arbeit von Ziemann und Kollegen beobachtet, dass eine Unterdrückung der HR eine Strahlensensibilisierung der HPV-negativen HNSCC-Zellen bewirkt, nicht aber der HPV-positiven Zellen. In dieser Arbeit hingegen wurde nach Vorinkubation mit BEZ235 für beide Entitäten eine deutliche Strahlensensibilisierung beobachtet. Somit bestätigt dieser Vergleich, dass BEZ235 vor allem das NHEJ inhibiert haben muss und weniger die HR, da ansonsten eine deutlich geringere Sensibilisierung für HPV-positive HNSCC-Zellen zu erwarten wäre. In der Tat kann in nachfolgenden Untersuchungen mit Hilfe eines speziellen Reparaturplasmids gezeigt werden, dass BEZ235 speziell das NHEJ, aber nicht die HR inhibiert [75].

4.3 Klinische Relevanz

Der duale Inhibitor BEZ235 zeigt gegenüber dem PI3K/mTOR-Signalweg eine sehr starke inhibitorische Wirkung. Dementsprechend wurden bereits zahlreiche klinische Studien durchgeführt, in dem dieser Inhibitor als Monotherapie eingesetzt wurde. Leider ergaben diese Studien mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom [12] bzw. Pankreaskarzinom [74], dass BEZ235 allein nur eine sehr geringe Wirkung auf das Tumorwachstum hatte bei z.T. erheblichen Nebenwirkungen. Hierbei wurden den Patienten bis zu 300 mg pro Tag gegeben. Beobachtet wurden u.a. Grad 3 bis 4 Nebenwirkungen mit Durchfall, Brechreiz und Übelkeit, Müdigkeit, Mukositis, Geschmacksstörungen, Appetitlosigkeit und Hautausschlag, weshalb die Studien sogar vorzeitig abgebrochen werden mussten. Zahlreiche weitere Studien laufen derzeit noch, wovon aber mehrere wieder abgebrochen wurden (www.clinicaltrials.gov).

Aus diesen Gründen scheint es sinnvoller zu sein, BEZ235 in Kombination mit einer Strahlentherapie einzusetzen, weil hier die erforderliche Konzentration deutlich niedriger gewählt werden kann. In der vorliegenden Arbeit reichte bereits die geringe Konzentration von 50 nM BEZ235 aus, um eine deutliche Strahlensensibilisierung zu erreichen. Hierbei bewirkte die alleinige Behandlung mit 50 nM BEZ235 keinen oder nur sehr geringen Effekt auf das Zellüberleben. Bisher wurden diesbezüglich allerdings noch keine klinischen Studien durchgeführt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) zählen seit Jahren zu den sechs häufigsten bösartigen Neuerkrankungen weltweit. Neben Alkohol- und Nikotinkonsum trägt die lokale Infektion mit Humanen Papillomaviren (vornehmlich HPV-16 und HPV-18) zur Onkogenese bei. Damit begründen sie eine eigene molekulare Tumorentität mit steigender Inzidenz. Die Strahlentherapie ist neben der chirurgischen Resektion eine der wichtigsten Therapieoptionen bei der multimodalen Behandlung dieser Tumore und stellt eine effektive Möglichkeit dar, den Tumor organ- und funktionserhaltend zu behandeln.

Da diese Tumore oft sehr spät erkannt und in einem fortgeschrittenen Stadium behandelt werden, sowie eine relativ hohe Rate an Rezidiven und Zweitumoren aufweisen, geht die Erkrankung meist mit einer schlechten Prognose einher. Lediglich für HPV-assoziierte Karzinome wird ein deutlich besseres Überleben beobachtet, was vor allem auf eine hohe Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt werden kann. Die intensive Therapie ist allerdings trotz vieler Fortschritte mit einer hohen Normalgewebetoxizität verbunden. Deshalb gibt es seit Jahren Bestrebungen eine Verbesserung der Therapie zu erreichen, die es ermöglicht, höhere Heilungsraten bei gleichzeitiger Reduzierung der Normalgewebetoxizität zu erzielen.

Im wissenschaftlichen Fokus stehen hierbei vor allem molekulare Ansätze, die gezielt in spezifische Abläufe der Tumoren eingreifen. Zu den vielversprechenden Zielstrukturen gehört bei HNSCC-Tumoren insbesondere der PI3K/mTOR/Akt-Signalweg, da er in einer Vielzahl dieser Tumore im Sinne einer Überaktivierung fehlreguliert ist. Der Signalweg nimmt über eine Vielzahl von Effektoren Einfluss auf Proliferation, Metabolismus sowie die DNA-Reparatur. Die Hoffnung ist daher, durch Inhibition dieses Signalweges eine gezielte Strahlensensibilisierung zu erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig an HPV-pos. sowie HPV-neg. HNSCC-Zelllinien untersucht, ob durch die Behandlung mit BEZ235 die Reparatur der strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) effektiv unterdrückt und dadurch eine deutliche Strahlensensitivierung erreicht werden kann. Verwendet wurden hierfür die vier HPV-negativen HNSCC-Zelllinien (UM-SCC-3, UM-SCC-6, UM-SCC-11b, UM-SCC-33) sowie die vier HPV-positiven Linien (UM-SCC-104, UD-SCC-2, UM-SCC-47, 93VU-147T).

Die Wirkung auf das Zellüberleben wurde mittels des Koloniebildungstests bestimmt. Der Nachweis der DSB erfolgte mit der sehr sensitiven γ H2AX-Foci-Technik. Bestimmt wurde jeweils der Anteil der Zellen mit ≥ 5 γ H2AX-Foci. Um bei dieser Analyse zwischen G1- und G2-Phase-Zellen zu unterscheiden, wurde die Zellzyklus-abhängige Expression des Zentromer-spezifischen Proteins F (CenpF) genutzt.

Insgesamt konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

1. Die Behandlung mit 50 nM BEZ235 allein hat keinen oder nur sehr geringen Einfluss auf das Zellüberleben.
2. In Kombination mit Bestrahlung bewirkt BEZ235 eine deutliche Strahlensensibilisierung, wobei dieser Effekt unabhängig vom HPV-Status der HNSCC-Zellen ist.
3. In unbehandelten HPV-negativen wie -positiven HNSCC-Zelllinien ist der Anteil an Zellen mit ≥ 5 γ H2AX Foci sehr gering mit im Mittel nur 1-2%.

4. Bei einer Bestrahlung mit 2 Gy ist der Anteil der Zellen mit ≥ 5 γ H2AX Foci in den HPV-positiven Zellen deutlich höher als in den HPV-negativen Zellen, was – in Übereinstimmung mit früheren Daten - auf einen Defekt der DSB-Reparatur in den HPV-positiven Zellen hinweist.
5. Sowohl in HPV-negativen als auch in HPV-positiven HNSCC-Zellen wird durch BEZ235 die DSB Reparatur inhibiert, was zu einer deutlichen Zunahme des Anteils an Zellen mit ≥ 5 Foci führt.
6. Diese Zunahme zeigt sich nur in G1-Phase-Zellen und nicht in G2-Phase-Zellen. Dies deutet daraufhin, dass BEZ235 primär die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) unterdrückt, welche in der G1-Phase der wichtigste Reparaturprozess ist.
7. Bei der Kombination von BEZ235 mit Bestrahlung korreliert der Anteil der Zellen mit ≥ 5 Foci, wie er in den G1-Phase-Zellen gemessen wird, sehr gut mit der entsprechenden Abnahme in der Überlebensrate. Dies bedeutet, dass die Strahlensensibilisierung durch BEZ235 primär auf eine Hemmung der DSB-Reparatur zurückgeführt werden kann.

Insgesamt kann mit dieser Arbeit erstmalig dargestellt werden, dass durch eine effektive Unterdrückung des PI3k/mTOR/Akt-Signalweges mittels des dualen Inhibitors BEZ235 in allen HPV-negativen bzw. HPV-positiven HNSCC-Zelllinien eine starke Strahlensensibilisierung erreicht werden kann. Dieses Ergebnis bietet langfristig die Möglichkeit, durch eine gezielte Strahlensensibilisierung der Tumore die Heilungsrate von HNSCC durch eine kombinierte Behandlung zu steigern bei gleichzeitiger Reduktion der Normalgewebetoxizität.

Die Daten dieser Arbeit wurden zusammen mit anderen Ergebnissen in der Zeitschrift *Cancers* veröffentlicht:

Schötz U, Balzer V, Brandt FW, Ziemann F, Subtil FSB, Rieckmann T, Köcher S, Engenhardt-Cabillic R, Dikomey E, Wittig A, Arenz A. Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Enhances Radiosensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Due to Suppressed Double-Strand Break (DSB) Repair by Non-Homologous End Joining. *Cancers* (Basel). 2020 Feb 18;12(2).

6 SUMMARY

For years, squamous cell carcinoma of the head and neck region (HNSCC) have been among the six most frequent malignant diseases worldwide. Besides alcohol and nicotine consumption, local infection with human papilloma viruses (mainly HPV-16 and HPV-18) contributes to oncogenesis. They establish their own molecular tumor entity with rising incidence. Radiation therapy is, along with surgical resection, one of the most important therapeutic options in the multimodal treatment of these tumors and represents an effective way to treat the tumor in a way that preserves the integrity of the organs.

As these tumors are often detected very late and treated at an advanced stage, and have a relatively high rate of recurrences and secondary tumors, the disease is usually associated with a poor prognosis. Only for HPV-associated carcinomas a significantly better survival is observed, which is mainly due to an enhanced radiation sensitivity. However, despite much progress, intensive therapy is associated with high normal tissue toxicity. For this reason, efforts have been underway for years to improve the therapy in order to achieve better cure rates while reducing normal tissue toxicity.

The scientific focus is primarily on molecular approaches that specifically intervene in specific tumor processes. One of the most promising target structures in HNSCC tumors is the PI3K/mTOR/Akt signaling pathway, as it is misregulated in a large number of these tumors mostly resulting in an over-activation. This pathway influences proliferation, metabolism and DNA repair via a large number of effectors. Therefore, it was expected, that the inhibition of this signaling pathway may lead to a targeted radiation sensitization.

Within the scope of this work, HPV-positive as well as HPV-negative HNSCC cell lines were examined for the first time to determine whether treatment with BEZ235 effectively suppresses the repair of radiation-induced DNA double-strand breaks (DSB) and thereby achieves a significant radiation sensitivity. Four HPV-negative HNSCC cell lines (UM-SCC-3, UM-SCC-6, UM-SCC-11b, UM-SCC-33) and four HPV-positive lines (UM-SCC-104, UD-SCC-2, UM-SCC-47, 93VU-147T) were used.

The effect on cell survival was determined using the colony formation assay. The detection of DSB was performed with the very sensitive γ H2AX foci technique. The proportion of cells with ≥ 5 γ H2AX-Foci was determined. To distinguish between G1- and G2-phase cells, the cell cycle-dependent expression of the centromere specific protein F (CenpF) was used.

Overall, the following observations were made:

1. Treatment with 50 nM BEZ235 alone has little or no effect on cell survival.
2. In combination with irradiation, BEZ235 causes a significant radiation sensitization, whereby this effect is independent of the HPV-status of the HNSCC cells.
3. In untreated HPV-negative as well as -positive HNSCC cell lines, the proportion of cells with ≥ 5 γ H2AX foci is very low, averaging only 1-2%.
4. When irradiated with 2 Gy, the proportion of cells with ≥ 5 γ H2AX foci is significantly higher in the HPV-positive cells when compared to HPV-negative cells, which - in accordance with previous data - indicates a defective DSB repair in HPV-positive cells.
5. In both HPV-negative and HPV-positive HNSCC cells, BEZ235 inhibits DSB repair, resulting in a significant increase in the proportion of cells with ≥ 5 γ H2AX foci.

6. This increase is only seen in G1-phase cells and not in G2-phase cells. This indicates that BEZ235 primarily suppresses non-homologous end joining (NHEJ), which is the most important repair process in G1-phase.

7. When BEZ235 is combined with irradiation, the proportion of cells with ≥ 5 γ H2AX foci as measured in G1-phase cells correlates very well with the corresponding decrease in survival rate. This finding indicates that the radiation sensitization by BEZ235 primarily results from an inhibition of DSB repair.

Overall, this work demonstrates for the first time that a strong radiation sensitization can be achieved in all HPV-negative and HPV-positive HNSCC cell lines by effective suppression of the PI3K/mTOR/Akt signaling pathway using the dual inhibitor BEZ235. In the long term, this result offers the possibility to increase the overall survival of HNSCC by a combined treatment with a targeted radiation sensitization while reducing normal tissue toxicity.

The data of this work were published together with other results in the journal *Cancers*:

Schötz U, Balzer V, Brandt FW, Ziemann F, Subtil FSB, Rieckmann T, Köcher S, Engenhart-Cabillic R, Dikomey E, Wittig A, Arenz A. Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Enhances Radiosensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Due to Suppressed Double-Strand Break (DSB) Repair by Non-Homologous End Joining. *Cancers* (Basel). 2020 Feb 18;12(2).

7 LITERATURVERZEICHNISREFERENCES

- [1] Ang KK, Harris J, Wheeler R et al. (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363(1): 24–35. doi: 10.1056/NEJMoa0912217
- [2] Arenz A, Ziemann F, Mayer C et al. (2014) Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlenther Onkol* 190(9): 839–846. doi: 10.1007/s00066-014-0605-5
- [3] Arenz A, Patze J, Kornmann E et al. (2019) HPV-negative and HPV-positive HNSCC cell lines show similar numerical but different structural chromosomal aberrations. *Head Neck* 41(11): 3869–3879. doi: 10.1002/hed.25924
- [4] Azzam EI, Jay-Gerin J-P, Pain D (2012) Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 327(1-2): 48–60. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.012
- [5] Barnes B (ed) (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut, Berlin
- [6] Becher H, Ramroth H, Ahrens W et al. (2005) Occupation, exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and laryngeal cancer risk. *Int J Cancer* 116(3): 451–457. doi: 10.1002/ijc.21049
- [7] Bee L, Fabris S, Cherubini R et al. (2013) The efficiency of homologous recombination and non-homologous end joining systems in repairing double-strand breaks during cell cycle progression. *PLoS One* 8(7): e69061. doi: 10.1371/journal.pone.0069061
- [8] Bonner JA, Harari PM, Giralt J et al. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354(6): 567–578. doi: 10.1056/NEJMoa053422
- [9] Bonner JA, Harari PM, Giralt J et al. (2010) Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer. 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The Lancet Oncology* 11(1): 21–28. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70311-0
- [10] Budman J, Chu G (2005) Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *EMBO J* 24(4): 849–860. doi: 10.1038/sj.emboj.7600563
- [11] Busch C-J, Becker B, Kriegs M et al. (2016) Similar cisplatin sensitivity of HPV-positive and -negative HNSCC cell lines. *Oncotarget* 7(24): 35832–35842. doi: 10.18632/oncotarget.9028
- [12] Carlo MI, Molina AM, Lakhman Y et al. (2016) A Phase Ib Study of BEZ235, a Dual Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *Oncologist* 21(7): 787-788d. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0145
- [13] Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S et al. (2012) Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Mol Pharmacol* 82(6): 1230–1240. doi: 10.1124/mol.112.080408

- [14] Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J et al. (2013) Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 31(36): 4550–4559. doi: 10.1200/JCO.2013.50.3870
- [15] Chen Y-H, Wei M-F, Wang C-W et al. (2015) Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor is an effective radiosensitizer for colorectal cancer. *Cancer Lett* 357(2): 582–590. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.015
- [16] Chin D, Boyle GM, Theile DR et al. (2004) Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg* 57(7): 595–602. doi: 10.1016/j.bjps.2004.06.010
- [17] Davis AJ, Chen DJ (2013) DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2(3): 130–143. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02
- [18] Dienstmann R, Rodon J, Serra V et al. (2014) Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther* 13(5): 1021–1031. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0639
- [19] Dikomey E (2010) Bestimmung der DNA-Schädigung in vitro. *NuklearMedizin* 2010
- [20] Dikomey E, Borgmann K, Kriegs M et al. (2012) IV-10.7 Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen. Zeller/ zur Hausen (Hrsg.) *Onkologie: Grundlagen- Diagnostik- Therapie- Entwicklung*
- [21] Dikomey E, Borgmann K, Köcher S et al. (2016) Radiation DNA damage and use in cancer/therapeutics-translation of radiation modifiers. in Kelley, M. R. and Fishel, M. L. (eds) *DNA Repair in Cancer Therapie: Molecular Targets and Clinical Applications*: 330–352
- [22] El Bezawy R, Tinelli S, Tortoreto M et al. (2019) miR-205 enhances radiation sensitivity of prostate cancer cells by impairing DNA damage repair through PKC ϵ and ZEB1 inhibition. *J Exp Clin Cancer Res* 38(1): 51. doi: 10.1186/s13046-019-1060-z
- [23] Fokas E, Yoshimura M, Prevo R et al. (2012) NVP-BEZ235 and NVP-BGT226, dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors, enhance tumor and endothelial cell radiosensitivity. *Radiat Oncol* 7: 48. doi: 10.1186/1748-717X-7-48
- [24] Frit P, Barboule N, Yuan Y et al. (2014) Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst)* 17: 81–97. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.02.007
- [25] Gil del Alcazar CR, Hardebeck MC, Mukherjee B et al. (2014) Inhibition of DNA double-strand break repair by the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 as a strategy for radiosensitization of glioblastoma. *Clin Cancer Res* 20(5): 1235–1248. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1607
- [26] Gillison ML, Castellsagué X, Chaturvedi A et al. (2014) Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int J Cancer* 134(3): 497–507. doi: 10.1002/ijc.28201

- [27] Goodhead DT (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology* 65(1): 7–17
- [28] Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ et al. (2001) The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res* 61(10): 4278–4282
- [29] Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57–70
- [30] Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- [31] Helleday T, Lo J, van Gent DC et al. (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6(7): 923–935. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.006
- [32] Hess J, Unger K, Orth M et al. (2017) Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. *Cancer Lett* 386: 87–99. doi: 10.1016/j.canlet.2016.11.014
- [33] Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835): 366–374. doi: 10.1038/35077232
- [34] Holmes D (2011) PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nat Rev Drug Discov* 10(8): 563–564. doi: 10.1038/nrd3527
- [35] Iliakis G, Murmann T, Soni A (2015) Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 793: 166–175. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.07.001
- [36] Ismail IH, Wadhra TI, Hammarsten O (2007) An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res* 35(5): e36. doi: 10.1093/nar/gkl1169
- [37] Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23(5): 687–696
- [38] Jemal A, Bray F, Center MM et al. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2): 69–90. doi: 10.3322/caac.20107
- [39] Karmakar S, Kar A, Thakur S et al. (2020) Periodontitis and oral Cancer-A striking link. *Oral Oncol*: 104630. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104630
- [40] Kimple RJ, Harari PM (2014) Is radiation dose reduction the right answer for HPV-positive head and neck cancer? *Oral Oncol* 50(6): 560–564. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.09.015
- [41] Kimple RJ, Harari PM, Torres AD et al. (2013) Development and characterization of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma tumorgrafts. *Clin Cancer Res* 19(4): 855–864. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2746

- [42] Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC et al. (2013) Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res* 73(15): 4791–4800. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0587
- [43] Konstantinidou G, Bey EA, Rabellino A et al. (2009) Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin blockade is an effective radiosensitizing strategy for the treatment of non-small cell lung cancer harboring K-RAS mutations. *Cancer Res* 69(19): 7644–7652. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0823
- [44] Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P et al. (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(2): 467–475. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551
- [45] Kuger S, Graus D, Brendtke R et al. (2013) Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Transl Oncol* 6(2): 169–179
- [46] Kuger S, Corek E, Polat B et al. (2014) Novel PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Radiosensitizes Breast Cancer Cell Lines under Normoxic and Hypoxic Conditions. *Breast Cancer (Auckl)* 8: 39–49. doi: 10.4137/BCBCR.S13693
- [47] Kuo LJ, Yang L-X (2008) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22(3): 305–309
- [48] Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S et al. (2009) Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 27(12): 1992–1998. doi: 10.1200/JCO.2008.20.2853
- [49] Lavin MF (2008) Ataxia-telangiectasia. From a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(10): 759–769. doi: 10.1038/nrm2514
- [50] Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11(1): 9–22. doi: 10.1038/nrc2982
- [51] Löbrich M, Shibata A, Beucher A et al. (2010) gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9(4): 662–669. doi: 10.4161/cc.9.4.10764
- [52] LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB et al. (2008) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 11(1-2): 32–50. doi: 10.1016/j.drug.2007.11.003
- [53] Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J et al. (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 7(7): 1851–1863. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0017
- [54] Mansour WY, Schumacher S, Roskopf R et al. (2008) Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 36(12): 4088–4098. doi: 10.1093/nar/gkn347

- [55] Mansour WY, Rhein T, Dahm-Daphi J (2010) The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res* 38(18): 6065–6077. doi: 10.1093/nar/gkq387
- [56] Mehanna H, Beech T, Nicholson T et al. (2013) Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 35(5): 747–755. doi: 10.1002/hed.22015
- [57] Mesri EA, Feitelson MA, Munger K (2014) Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 15(3): 266–282. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011
- [58] Moeller BJ, Yordy JS, Williams MD et al. (2011) DNA repair biomarker profiling of head and neck cancer: Ku80 expression predicts locoregional failure and death following radiotherapy. *Clin Cancer Res* 17(7): 2035–2043. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2641
- [59] Moody CA, Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10(8): 550–560. doi: 10.1038/nrc2886
- [60] Mueck K, Rebholz S, Harati MD et al. (2017) Akt1 Stimulates Homologous Recombination Repair of DNA Double-Strand Breaks in a Rad51-Dependent Manner. *Int J Mol Sci* 18(11). doi: 10.3390/ijms18112473
- [61] Mukherjee B, Tomimatsu N, Amancherla K et al. (2012) The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Is a Potent Inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-Mediated DNA Damage Responses¹². *Neoplasia* 14(1): 34–43
- [62] Nguyen-Tan PF, Zhang Q, Ang KK et al. (2014) Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. *J Clin Oncol* 32(34): 3858–3866. doi: 10.1200/JCO.2014.55.3925
- [63] NIKJOO PO'NDTGH (2009) Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *International Journal of Radiation Biology* 71(5): 467–483. doi: 10.1080/095530097143798
- [64] Oeck S, Al-Refae K, Riffkin H et al. (2017) Activating Akt1 mutations alter DNA double strand break repair and radiosensitivity. *Sci Rep* 7: 42700. doi: 10.1038/srep42700
- [65] Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP et al. (2002) Squamous cell carcinoma of the oropharynx: surgery, radiation therapy, or both. *Cancer* 94(11): 2967–2980. doi: 10.1002/cncr.10567
- [66] Prevo R, Deutsch E, Sampson O et al. (2008) Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity. *Cancer Res* 68(14): 5915–5923. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0757
- [67] Rautava J, Syrjänen S (2012) Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 6 Suppl 1: S3-15. doi: 10.1007/s12105-012-0367-2

- [68] Reuschenbach M, Wagner S, Würdemann N et al. (2016) Humane Papillomviren bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion. Relevanz für Prognose, Therapie und Prophylaxe (Human papillomavirus and squamous cell cancer of the head and neck region : Prognostic, therapeutic and prophylactic implications). *HNO* 64(7): 450–459. doi: 10.1007/s00106-016-0123-0
- [69] Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ et al. (2013) HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol* 107(2): 242–246. doi: 10.1016/j.radonc.2013.03.013
- [70] Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C et al. (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 275(13): 9390–9395
- [71] Roman A, Munger K (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445(1-2): 138–168. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013
- [72] Sak A, Stuschke M (2010) Use of γ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* 20(4): 223–231. doi: 10.1016/j.semradonc.2010.05.004
- [73] Salama JK, Seiwert TY, Vokes EE (2007) Chemoradiotherapy for locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 25(26): 4118–4126. doi: 10.1200/JCO.2007.12.2697
- [74] Salazar R, Garcia-Carbonero R, Libutti SK et al. (2018) Phase II Study of BEZ235 versus Everolimus in Patients with Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Naïve Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Oncologist* 23(7): 766-e90. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0144
- [75] Schötz U, Balzer V, Brandt F-W et al. (2020) Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Enhances Radiosensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Due to Suppressed Double-Strand Break (DSB) Repair by Non-Homologous End Joining. *Cancers (Basel)* 12(2). doi: 10.3390/cancers12020467
- [76] Seltzsam S, Ziemann F, Dreffke K et al. (2019) In HPV-Positive HNSCC Cells, Functional Restoration of the p53/p21 Pathway by Proteasome Inhibitor Bortezomib Does Not Affect Radio- or Chemosensitivity. *Transl Oncol* 12(3): 417–425. doi: 10.1016/j.tranon.2018.11.013
- [77] Sheu JJ-C, Hua C-H, Wan L et al. (2009) Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 69(6): 2568–2576. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3199
- [78] Singchat W, Hitakomate E, Rerkarmnuaychoke B et al. (2016) Genomic Alteration in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Inferred from Karyotyping, Molecular Cytogenetics, and Array Comparative Genomic Hybridization. *PLoS One* 11(8): e0160901. doi: 10.1371/journal.pone.0160901
- [79] Sugiyama T, Kowalczykowski SC (2002) Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem* 277(35): 31663–31672. doi: 10.1074/jbc.M203494200

- [80] Tinhofer I, Jöhrens K, Keilholz U et al. (2015) Contribution of human papilloma virus to the incidence of squamous cell carcinoma of the head and neck in a European population with high smoking prevalence. *Eur J Cancer* 51(4): 514–521. doi: 10.1016/j.ejca.2014.12.018
- [81] Tisch M, Enderle G, Zöller J et al. (1996) Mundhöhlenkrebs bei Maschinenarbeitern (Cancer of the oral cavity in machine workers). *Laryngorhinootologie* 75(12): 759–763. doi: 10.1055/s-2007-997671
- [82] Toledo LI, Murga M, Zur R et al. (2011) A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nat Struct Mol Biol* 18(6): 721–727. doi: 10.1038/nsmb.2076
- [83] Toulany M, Rodemann HP (2015) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling as a key mediator of tumor cell responsiveness to radiation. *Semin Cancer Biol* 35: 180–190. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.07.003
- [84] Toulany M, Lee K-J, Fattah KR et al. (2012) Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res* 10(7): 945–957. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0592
- [85] Trenner A, Sartori AA (2019) Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment. *Front Oncol* 9: 1388. doi: 10.3389/fonc.2019.01388
- [86] Villiers E-M de, Fauquet C, Broker TR et al. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1): 17–27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033
- [87] Wagner S, Würdemann N, Hübbers C et al. (2015) HPV-assoziierte Kopf-Hals-Karzinome. *HNO* 63(11): 758–767
- [88] Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412(6847): 607–614. doi: 10.1038/35088000
- [89] Weinberg RA (2014) *The biology of cancer*, Second edition. Garland Science, New York, NY, London
- [90] Windon MJ, D'Souza G, Fakhry C (2018) Treatment preferences in human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Future Oncol* 14(24): 2521–2530. doi: 10.2217/fon-2018-0063
- [91] Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS et al. (2012) Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 11: Doc09. doi: 10.3205/cto000091
- [92] Wolff Kurzversion S3 Mundhöhlenkarzinom
- [93] Wolff K-D, Follmann M, Nast A (2012) The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Dtsch Arztebl Int* 109(48): 829–835. doi: 10.3238/arztebl.2012.0829
- [94] Yang Y-G, Saidi A, Frappart P-O et al. (2006) Conditional deletion of Nbs1 in murine cells reveals its role in branching repair pathways of DNA double-strand breaks. *EMBO J* 25(23): 5527–5538. doi: 10.1038/sj.emboj.7601411
- [95] Yu C-C, Hung S-K, Lin H-Y et al. (2017) Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as an effectively radiosensitizing strategy for treating human oral

- squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncotarget* 8(40): 68641–68653. doi: 10.18632/oncotarget.19817
- [96] Zhao H, Halicka HD, Li J et al. (2013) DNA damage signaling, impairment of cell cycle progression, and apoptosis triggered by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry A* 83(11): 979–988. doi: 10.1002/cyto.a.22396
- [97] Ziemann F, Seltzsaam S, Dreffke K et al. (2017) Roscovitine strongly enhances the effect of olaparib on radiosensitivity for HPV neg. but not for HPV pos. HNSCC cell lines. *Oncotarget* 8(62): 105170–105183. doi: 10.18632/oncotarget.22005
- [98] Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2(5): 342–350. doi: 10.1038/nrc798

8 ANHANG

8.1 Curriculum Vitae

Die Seite 52 (Curriculum Vitae) enthält personenbezogene Daten und ist daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

8.2 Liste der Publikationen

Originalarbeiten

Schötz U, **Balzer V**, Brandt FW, Ziemann F, Subtil FSB, Rieckmann T, Köcher S, Engenhardt-Cabillic R, Dikomey E, Wittig A, Arenz A

Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Enhances Radiosensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Due to Suppressed Double-Strand Break (DSB) Repair by Non-Homologous End Joining.

Cancers (Basel). 2020 Feb 18;12(2)

Publizierte Abstracts

Viola Balzer, Andrea Arenz, Stefanie Preising, Frank Ziemann, Jens-Peter Klusmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig

Deutliche Strahlensensibilisierung von HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien durch den dualen PI3K/mTOR/Akt Inhibitor NVP-BEZ235 verursacht durch Hemmung der Doppelstrangbruchreparatur

Posterbeitrag zur 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Mannheim, Deutschland, 16.-19. Juni 2016

Strahlenther Oncol 2016; 192 (S1), P04-2, p. 63

Viola Balzer, Andrea Arenz, Stefanie Preising, Frank Ziemann, Jens-Peter Klusmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig

Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 enhances radiosensitivity of HNSCC cell lines due to an impaired DSB repair

Posterbeitrag zum 25. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden, 11.02. – 13.02.2016

Proceedings des 25. Symposiums Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie: Dresden, 11. - 13. Februar 2016, *ISSN: 1432-864X*, p. 25

Auszeichnungen

06/2016 **Drittmittelförderung durch die Medizinstiftung Marburg für Forschungsvorhaben**
Fördersumme: € 5.000,00

02/2016 **Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.V.**
Stipendiatin: Patenschaftsprogramm „Studenten/Club 100 – Talente für die Radioonkologie“

02/2016 **25. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden, 11.02 – 13.02.2016**
Abstract prämiert mit dem Nachwuchsstipendium
Prämiensumme: € 200,00

Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 enhances radiosensitivity of HNSCC cell lines due to an impaired DSB repair.

Viola Balzer, Andrea Arenz, Stefanie Preising, Frank Ziemann, Jens-Peter Klusmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Best, Bette, Brehm, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Damanakis, Donner-Banzhoff, Eickmann, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Figiel, Gress, Grundmann, Hertl, Hildebrandt, Hoffmann, Hoyer, Jaques, Jerrentrup, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, Knake, König, Koolmann, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maier-Giebing, Maisner, Menzler, Michl, Moll, Mutters, Müller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Nockher, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Ries, Ruchholtz, Sekundo, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schratt, Schu, Schulze, Schütz, Seifart, Seitz, Sevinc, Sommer, Stahl, Steiniger, Suske, Tackenberg, Thieme, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wittig, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin.

8.4 Danksagung

Ohne die fortwährende Bestärkung auf verschiedensten Wegen wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Dissertation erfolgreich zum Abschluss zu bringen. Den Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben, möchte ich hier danken.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. med. Rita Enghart-Cabillic dafür danken, dass Sie mir als Direktorin der Klinik für Strahlentherapie sowie als offizielle Betreuerin der Arbeit eine Promotion in der Strahlentherapie ermöglicht hat.

An nächster Stelle möchte ich Frau Dr. rer. nat. Andrea Arenz aus dem Labor der Klinik für Strahlentherapie für die Überlassung des interessanten Themas danken. Für die jahrelange Betreuung, sowohl während der experimentellen Phase der Arbeit als auch während der Datenauswertung, sowie der Korrektur dieser Arbeit und den steten Glauben an mich, ein besonderes Dankeschön!

Frau Prof. Dr. med. Andrea Wittig danke ich für die Hilfe beim Erstellen von Postern und deren Präsentation, die es mir ermöglichten, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf mehreren Kongressen präsentieren zu können.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey, Gastprofessor in der Klinik für Strahlentherapie in Marburg, danke ich für die vielen Impulse und die ehrliche Kritik, welche mich über die Grenzen meiner wissenschaftlichen Tätigkeit hinaus stets bestärkt haben. Durch Ihn konnte ich viele Möglichkeiten der Darstellung und Auswertung von Daten sowie deren Interpretation erlernen, wodurch meine Dissertation erheblich vorangebracht wurde.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, namentlich insbesondere Frau Stefanie Preising sowie Herrn Dr. med. Frank Ziemann für die profunde Einarbeitung in die Arbeit im Labor sowie die fortwährende Unterstützung in der Durchführung und Verbesserung der Versuche. Das angenehme Arbeitsklima war nicht zuletzt einer der Gründe, warum mir die Arbeit im Labor so viel Freude gemacht! Besonderer Dank gilt außerdem meinen ehemaligen Kommilitonen Herrn Dr. med. Johannes Patze sowie Herrn Dr. med. Steve Seltzsaam, die mit mir sowohl die Hochs und Tiefs des Medizinstudiums als auch die vielen Seiten einer wissenschaftlichen Arbeit teilten.

Ich danke den Mitarbeitern des Labors für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie UKE Hamburg, namentlich insbesondere Frau Dr. rer. nat. Sabrina Köcher, Dr. phil. nat. Thorsten Rieckmann sowie Priv.-doz. Dr. rer. nat. Malte Kriegs für die Möglichkeit eines Praktikums. Der Aufenthalt ermöglichte es mir, das Wissen über die in meiner Arbeit zugrundeliegende Technik der Immunfluoreszenz zu vertiefen und auszubauen. Ich erhielt viele Impulse zur Lösung von Problemen und praktische Ratschläge, die die Fertigstellung der Arbeit erheblich beschleunigten.

Abschließend möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern, Karin und Norbert Balzer, als auch meiner Schwester Anja Balzer für die immerwährende persönliche Unterstützung bedanken. Ohne Sie wäre es mir weder möglich gewesen, das Medizinstudium zu bestreiten noch diese Promotion zum erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Allen anderen, die mich während meiner Zeit in den Labors für Strahlentherapie begleitet haben und die ich hier nicht persönlich erwähnt habe, danke ich ebenfalls für die spannende und lehrreiche Zeit.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Strahlensensitivierung von Kopf-Hals-Tumorzellen durch den dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235“ in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic mit Unterstützung durch Dr. rer. nat. Andrea Arenz, Prof. Dr. rer. nat. Dikomey und Stefanie Preising ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht.“

Schötz U, **Balzer V**, Brandt FW, Ziemann F, Subtil FSB, Rieckmann T, Köcher S, Engenhardt-Cabillic R, Dikomey E, Wittig A, Arenz A

Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Enhances Radiosensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Due to Suppressed Double-Strand Break (DSB) Repair by Non-Homologous End Joining.

Cancers (Basel). 2020 Feb 18;12(2)

Viola Balzer, Andrea Arenz, Stefanie Preising, Frank Ziemann, Jens-Peter Klusmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig

Deutliche Strahlensensibilisierung von HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien durch den dualen PI3K/mTOR/Akt Inhibitor NVP-BEZ235 verursacht durch Hemmung der Doppelstrangbruchreparatur

Posterbeitrag zur 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Mannheim, Deutschland, 16.-19. Juni 2016

Strahlenther Oncol 2016; 192 (S1), P04-2, p. 63

Viola Balzer, Andrea Arenz, Stefanie Preising, Frank Ziemann, Jens-Peter Klusmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig

Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 enhances radiosensitivity of HNSCC cell lines due to an impaired DSB repair

Posterbeitrag zum 25. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden, 11.02. – 13.02.2016

Proceedings des 25. Symposiums Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie: Dresden, 11. - 13. Februar 2016, ISSN: 1432-864X, p. 25

Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum, Unterschrift Referentin/Referent