

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Direktorin: Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Zelluläre Ursachen des unterschiedlichen Ansprechens
HPV-assoziiierter und
Noxen-induzierter Plattenepithelkarzinome
der Kopf- Halsregion auf eine kombinierte
Radiochemotherapie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Frank Ziemann

aus Bad Saarow-Pieskow

Marburg 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 03.03.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Andrea Wittig

1. Korreferent: Prof. Dr. Robert Mandić

***Ärzte geben Medikamente, von denen sie wenig wissen,
in Menschenleiber, von denen sie noch weniger wissen,
zur Behandlung von Krankheiten,
von denen sie überhaupt nichts wissen.***

Voltaire

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einführung Plattenepithelkarzinome der Kopf- /Halsregion	1-14
1.1 Humane Papillomaviren	1-16
1.1.1 Tumorinduktion durch HP-Viren	1-17
1.2 Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion	1-21
1.2.1 Effekte der Radiotherapie auf zellulärer Ebene	1-23
1.2.2 Zelluläre Wirkung von Cisplatin	1-24
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	1-25
2 Material und Methoden	2-26
2.1 Charakteristika der verwendeten Zelllinien	2-26
2.1.1 Kultivierungsbedingungen der Tumorzelllinien	2-28
2.2 Konditioniertes Medium	2-29
2.3 Wachstumskurven zur Bestimmung der Verdoppelungszeit	2-29
2.4 WST-1 Test zur Messung der Zellviabilität	2-29
2.5 Koloniebildungstest zur Messung des klonogenen Überlebens	2-30
2.6 Proteinbiochemie zur Messung der Proteinexpression	2-32
2.7 Durchflusszytometrie zur Analyse der Zellzyklusprogression	2-37
2.8 Detektion der Apoptose	2-39
2.9 Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen -Immunfluoreszenzfärbung	2-40
2.10 Bestrahlung von Zellkulturen	2-42
2.11 Inkubation mit Cisplatin	2-42
2.12 Geräte, Plastik und Glaswaren, Reagenzien	2-43
2.13 Datenanalyse und Statistische Auswertung	2-43
3 Ergebnisse	3-44
3.1 Nachweis des HPV-Status in HNSCC Tumorzelllinien	3-44
3.2 Wachstumsverhalten HPV+ und HPV- Tumorzelllinien	3-44
3.3 Einfluss von Cisplatin auf die Zellviabilität	3-45
3.4 Koloniebildungstest	3-46
3.4.1 Klonogenes Überleben nach Inkubation mit Cisplatin	3-46
3.4.2 Koloniebildungsfähigkeit nach Photonenbestrahlung	3-47
3.4.3 Klonogenes Überleben nach Kombination von Bestrahlung und Cisplatininkubation	3-49

3.5	Residuelle DNA-Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung und Cisplatininkubation _____	3-52
3.6	Zellzyklusprogression nach Cisplatininkubation und Photonenbestrahlung _____	3-54
3.7	Expressionsänderung der zellzyklusregulierender Proteine nach Bestrahlung und Cisplatininkubation _____	3-57
3.7.1	Expressionsänderung des Proteins Cyclin A2 nach Bestrahlung und Cisplatin _____	3-57
3.7.2	Expressionsänderung des Proteins Cyclin E2 nach Bestrahlung und Cisplatin _____	3-58
3.8	Expressionsänderungen der HPV-Proteine und des p53 Proteins nach Bestrahlung und Cisplatin _____	3-60
3.8.1	Expressionsänderung der Proteine E6 und E7 nach Cisplatin und Bestrahlung _____	3-61
3.8.2	Expressionsänderung des endogenen p53 Proteins nach Cisplatin und Bestrahlung _____	3-61
3.9	Analyse der Zelltodinduktion durch Photonenbestrahlung und Cisplatininkubation _____	3-63
3.9.1	Analyse der Zelltodinduktion – Zellzahl in der subG1-Phase _____	3-63
3.9.2	Analyse der Zelltodinduktion – Induktion der Apoptose _____	3-64
3.10	Korrelation des zellulären Überlebens mit dem Zelltod _____	3-65
4	Diskussion _____	4-67
4.1	HPV-Status der untersuchten Zelllinien _____	4-67
4.2	Intrinsische Therapiesensibilität von HNSCC Zelllinien _____	4-67
4.2.1	Intrinsische Sensibilität von HNSCC Zelllinien gegenüber Cisplatin _____	4-68
4.2.2	Intrinsische Sensibilität von HNSCC Zelllinien gegenüber Bestrahlung _____	4-69
4.2.3	Intrinsische Sensibilität von HNSCC Zelllinien gegenüber Bestrahlung und Cisplatininkubation _____	4-70
4.3	Residuelle DNA-Doppelstrangbrüche _____	4-71
4.4	Zellzyklusprogression und Expression von Zellzyklusproteinen nach Cisplatininkubation ± Bestrahlung _____	4-71
4.5	Expression der Onkoproteine HPV E6 / E7 und des Tumorsuppressors p53 _____	4-73
4.6	Zelltodanalysen _____	4-75
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick _____	4-77

5	Literaturverzeichnis	5-79
6	Zusammenfassung	6-96
7	Summary	7-97
8	Anhang	8-98
8.1	Anhang A	8-98
8.1	Anhang B	8-103
8.2	Curriculum Vitae	8-106
8.3	Publikationen	8-107
8.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	8-109
8.5	Danksagung	8-110
8.6	Ehrenwörtliche Erklärung	8-112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beeinflussung der Cancer Hallmarks durch die viralen Onkoproteine E6 und E7. _____	1-19
Abbildung 2: Wachstumskurve der HPV- Zelllinie UT-SCC-33. _____	3-44
Abbildung 3: Zellviabilität von HNSCC Zelllinien nach 24 h Cisplatininkubation. _	3-46
Abbildung 4: Klonogenes Überleben von HNSCC Zelllinien nach Cisplatininkubation. _____	3-47
Abbildung 5: Klonogenes Überleben von HNSCC Zelllinien nach Bestrahlung. ___	3-48
Abbildung 6: Klonogenes Überleben von HNSCC Zelllinien nach Bestrahlung kombiniert mit Cisplatininkubation. _____	3-51
Abbildung 7: Gruppenauswertung HPV+ und HPV- HNSCC Zelllinien nach kombinierter Radiochemotherapie. _____	3-52
Abbildung 8: Analyse residueller DNA-Doppelstrangbrüche. _____	3-53
Abbildung 9: Kinetik der Zellzyklusprogression von HNSCC Zelllinien nach Bestrahlung und / oder Cisplatin. _____	3-54
Abbildung 10: Gruppenauswertung der relativen Zellzyklusprogression in HPV+ und HPV- Zelllinien. _____	3-56
Abbildung 11: Expression der Cycline A2 und E2 nach Bestrahlung und / oder Cisplatininkubation. _____	3-59
Abbildung 12: Westernblot zur Verifizierung der Spezifität der verwendeten Antikörper für die Proteine E6 und E7. _____	3-60
Abbildung 13: Expression der Proteine p53, E6 und E7 nach Bestrahlung und / oder Cisplatininkubation. _____	3-62
Abbildung 14: Analyse der subG1-Fraktion in HPV+ und HPV- HNSCC Zelllinien nach Bestrahlung und / oder Cisplatininkubation. _____	3-64
Abbildung 15: Analyse der Apoptoserate in HNSCC Zelllinien nach Bestrahlung und / oder Cisplatininkubation. _____	3-65
Abbildung 16: Korrelation des klonogenen Überlebens bei 2 Gy mit der Apoptoserate nach 72 h Bestrahlung und / oder Cisplatininkubation. _____	3-66

Abbildungen im Anhang:

Abbildung A 1: Wachstumskurven aller verwendeten HNSCC Zelllinien. _____ 8-103

Abbildung A 2: Exemplarische Histogramme der Zellzyklusverteilung einer HPV- und einer HPV+ HNSCC Zelllinie nach Bestrahlung und / oder Cisplatininkubation. _____ 8-104

Abbildung A 3: Exemplarische Darstellung der Dotplot Analyse der Apoptoserate in HNSCC Zelllinien. _____ 8-105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung von Patienten mit HNSCC Tumoren in Risikogruppen. _____	1-15
Tabelle 2: Merkmale der verwendeten HNSCC Zelllinien unterteilt nach HPV-Status. _____	2-27
Tabelle 3: Zusammensetzung des Puffers zur Herstellung von Proteinlysaten und der Proteinaseinhibitoren. _____	2-33
Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für die SDS-PAGE. ____	2-34
Tabelle 5: Zusammensetzung des verwendeten Laufpuffers. _____	2-35
Tabelle 6: Zusammensetzung des verwendeten Transferpuffers. _____	2-35
Tabelle 7: Auflistung der zur Proteindetektion verwendeten Antikörper. _____	2-36
Tabelle 8: Zusammensetzung des verwendeten Waschpuffers und der ECL-Reagenz. _____	2-37
Tabelle 9: Zusammensetzung des verwendeten Färbepuffers. _____	2-38
Tabelle 10: Zusammensetzung der für Detektion der DDSBs verwendeten Lösungen und Antikörper. _____	2-41
Tabelle 11: Verdopplungszeit der HNSCC Zelllinien in Stunden bei einer Aussaatdichte von 1×10^4 Zellen / cm^2 . _____	3-45
Tabellen im Anhang:	
Tabelle A 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte. _____	8-98
Tabelle A 2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Plastik- und Glaswaren. _	8-99
Tabelle A 3: Alphabetische Auflistung der verwendeten Lösungen und Reagenzien. _____	8-100
Tabelle A 4: Alphabetische Auflistung der verwendeten Software und Internetseiten. _____	8-102

Abkürzungsverzeichnis

Alphabetische Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen.

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AIF	Apoptose induzierender Faktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BAK	BCL-2 homologous antagonist/killer
BCA	Bicinchoninsäure
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
BRCA1	Breast cancer 1
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
CDDP	Cisplatin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CT	Chemotherapie
D10	Bestrahlungsdosis, bei der die SF 10 % beträgt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDSB	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 Behörde
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
HPV-	HPV negativ
HPV+	HPV positiv
HR	Homologe Rekombination
HRP	Horseradish Peroxidase
hTERT	Humane telomerase reverse transkriptase
IC50 _{CFA}	Im Koloniebildungstest ermittelte Konzentration, bei der die Inhibition 50 % beträgt
IC50 _{WST}	Im WST-Test ermittelte Konzentration, bei der die Inhibition 50 % beträgt
IFN	Interferon
IR	Ionisierende Bestrahlung
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
NP-40	Octoxinol 9
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Plattierungseffizienz
PerCP	Peridinin-chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PIC	Proteaseinhibitoren Cocktail
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastom Protein
PS	Petrischale
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
PY	Packungsjahr
Q1-4	Quadrant 1-4
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
RT	Radiotherapie
s.o.	siehe oben
SCC	Sideward Scatter
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Elektrophorese
SF1	Überlebensfraktion nach 1 μM CDDP
SF2 _{RCT}	Überlebensfraktion nach Radiochemotherapy mit 2 Gy und 0,5 μM CDDP
SF2 _{RT}	Überlebensfraktion nach Radiatio mit 2 Gy
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSB	DNA-Einzelstrangbrüche
STR	Short tandem repeats
T-Stadium	Tumorgröße
TBST	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan -gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
UB	unbehandelt
UD	Heinrich Heine Universität Düsseldorf
UM	Universität von Michigan
UPCI	Universität von Pittsburgh
UT	Universität von Turku
V	Viabilität
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VM	Vollmedium
VU	Vrije Universität von Amsterdam
VZ	Verdopplungszeit
WST-1	Wasserlösliches Tetrazolium-1
wt	Wildtyp
X	unbekannt
γH2AX	Phosphoryliertes Histon 2AX

1 Einführung Plattenepithelkarzinome der Kopf- /Halsregion

Plattenepithelkarzinome der Kopf- /Halsregion (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) sind mit einer weltweiten Inzidenz von 560 000 Fällen/Jahr die sechst häufigste Tumorerkrankung (Van Monsjou *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2011). Obwohl die Inzidenz für einige Untergruppen dieser Tumore auf Grund eines gesunkenen Nikotinkonsums stagniert oder sogar rückläufig ist, gibt es andere Subgruppen, deren Inzidenz vor allem in der westlichen Welt in den letzten Jahren zugenommen hat (Chaturvedi *et al.*, 2008). Besonders für Tumore des Oropharynx (von 40,5 % in Studien vor dem Jahr 2000 auf 72,2 % in Studien ab 2005) und der Mundhöhle ist in den vergangenen zwei Dekaden eine steigende Prävalenz beschrieben (Gillison *et al.*, 2013; Mehanna *et al.*, 2013) Die Mortalitätsrate von HNSCC insgesamt liegt bei 300 000 Erkrankten pro Jahr weltweit, davon ca. 5.400 in Deutschland (Jemal *et al.*, 2011; Robert-Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).

Bei HNSCC handelt es sich um eine Gruppe von Karzinomen, die sich anhand der anatomischen Lokalisationen ihrer Entstehung in folgende Untergruppen einteilen lassen: Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx, Mundhöhle und Nasenhöhle (Greene *et al.*, 2002). Derzeit gibt es keine etablierten Maßnahmen zur Früherkennung, sodass die Tumore häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden. In diesen Stadien leiden Patienten mit HNSCC an Symptomen wie Schluckbeschwerden, Globusgefühl, Heiserkeit, Mundgeruch, Blutungen (Preiß *et al.*, 2010).

Insgesamt erkranken mehr Männer als Frauen an HNSCC (Gillison *et al.*, 2013; Tinhofer *et al.*, 2015). Der Altersgipfel für die Erkrankung liegt derzeit bei durchschnittlich ca. 60 Jahren (Tinhofer *et al.*, 2015). Als gesicherte Risikofaktoren für die Entstehung eines HNSCC gelten die kanzerogene Nikotin und Alkohol (Leemans, Braakhuis und Brakenhoff, 2011). Durch diese ausgelöst, entsteht in Jahrzehnten über eine Metaplasie ein invasives Karzinom. In solchen Noxen-induzierten Tumoren finden sich mit großer Häufigkeit Mutationen in Tumorsuppressorproteinen wie dem Protein p53 (> 80%) oder dem Retinoblastom-Protein (pRB), wodurch zelleigene Kontrollmechanismen ausgeschaltet werden und die Karzinogenese weiter fortschreiten kann (Leemans, Braakhuis und Brakenhoff, 2011; R. Kimple *et al.*, 2013). Neben der Alteration eines Tumorsuppressors findet sich bei 10 – 30 % aller HNSCCs eine verstärkte Aktivität des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (epidermal growth factor receptor, EGFR) (Sheu *et al.*, 2009). Zusätzlich wurden durch Komplettssequenzierungen weitere Mutationen beschrieben, deren genaue Beteiligung an der Karzinogenese als so genannte Treibermutationen jedoch noch nicht abschließend geklärt ist (Stransky *et al.*, 2011; Lawrence *et al.*, 2015).

Die Prognose für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf- /Halsregion hängt vom initialen Tumorstadium ab. Das Gesamtüberleben in frühen Stadien und bei günstigem Risikoprofil liegt bei >80 %, während Patienten in fortgeschrittenen Stadien und ungünstigem Risikoprofil ein Gesamtüberleben von < 50 % aufweisen (Ang *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2015).

Seit einigen Jahren etabliert sich eine differenziertere, nicht allein auf der TNM-Klassifikation beruhende Einteilung von HNSCC: Bereits in den 1980er Jahren wurden Patienten mit HNSCC beschrieben, bei denen die klassischen Risikofaktoren für ein HNSCC nicht vorlagen.

Als Ursache für die Karzinogenese dieser Patienten wurde 1982 durch Syrjänen K *et al.* (Syrjänen, Syrjänen und Pyrhönen, 1982) eine Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV) identifiziert. Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren sind im Durchschnitt deutlich jünger und haben keine oder eine sehr geringe Raucheranamnese. Die Primärtumore sind meistens klein (niedriges T-Stadium), jedoch häufig bereits bei Erstdiagnose lymphogen metastasiert (O’Sullivan *et al.*, 2012; Sethi *et al.*, 2012; Mehanna *et al.*, 2013). Als Hauptrisikofaktor für eine HPV-Infektion, die zu einem HNSCC führt, werden ein häufiger Partnerwechsel und oraler Geschlechtsverkehr angesehen (D’Souza *et al.*, 2007).

Aktuelle klinische Studien und retrospektive Analysen belegen, dass Patienten, deren Tumor mit einer HPV-Infektion assoziiert ist, eine deutlich bessere Prognose haben, als Patienten, deren Tumor durch die klassischen Karzinogene (s.o.) bedingt ist (Ang *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2015; Tinhofer *et al.*, 2015). Innerhalb dieser beiden Gruppen gibt es bei der Prognose und dem Risikoprofil einige Überlappungen, sodass von Ang et al. 2010 (Ang *et al.*, 2010) eine Einteilung von Risikogruppen anhand der in Tabelle 1 dargestellten Kriterien vorgenommen wurde.

Tabelle 1: Risikogruppen nach Ang et al. Gezeigt ist die Einteilung in Risikogruppen anhand des HPV-Status, des Nikotinkonsums und der TNM-Klassifikation mit dem jeweiligen 3-Jahresgesamtüberleben. (aus Ang KK et al. NEJM, 2010)

Risikogruppen	Niedriges Risiko		Mittleres Risiko		Hohes Risiko	
HPV-Status	positiv		positiv	negativ	negativ	
Nikotinkonsum (PY)	< 10	> 10	> 10	< 10	< 10	> 10
TNM-Staus		N0-N2a	N2b-N3	T2-T3	T4	
3-Jahres Gesamtüberleben	93,0 %		70,8 %		46,2 %	

Angaben über die Häufigkeit HPV-assoziiierter Karzinome schwankt je nach Quelle sehr stark (zwischen <10 % bis >90 %), was u.a. daran liegt, dass in den Studien jeweils verschiedene anatomische Lokalisationen des Primärtumors über- bzw. unterrepräsentiert waren (Wittekindt *et al.*, 2012). HPV-positive Tumore finden sich besonders häufig im Bereich des Oropharynx und der Mundhöhle (hier > 60 %) (Wittekindt *et al.*, 2012). Zudem gibt es sehr unterschiedliche Methoden, eine HPV-Infektion im Tumorgewebe nachzuweisen. Als Surrogat Marker dient eine immunhistochemische Färbung des Proteins P16INK4A (siehe 1.1.1). Wenn man alle anatomischen Lokalisationen zusammenfasst, wird heute von ca. 30% HPV-positiven HNSCC ausgegangen (Ang *et al.*, 2010; Sethi *et al.*, 2012; Mehanna *et al.*, 2013; Tinhofer *et al.*, 2015).

Diese Zahl wird jedoch in den kommenden Jahren zunehmen, da auch in Gesellschaften mit unveränderten Rauchgewohnheiten eine Zunahme HPV-assoziiierter Tumore gezeigt werden konnte (Tinhofer *et al.*, 2015).

HPV-positive (HPV+) und HPV-negative (HPV-) Tumore werden bislang als HNSCC zusammengefasst und gleich behandelt. Die beschriebenen klinischen und molekularen Unterschiede in der Karzinogenese verdeutlichen jedoch, dass diese Tumoren als biologisch verschiedene Entitäten zu betrachten sind, die möglicherweise mit differenzierten Therapiekonzepten behandelt werden sollten. Die genauen biologischen Unterschiede sind bislang allerdings noch zu wenig verstanden, um eine Therapiestratifikation nach dem HPV-Status zu ermöglichen.

1.1 Humane Papillomaviren

Das Humane Papillomavirus (HPV) gehört zu der seit 2004 als eigenständige Virusfamilie klassifizierten Familie der Papillomaviridae (De Villiers *et al.*, 2004). HP-Viren werden sexuell übertragen. Der Nachweis einer abgelaufenen Infektion findet sich ab dem 30. Lebensjahr in annähernd 100% der Bevölkerung (Clifford *et al.*, 2005; Sanjosé *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2008). Die Bedeutung von HP-Viren für die Entstehung von Karzinomen wurde bereits in den Jahren 1974 bis 1976 erstmals für das Zervixkarzinom postuliert (zur Hausen, 1976, 2002). Anfang der 80er Jahre konnten die Subtypen HPV 16 und 18 aus Biopsien von Zervixkarzinomen kloniert und grundlegende Zusammenhänge zwischen einer HPV-Infektion und der Entstehung eines Zervixkarzinoms identifiziert werden (zur Hausen, 2002). Bis heute sind über 150 Subtypen der Papillomaviridae identifiziert worden, die sich in alpha (vorwiegend mukosabefallende Viren), beta (dermatotrope Viren) und die wesentlich kleineren Gruppen der gamma, nu und mu (ebenfalls dermatotrope Viren) gliedert (De Villiers *et al.*, 2004; Rautava und Syrjänen, 2012).

Die mit der Karzinomentstehung assoziierte Gruppe ist die alpha-Gruppe, innerhalb der die sog. Hochrisiko (high-risk) und Niedrigrisiko (low-risk) HPV-Typen unterschieden werden. Niedrigrisiko HPV-Typen führen u.a. zu Condylomata accuminata (Feigwarzen), induzieren jedoch keine malignen Tumore. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind HPV 6, 11, 42, 43 und 44 (Rautava und Syrjänen, 2012). Im Gegensatz dazu werden die HPV-Typen der Hochrisiko Gruppe mit präkanzerösen Läsionen und Tumoren sowohl im anogenitalen Bereich als auch in der Kopf-Halsregion assoziiert. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind: HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35 (Rautava und Syrjänen, 2012). Während beim Zervixkarzinom bei ca. 70 % der Tumore sowohl HPV 16 als auch 18 gefunden werden (Moody und Laimins, 2010), sind HNSCC-Tumoren vorwiegend mit dem Subtyp HPV 16 assoziiert (Kreimer *et al.*, 2005). Für die Entstehung von Tumoren wird eine permanente Infektion oder Re-Infektion, die vom Immunsystem nicht genügend eliminiert wird, angenommen (zur Hausen, 2002).

Papillomaviridae besitzen eine ringförmige, doppelsträngige DNA mit einem ca. 8 kbp großen Genom (Mesri, Feitelson und Munger, 2014). Innerhalb des Genoms werden die viralen Gene anhand ihres Expressionszeitpunktes im viralen Lebenszyklus in frühe (E= early) und späte (L= late) Gene eingeteilt. So verfügt das HP-Virus über insgesamt 8 frühe (E1 bis E8) und 2 späte (L1 und L2) Gene und eine sog. nichtkodierende, regulatorische Region (NCR) (Rautava und Syrjänen, 2012).

Die primäre Infektion mit dem Virus findet nicht im äußeren Epithel sondern in Stammzellen im Bereich der Basalmembran nach Mikrotraumen statt (Wittekindt *et al.*, 2012). Zur Replikation der episomalen Virus-DNA ist eine aktive Teilung der infizierten Wirtszelle nötig, da das Virus über keine eigenen Proteine zur Replikation verfügt. Zunächst wird die Proliferation und Differenzierung der Wirtszelle induziert und das virale Genom repliziert. Abschließend werden die viralen Proteine L1 und L2 gebildet. Diese kodieren für virale Kapsidproteine und bilden zusammen mit dem viralen Genom das fertige HP-Virus, welches in der obersten Epithelschicht freigegeben wird und erneut Zellen infizieren kann (zur Hausen, 2002; Rautava und Syrjänen, 2012).

Während die Funktion der Proteine E3 und E8 bislang nicht geklärt werden konnte, sind viele Funktionen der anderen Proteine inzwischen gut charakterisiert (Rautava und Syrjänen, 2012). In der vorliegenden Arbeit soll nur die Funktion der beiden tumorinitiierenden Proteine E6 und E7 detaillierter beschrieben werden, da diese für die Tumorentstehung die größte Bedeutung haben. Die Funktion der anderen Proteine ist in Rautava *et al.* (Rautava und Syrjänen, 2012) beschrieben.

1.1.1 Tumorinduktion durch HP-Viren

Im Gegensatz zum episomalen HPV Genom, das bei einer akuten Infektion vorliegt, kommt es im Rahmen der Tumorgenese im initialen Stadium oft zur Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom (Schwarz *et al.*, 1985). Die Integration des viralen Genoms scheint für die Karzinogenese von Vorteil, da durch diese ein Wachstumsvorteil entsteht (Ruutu *et al.*, 2002). Im Rahmen der Integration kommt es häufig zu einem Verlust eines Teils der viralen Erbinformation, wobei oft ein Teil zwischen dem Gen E2 und L2 ausgeschnitten wird, welcher den Verlust der dazwischen liegenden Gene E4 und E5 bedingt. Das Gen *E2* weist hierdurch ebenfalls Deletionen auf (zur Hausen, 2002; Rautava und Syrjänen, 2012). Es kann jedoch bei Tumoren im Bereich der Zervix und der Kopf-Halsregion auch eine aktive Expression des E2 Proteins vorhanden sein (Lindel *et al.*, 2006; Olthof *et al.*, 2015).

Die Tumorentstehung wird durch zelleigene und externe Mechanismen kontrolliert und inhibiert. Grundlegend hierfür sind zelleigene Gene, die für die Integrität der DNA und deren Reparatur, sowie Inhibierung der Zellproliferation und ggf. Zelltodinitiation verantwortlich sind (sog. Tumorsuppressorgene) (Weinberg, 2013). Diesen entgegen stehen Gene, die innerhalb der Zelle die Proliferation anregen und vorantreiben – sog. Protoonkogene.

Ein Tumor weist häufig mehrere Mutationen auf (Kandoth *et al.*, 2013) und benötigt in der Regel Jahrzehnte zur Entstehung, weshalb man bei vielen Tumoren von einem Mehrstufenmodell der Karzinogenese ausgeht (Hanahan und Weinberg, 2011). Anfangs kommt es zu einzelnen Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen, letztere werden dann als Onkogenen bezeichnet. Dies bedingt für die Zelle einen Wachstumsvorteil und führt zu weiteren Mutationen, die ihrerseits wiederum einen Vorteil für die Zelle bedeuten. Nach einer Reihe solcher Mutationen kommt es schließlich zur Ausbildung eines Karzinoms (Moody und Laimins, 2010; Hanahan und Weinberg, 2011). Im Rahmen dieser Onkogenese werden Tumorsuppressoren inaktiviert, während Protoonkogene aktiviert werden (Weinberg, 2013). Die wichtigsten Bereiche, in denen eine Tumorzelle Veränderungen aufweisen muss, damit ein Tumor entsteht, wurden von Douglas A. Hanahan und Robert A. Weinberg im Jahr 2000 zusammenfassend beschrieben (Hanahan und Weinberg, 2000) und im Jahr 2011 um neuere Erkenntnisse ergänzt (Hanahan und Weinberg, 2011). Eine Zelle benötigt also in den meisten Fällen eine Vielzahl von Mutationen in verschiedenen Proteinen die mehrere intrazelluläre Signalwegen betreffen, damit ein Karzinom entsteht (Kandoth *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zur beschriebenen mehrstufigen Karzinogenese führt in HPV assoziierten Karzinomen alleinig eine Infektion mit dem Virus zu einer beschleunigten Tumorentstehung. Grundlegend ist die Expression der viralen Proteine E6 und E7, die starke Onkogene darstellen (Mesri, Feitelson und Munger, 2014). Fast alle von Hanahan und Weinberg beschriebenen Hallmarks werden durch diese beiden Proteine beeinflusst. Dieser Zusammenhang wurde von Munger *et al.* (Mesri, Feitelson und Munger, 2014) beschrieben und soll hier als Grundlage zur Erläuterung der wichtigsten Funktionen der viralen Proteine E6 und E7 dienen, da beide Proteine essentiell für HPV+ Tumore sind und im Fokus der onkologischen Grundlagenforschung HPV-assoziierter Tumore stehen.

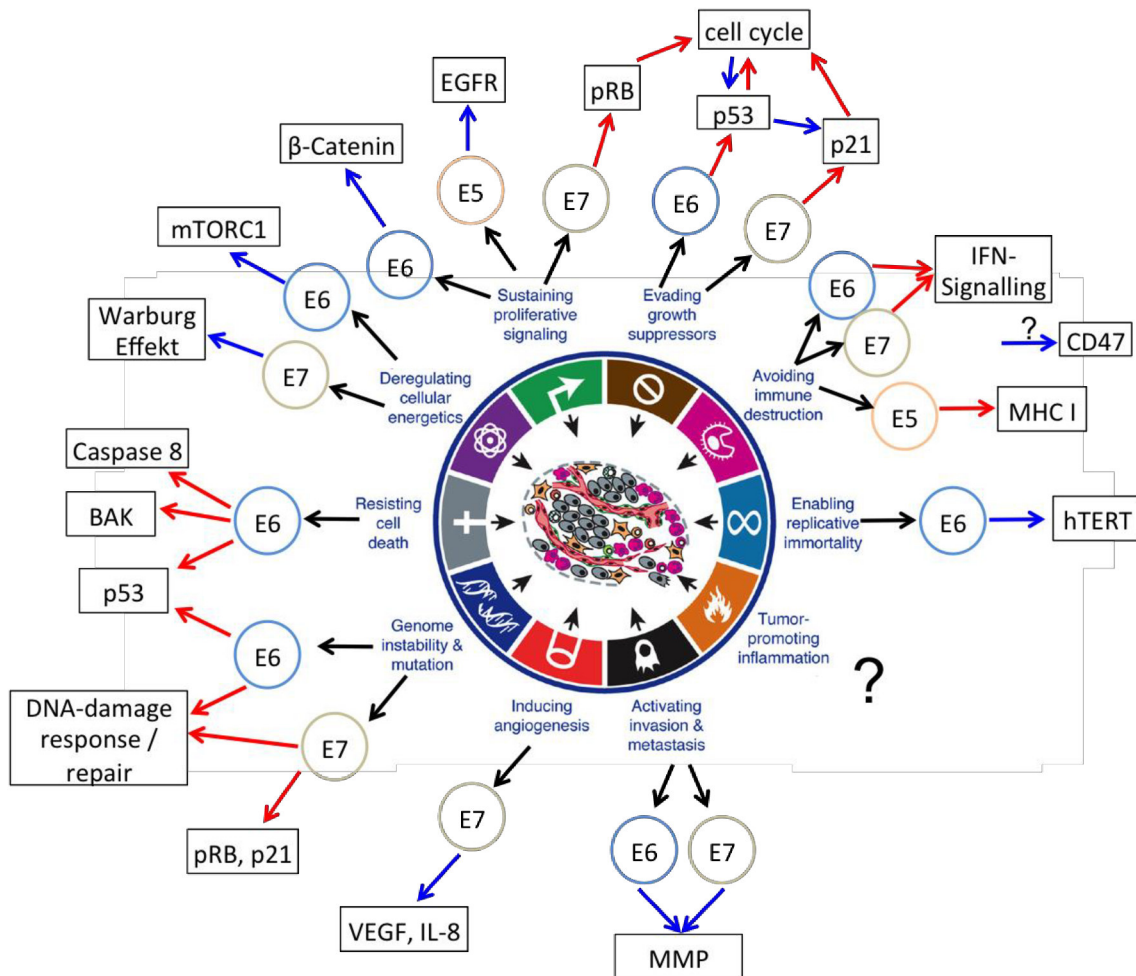


Abbildung 1: Beeinflussung der Tumor Hallmarks durch die viralen Onkoproteine E6, E7 und E5. Gezeigt sind die von Hanahan und Weinberg beschriebenen Tumor Hallmarks (Cell 2011) und die HPV-Proteine, die nach derzeitigem Kenntnisstand einen zugehörigen Signalweg aktivieren (blaue Pfeile) oder inaktivieren (rote Pfeile). Bis auf den Bereich der tumorfördernden Inflammation ist für jeden der 10 Bereiche eine Interaktion der Onkoproteine mit einem Hallmark beschrieben (Modifiziert nach Mesri, Fingleton und Munger, 2014; Abgedruckt mit Genehmigung von Cell Press).

MMP = Matrix-Metalloproteinase; MHC I =Major Histokompatibilitätskomplex I; hTERT = humane Telomerase Reverse Transkriptase; IFN = Interferon; mTORC1 = mammalian target of Rapamycin 1; BAK = Bcl-2 homologous antagonist/killer; VEGF = vascular endothelial growth factor.

Das virale Protein E7 ist ein ca. 11 kDa großes Protein, welches keine eigene katalytische Funktion besitzt, jedoch in der Lage ist, an eine große Zahl von Proteinen zu binden und diese zu aktivieren, zu inhibieren oder über weitere Interaktionspartner für den proteasomalen Abbau zu markieren (Moody und Laimins, 2010; Rautava und Syrjänen, 2012; Roman und Munger, 2013). Eine Auflistung der verschiedenen Interaktionsproteine, die durch E7 beeinflusst werden, findet sich bei Rautava *et al.* (Rautava und Syrjänen, 2012) und Roman *et al.* (Roman und Munger, 2013). Im Folgenden beschrieben sind nur die Funktionen, die für die Karzinogenese am bedeutendsten sind.

Das Protein E7 wirkt inhibierend auf Proteine, die den Zellzyklus und die Proliferation hemmen und zugleich aktivierend auf Proteine, die das Zellwachstums fördern (Roman und Munger, 2013). Am besten untersucht ist hierbei die inhibierende Wirkung von E7 auf das Tumorsuppressorprotein Retinoblastom-Protein (pRB). In nicht transformierten Zellen ist der Zellzyklus sehr stark reguliert.

Hierdurch wird gewährleistet, dass die Zellteilung und Proliferation nur in Zellen mit intaktem Genom und bei ausreichend externen Wachstumsfaktoren stattfindet. Das Protein pRB wirkt physiologisch als Inhibitor des Zellzyklus an einer zentralen Stelle innerhalb der G1-Phase. Im nicht phosphorylierten Zustand ist pRB in der Lage, die Transkriptionsfaktorfamilie E2F (E2F1-8) zu binden und zu inhibieren. Dadurch wird die Zelle an einer weiteren Proliferation gehindert und kann nicht von der G1- in die S-Phase übertreten (Weinberg, 2013). In HPV transformierten Tumoren wird pRB durch das Protein E7 für den proteasomalen Abbau markiert und im Proteasom degradiert. Dadurch kann die Tumorzelle unabhängig von DNA-Schäden und Wachstumsfaktoren in die S-Phase übergehen, da der G1-Checkpoint nicht aktiv ist. Neben diesem Mechanismus wird auch p21 als ein weiteres den Zellzyklus regulierendes Protein von E7 inhibiert, wodurch ein durch DNA-Schäden induzierter Zellzyklusarrest zusätzlich unterdrückt wird. Neben der Beeinflussung des Zellzyklus ist eine Vielzahl von weiteren Signalwegen beschrieben, die durch E7 positiv oder negativ beeinflusst werden (siehe Abbildung 1). So ist auch eine Induktion von proangiogenetischen Faktoren wie dem vascular endothelial growth factor (VEGF), eine prometastatische Funktion durch Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), eine immunsuppressive Funktion durch Inhibierung von Interferon-Signalwegen und eine Inhibierung sowohl der DNA-Schadenserkennung (DDR) als auch der DNA-Reparatur beschrieben. Weitere Signalwege, die durch E7 beeinflusst werden, sind in Abbildung 1 nach ihrer jeweiligen Bedeutung für die Tumor Hallmarks dargestellt.

Die durch das Protein E7 initiierte Proliferation führt zu einem starken Stresssignal innerhalb der Zelle, da unkontrollierte Proliferation vermehrt Schäden im Genom verursacht und zelluläre Abbauprodukte entstehen. Physiologischer Weise würde dies unter anderem über die DDR zu einer Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 führen und hierdurch ein Zellzyklusarrest auftreten oder bei irreparablen Schäden die Apoptose initiiert werden. In HPV-transformierten Zellen wird die Aktivität von p53 jedoch durch das Protein E6 inhibiert. Somit kann in den Zellen weder ein Zellzyklusarrest noch die Apoptose eingeleitet werden. In nicht transformierten Zellen wird p53 durchgehend translatiert, jedoch durch das humane double minute protein 2 (HDM2) ubiquitinyliert und für den proteasomalen Abbau markiert. Somit findet man stets einen niedrigen Grundlevel von p53 Protein in Zellen (Weinberg, 2013). Durch DNA-Schäden und Zellstress kann p53 phosphoryliert werden und im Zellkern als tetramerer Transkriptionsfaktor (TF) eine Vielzahl an Gene aktivieren oder inaktivieren. Das Onkoprotein E6 blockiert p53, indem es mit der E3 ubiquitin Ligase, E6 associated protein (E6AP) interagiert und p53 vermehrt ubiquitinyliert und so der proteasomalen Degradation zuführt. Durch Blockade von p53 wirkt E6 zum einen synergistisch mit E7 auf die wachstumsfaktorunabhängige Proliferation der Zelle. Zum anderen kann die Zelle nicht effektiv in die Apoptose gehen, sodass Mutationen und genetische Instabilität gefördert werden.

Neben dieser für die Tumorgenese bedeutenden Funktion interagiert E6 wie auch E7 mit einer großen Zahl weiterer Proteine und kann so die Tumorentstehung vorantreiben. Wichtig hierbei ist eine Aktivierung der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT), wodurch die Zellen der Zellalterung durch Verkürzungen der Telomere entgehen und immortalisiert werden. Des Weiteren sind Interaktionen mit Signalproteinen der DNA-Schadenserkennung und – Reparatur, des Immunsystems und des Zelltodes beschrieben. Eine Übersicht der durch E6 beeinflussten Tumor Hallmarks findet sich in Abbildung 1.

Zwei ausführliche Übersichtsartikel zu sämtlichen Proteinen, die durch E6 beeinflusst werden, wurden durch Rautava *et al.* (Rautava und Syrjänen, 2012) und Vande Pol *et al.* (Vande Pol und Klingelutz, 2013) publiziert. Beiden viralen Proteinen gemeinsam ist, dass sie keinerlei katalytische Aktivität oder DNA-Bindedomäne besitzen und somit stets mit weiteren Bindungspartnern interagieren müssen, um zelluläre Prozesse zu beeinflussen (Roman und Munger, 2013; Vande Pol und Klingelutz, 2013).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sowohl E6 als auch E7 zwei äußerst effektive Onkogene sind, die teilweise synergistische und sich überlagernde Funktionen bei der Karzinogenese besitzen und für HPV+ Tumore die treibenden Onkoproteine darstellen. Durch E6 und E7 gemeinsam werden nahezu sämtliche Bereiche der von Hanahan und Weinberg beschriebenen Tumor Hallmarks beeinflusst, was das onkogene Potential beider Proteine verdeutlicht und ihre hohe Relevanz in der onkologischen Forschung begründet (siehe Abbildung 1).

1.2 Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion

Die leitliniengerechte Therapie von HNSCC basiert auf einem multimodalen Konzept bestehend aus operativer Tumoresektion, Radio- und Chemotherapie. Diese drei Therapiesäulen werden je nach Tumorstadium und Allgemeinzustand des Patienten einzeln, simultan oder sequentiell angewendet. In den meisten Stadien wird zunächst der Primärtumor operativ reseziert und sofern indiziert das zugehörige Lymphabflussgebiet durch eine "Neck Dissection" reseziert. Hierbei werden stadienabhängig neben den Lymphknoten auch Muskeln, Nerven und Gefäße entfernt. Eine elektive Neck Dissection wird auch bei fehlendem klinischen Nachweis einer lymphatischen Metastasierung empfohlen, da hierdurch die Prognose verbessert wird (Wolff, Follmann und Nast, 2012).

Neben der Tumoresektion stellt die Radiotherapie eine wichtige Therapiemodalität dar. Die perkutane Bestrahlung des Tumors kommt sowohl in adjuvanten als auch definitiven Therapiekonzepten zum Einsatz. Die Gesamtdosis liegt je nach Therapieschema und -intention zwischen 54 – 70 Gy (Seiwert, Salama und Vokes, 2007; Wolff, Follmann und Nast, 2012). Neben dem primären Ziel der Kuration kann die Radiatio in der palliativen Situation zur Symptomlinderung verwendet werden.

Zusätzlich zur konventionellen Fraktionierung (Einzeldosis: 1,8 – 2 Gy/Tag) haben sich die Möglichkeiten der Hypofraktionierung z.B. als integrierter Boost- (Einzeldosis > 2 Gy/Tag) oder Hyperfraktionierungen (z. B. Einzeldosis 1,4 Gy 2x /Tag) etabliert.

Diese können die lokale Tumorkontrolle verbessern, allerdings auch eine erhöhte Nebenwirkungswahrscheinlichkeit bedingen (Glenny *et al.*, 2010; Bourhis *et al.*, 2012). Die intensitätsmodulierte, bildgeführte Radiotherapie (IMRT) erlaubt heute, den Hochdosisbereich auf den Tumor zu beschränken und durch eine konformale Therapie Risikoorgane zu schonen, z. B. die Parotiden, um Nebenwirkungen zu reduzieren (Chao *et al.*, 2001).

In fortgeschrittenen Tumorstadien und bei Vorliegen von Risikofaktoren z.B. extrakapsulärem Tumorwachstum ist eine simultane Radiochemotherapie indiziert, die als adjuvantes oder definitives Therapiekonzept durchgeführt wird und zu einer Verbesserung der 5-Jahresgesamtüberlebensrate und der lokalen Tumorkontrolle von jeweils ca. 8 % führt (Bourhis *et al.*, 2012). In lokal fortgeschrittenen Stadien erlaubt die primäre simultane Radiochemotherapie einen besseren Organ- und Funktionserhalt als ein primär chirurgisches Vorgehen (Knecht *et al.*, 2016).

Folgende Zytostatika sind für die Kombinationstherapien von HNSCC zugelassen: Cisplatin, 5-Fluoruracil, Mitomycin C, Docetaxel. Cisplatin hat hier eine besondere Bedeutung, da die Substanz sowohl in Kombination mit anderen Chemotherapeutika und auch alleine mit einer Strahlentherapie effektiv wirkt.

Neben den klassischen Zytostatika wird mit dem Ziel der Reduktion von Nebenwirkungen der monoklonalen Antikörper Cetuximab in Kombination mit einer Photonenstrahlentherapie eingesetzt, der zu einer gezielten Inhibition des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) führt. Für fortgeschrittene HNSCC wurde in einer ersten Studie durch diese Kombination eine bessere Heilungsrate erreicht (Bonner *et al.*, 2006), die allerdings in nachfolgenden Studien nicht bestätigt werden konnte (Martins *et al.*, 2013).

Auch auf Zellkulturebene wurde für diese Kombination keine robuste Strahlensensibilisierung gefunden, weder für HPV+ noch für HPV- HNSCC-Zelllinien (Guster *et al.*, 2014). Weitere gezielte Therapieansätze zur Behandlung der HNSCC sind bisher nicht etabliert. Somit stellt die kombinierte Cisplatin basierte Radiochemotherapie den leitliniengerechten Therapiestandard für fortgeschrittene Tumore dar.

Die kombinierte Therapie bedingt eine Zunahme der Akuttoxizität der Radiatio, insbesondere der Schleimhauttoxizität, sodass momentan in Studien eine Deeskalation der Therapie für Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren und guter Prognose geprüft wird (Quon und Forastiere, 2013; Urban, Corry und Rischin, 2014). Dabei werden sowohl die Strahlendosis als auch die Chemotherapie Dosierung modifiziert. Bislang gibt es jedoch keine hinreichenden Erkenntnisse über die tumorbiologischen Grundlagen und Mechanismen, die das klinisch bessere therapeutische Ansprechen HPV-assoziiierter Tumore begründen (Chung und Gillison, 2009; Bol und Grégoire, 2014; Friedman, Stavas und Cmelak, 2014).

1.2.1 Effekte der Radiotherapie auf zellulärer Ebene

Grundlegend für die Wirkung der Radiotherapie auf Tumorzellen sind Ionisationsprozesse, also die Bildung reaktiver Ionen und Radikale durch Zugewinn oder Verlust von Elektronen. Diese Ionisationsprozesse führen auf direktem (Ionisation von Atomen der DNA) oder indirektem Weg (Bildung von freien Radikalen) zur Schädigung der DNA (Dikomey *et al.*, 2016). Indirekte Schäden werden in Zellen vorwiegend durch die Ionisation von Wasser und die dadurch entstehenden Radikale (u.a. H_2O_2 ; $\cdot OH$) vermittelt.

Nach Photonenbestrahlung mit 1 Gy kommt es im Zellkern zu etwa 1.000 Einzelstrang (SSB) und etwa 40 Doppelstrangbrüchen (DSB) (Dikomey *et al.*, 2016). DSB stellen die komplexeren und für das Überleben einer Zelle entscheidenden DNA-Schäden dar. Wenn DSB nicht oder fehlerhaft repariert werden, kommt es zum funktionellen bzw. definitiven Absterben der Tumorzellen. Dies kann entweder über einen permanenten Zellzyklusarrest (Seneszenz), über den programmierten Zelltod (Apoptose) oder über einen Verlust der Teilungsfähigkeit (Mitotische Katastrophe) geschehen, wobei letztere für die Empfindlichkeit von Tumoren gegenüber Strahlentherapie am bedeutendsten ist. Bei diesem sterben die Tumorzellen nach einigen Mitosen ab bzw. können die Zellteilung nicht mehr durchlaufen, da die verbliebenen DSB zu letalen Chromosomenaberrationen führen.

Generell kommt es nach Bestrahlung und Schädigung der DNA zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort (DDR). Durch die Proteine *ataxia telangiectasia mutated (ATM)* und *ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR)* kommt es zu einer teilweise p53-abhängigen Arretierung des Zellzyklus, der eine Reparatur der DNA-Schäden ermöglicht und so die Weitergabe der Schäden an Tochterzellen verhindert. Für die Reparatur strahlenbedingter DNA-Schäden ist die nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ) der am häufigsten genutzte Reparaturweg (Dikomey *et al.*, 2016). Beim NHEJ werden die freien DNA-Enden zunächst innerhalb eines Proteinkomplexes räumlich verbunden.

Anschließend werden die Enden durch Nukleasen prozessiert, um Basenfehlpaarungen zu vermeiden, durch Polymerasen kompatible DNA-Enden hergestellt und durch Ligasen verknüpft. Im Gegensatz zur Homologen Rekombination (HR), besteht bei diesem Reparaturweg die Möglichkeit, dass Informationen auf der DNA verloren gehen und Mutationen entstehen. Im Unterschied zur DNA-Reparatur mittels HR ist das NHEJ jedoch in allen Zellzyklusphasen aktiv und besonders in der G1- und frühen S-Phase, wenn kein homologes Schwesterchromatid vorliegt, für die Schadensreparatur essentiell (Lieber, 2010). Die Fähigkeit einer Zelle, strahleninduzierte DSB zu reparieren, ist essentiell, um Nebenwirkungen im gesunden Gewebe zu minimieren und gleichzeitig ein wichtiger Resistenzmechanismus in Tumorzellen, da Zellen mit einer vermehrten DNA-Reparatur wesentlich strahlenresistenter sind. Tumorzellen mit einer gestörten DDR sprechen daher deutlich besser auf eine Bestrahlung an (Dikomey *et al.*, 2016).

1.2.2 Zelluläre Wirkung von Cisplatin

Das Zytostatikum Cisplatin wird bereits seit vielen Jahrzehnten mit hoher Effektivität bei vielen soliden Tumoren eingesetzt. Die hohe Wirksamkeit bedingt allerdings auch zahlreiche, ggf. dosislimitierende Nebenwirkungen, u.a. Nephrotoxizität, Ototoxizität, sowie Neurotoxizität, die zu irreversiblen Polyneuropathien führen kann (Wang und Lippard, 2005).

Cisplatin wirkt als interkalierende Substanz hauptsächlich durch Schädigung der DNA, wobei auch Interaktionen mit Proteinen außerhalb des Zellkerns beschrieben sind (Cepeda *et al.*, 2007). Das parenteral verabreichte Cisplatin wird durch Hydrolyse zu einem reaktiven, zweifach positiv geladenen Aqua-Komplex. Dieser Prozess findet erst im Zytoplasma statt, da hier die Konzentration an Chloridionen wesentlich geringer ist als im Extrazellularraum. Dieser Aqua-Komplex interagiert intrazellulär mit Proteinen und im Zellkern mit der DNA (Wang und Lippard, 2005). Cisplatin interkaliert in die "große Furche" der DNA und bindet kovalent an das N₇-Atom von Guanin und Adenin. Hierdurch bilden sich sowohl Vernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Quervernetzungen), als auch zwischen zwei DNA-Strängen (Interstrang-Quervernetzungen) und zwischen DNA-Strängen und Proteinen, was Spannungen innerhalb der Doppelhelix erzeugt und eine korrekte Replikation und Transkription stört.

Diese DNA-Schäden, wie Doppel- und Einzelstrangbrüche können von Proteinen der DNA-Schadenserkennung detektiert werden und führen zur u.a. p53-vermittelten Aktivierung der DNA-Reparatursignalwege, zu einem Proliferationsstopp und bei irreparablen Schäden zum Zelltod. Die Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden findet über die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) und die HR statt. Bei ersterer wird der DNA-Abschnitt mit gebundenem Cisplatin exzidiert und die entstehende Lücke durch DNA Polymerasen geschlossen (Cepeda *et al.*, 2007). Bei der HR wird der geschädigte Abschnitt anhand des homologen DNA-Abschnitts auf dem Schwesterchromatid repariert. Dieser Reparaturweg ist jedoch nur innerhalb der späten S- und G₂-Phase des Zellzyklus, wenn ein Schwesterchromatid vorliegt, aktiv (Helleday *et al.*, 2007; Dikomey *et al.*, 2016). Die Schädigung der DNA durch Cisplatin bedingt, dass die Substanz in Kombination mit der Strahlentherapie deren Wirkung verstärkt (siehe 1.2.1).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

HPV+ und HPV- HNSCC werden momentan mit der gleichen Therapie behandelt (siehe 1.3). Für die kombinierte Radiochemotherapie fehlen bislang biologische Analysen, die zur Erklärung der unterschiedlichen Prognose beider Karzinome herangezogen werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Unterschiede im klonogenen Überleben, der Reparaturkapazität, dem Zellzyklusverhalten, dem Zelltod und der Proteinexpression zwischen HPV- und HPV+ Tumoren nach kombinierter Radiochemotherapie *in vitro* zu untersuchen. Die Analyse dieser biologischen Hintergründe ist nötig, um zukünftig spezifisch für HPV+ und HPV- HNSCC individuelle Therapieprotokolle entwickeln zu können.

2 Material und Methoden

Tabellen mit Auflistung der verwendeten Geräte, Plastik- / Glaswaren, Reagenzien und der benutzten Software und Internetseiten finden sich im Anhang A.

2.1 Charakteristika der verwendeten Zelllinien

Die folgenden Plattenepithelkarzinomzelllinien aus der Kopf- /Halsregion wurden für die Untersuchungen verwendet: UD-SCC-1, UM-SCC-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-6 (HPV -), UM-SCC-47, UM-SCC-104, UPCI:SCC-152, 93-VU-147T (HPV +). Die HPV+ Adenokarzinomzelllinien aus der Zervix SiHa, CaSki und HeLa-S3 dienten als Positivkontrollen zur Etablierung des Western Blots für die Proteine E6 und E7 des HP-Virus. Die Zelllinien wurden von folgenden Personen über ein Material Transfer Agreement zur Verfügung gestellt:

UD-SCC-1	Dr. Thomas Hoffmann, Universität Düsseldorf, Deutschland
UM-SCC-33	Dr. Reidar A. Grenman, Universität Turku, Finnland
UM-SCC-11b	Dr. Thomas E. Carey, Universität Michigan, USA
UM-SCC-6	Dr. Thomas E. Carey, Universität Michigan, USA
UM-SCC-47	Dr. Thomas E. Carey, Universität Michigan, USA
UM-SCC-104	Dr. Thomas E. Carey, Universität Michigan, USA
UPCI:SCC-152	Dr. Susanne M. Gollin, Universität Pittsburgh, USA
93-VU-147T	Johan P. de Winter, VU Medical Center Amsterdam, Niederlande
SiHa	Dr. Stefan Bauer, Philipps-Universität Marburg, Deutschland
CaSki	Dr. Stefan Bauer, Philipps-Universität Marburg, Deutschland
HeLa-S3	Dr. Kristin Dreffke, Philipps-Universität Marburg, Deutschland

Die in der Literatur vorbeschriebenen Charakteristika der Kopf-Halstumorzelllinien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Merkmale der verwendeten HNSCC Zelllinien unterteilt nach HPV-Status.

HPV-Status	Zelllinie	Alter/ Geschlecht d. Spenders	TNM-Stadium/ Grading des Tumors	Lokalisation des Primarius	Therapie	p53- Status	Referenzen
HPV-negativ	UD-SCC-1	64 / M	T3N2bM0/ G3	Oropharynx	UB	FS / wt	(Ballo <i>et al.</i> , 1999; Lansford <i>et al.</i> , 2002; Lin <i>et al.</i> , 2007)
	UT-SCC-33	86 / F	T2N0M0/ G2	Mundhöhle	UB	R282W	(Lansford <i>et al.</i> , 2002; Lin <i>et al.</i> , 2007)
	UM-SCC-11b	65 / M	T2N2aM0/ GX	Larynx	CT	C242S	(Lansford <i>et al.</i> , 2002; Lin <i>et al.</i> , 2007)
	UM-SCC-6	37 / M	T2N0M0/ GX	Zunge	UB	wt	(Grenman <i>et al.</i> , 1991; Friedman <i>et al.</i> , 2007; Zhao <i>et al.</i> , 2012)
HPV-Status	Zelllinie	Alter/ Geschlecht d. Spenders	TNM-Stadium/ Grading des Tumors	Lokalisation des Primarius	Therapie	p53- Status	Referenzen
HPV-positiv	UM-SCC-47	53 / M	T3N1M0/ G2	Mundhöhle	X	wt	(Lansford <i>et al.</i> , 2002; Lin <i>et al.</i> , 2007)
	UM-SCC-104	56 / M	T4N2bM0/ G2	Mundhöhle	CT + RT	wt	(Tang <i>et al.</i> , 2012)
	UPCI-SCC-152	47 / M	T2N0M0/ G2	Hypopharynx	RT	wt	(White <i>et al.</i> , 2007)
	93-VU-147T	58 / M	T4N2MX/ GX	Mundhöhle	UB	L257R / wt	(Steenbergen und Hermsen, 1995; Wald <i>et al.</i> , 2011; Rieckmann <i>et al.</i> , 2013)

UD = Heinrich Heine Universität Düsseldorf; UT = University of Turku; UM = University of Michigan; UPCI = University of Pittsburgh, VU = Vrije Universität Amsterdam; M = männlich; F = weiblich; T = Tumorgröße, N = Lymphknotenstatus; M = Fernmetastasen (nach im Jahr der Veröffentlichung gültiger UICC Klassifikation); UB = unbehandelt; CT = Chemotherapie; RT = Radiotherapie; X = unbekannt; FS = Frameshift; wt = Wildtyp; (veröffentlicht in Arenz *et al.*, 2014).

Der Nachweis des HPV-Status und die Prüfung der aktiven Replikation der HPV-16 Gene E6 und E7 wurden in unserem Labor durch Frau Dr. A. Arenz mittels real-time qPCR mit folgenden Primersequenzen nach Gao *et al.* (Gao *et al.*, 2013) durchgeführt:

HPV-16 E6 Forward ACAAACCGTTGTGTGATTTGTT
Reverse CAGTGGCTTTTGACAGTTAATACA

HPV-16 E7 Forward GAACCGGACAGAGCCCATTA
Reverse ACACTTGCAACAAAAGGTTACA

Die Identität der einzelnen Zelllinien wurde in einem externen Labor durch Profile von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP-Profile) und Short-Tandem Repeat Analyse (STR-Analyse) verifiziert (Castro *et al.*, 2013).

2.1.1 Kultivierungsbedingungen der Tumorzelllinien

Zur Kultivierung der Zelllinien wurde Roswell-Park-Memorial-Institute (RPMI) 1640 Zellkulturmedium verwendet, welches mit folgenden Zusätzen angereichert wurde (im folgenden Text als Vollmedium (VM) bezeichnet):

10 % fetales Kälberserum

1 % nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)

1 % Gentamycin (0,1 mg/ml)

1 % stabilisiertes Glutamine (200 mM)

Die Zelllinien wurden in Petrischalen (PS) mit einem Durchmesser von 10 cm mit 10 ml VM im Inkubator bei 37 °C mit 5 % CO₂ Begasung kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 80 – 90% Konfluenz regelmäßig passagiert, indem sie in einer neuen Zellkulturschale mit frischem VM in einer Verdünnung ausgesät wurden, die für jede Zelllinie adaptiert war. Zunächst wurde das verbrauchte VM abgesaugt, der Zellrasen mit 4 ml steriler Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA zur Ablösung der adhärent wachsenden Zellen beschichtet. Die Inkubation mit Trypsin erfolgte je nach Zelllinie für 5 bis 10 min im Inkubator, bis nahezu alle Zellen in Suspension vorlagen. Anschließend wurde die Wirkung des Trypsin/EDTA mit einer äquivalenten Menge VM neutralisiert. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml Reagenzröhrchen für 4 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Vollmedium re-suspendiert und die Zellen in einer neuen Zellkulturschale ausgesät. Insgesamt wurden die Zellen für maximal 30 Passagen kultiviert. Vor jedem Experiment wurde die Zellzahl am Mikroskop mittels Zählung in der Neubauerkammer bestimmt und eine definierte Zellzahl (siehe jeweiligen Versuch) ausgesät.

2.2 Konditioniertes Medium

Das konditionierte Medium bestand aus Vollmedium und steril filtriertem, verbrauchtem Medium jeder individuellen Zelllinie im Verhältnis 3:1. Die Verwendung von konditioniertem Vollmedium erfolgte, da sich unter Verwendung von nicht konditioniertem Vollmedium nach Auswaschen von Cisplatin kein Koloniewachstum erzielen lies. Dieser Effekt konnte ebenfalls in der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden und wird auf bisher nicht näher beschriebene autokrin sezernierte Faktoren zurückgeführt, die für eine Koloniebildung in den benutzten Zelllinien essentiell sind.

2.3 Wachstumskurven zur Bestimmung der Verdopplungszeit

Als Grundlage für weitere Experimente wurde die Verdopplungszeit durch Erstellung von Wachstumskurven für jede der acht Zelllinien bestimmt. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben in Suspension gebracht und gezählt. Anschließend erfolgte morgens die Aussaat von 1×10^4 Zellen / cm^2 mit 2 ml VM in Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm. Die Zellzählung erfolgte zweimal täglich mit einem Abstand von 8 h über einen Zeitraum von einer Woche. Am vierten Tag wurde in allen Zellkulturschalen das verbrauchte Medium durch frisches Medium ersetzt.

Zur Zählung wurde der Zellrasen mit 500 μl Trypsin/EDTA überschichtet und wie beschrieben im Brutschrank für 5-10 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 500 μl Medium abgestoppt, sodass alle Zellen in 1 ml Suspension enthalten waren. Hiernach wurde wie in 2.1.1 erläutert die Zellzahl ermittelt. Die Verdopplungszeit wurde anschließend im exponentiellen Abschnitt der Wachstumskurve bestimmt.

2.4 WST-1 Test zur Messung der Zellviabilität

Der WST-1 Test (water soluble tetrazolium-1) ist eine Methode, um das Überleben von Zellen nach einer Behandlung zu untersuchen. Die metabolische Aktivität der Zelle wird dabei indirekt über die Spaltung von Tetrazolin in Formazan gemessen. Ursächliche für die Spaltung ist das Enzym Succinate-Tetrazolin Reduktase, welches in der Atmungskette für die Reduktion von NADPH benötigt und nur in metabolisch aktiven Zellen funktionell vorhanden ist. Durch die Umwandlung kommt es zu einem Farbumschlag von blassem Rot zu Dunkelrot. Die Stoffmenge von Formazan, korreliert mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen und kann photometrisch quantifiziert werden.

Die Zellen wurden in einer Zellzahl von 2×10^4 Zellen / cm^2 in 96-Well Platten 24 h vor Behandlung ausgesät und anschließend für 24 h mit steigenden Konzentrationen Cisplatin (2,5 bis 40 μM) inkubiert. Nach Zugabe von 10 μL WST-1 Reagenz pro Well erfolgte eine erneute Inkubation bei 37°C für 1 h. Anschließend wurde die Absorption photometrisch (Mithras LB 940) bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert.

Die Viabilität (V) der Zellen nach Behandlung in Relation zur unbehandelten Kontrolle wurde anschließend berechnet (siehe Formel 1) und mittels nicht-linearer Regression eine Dosis-Wirkungskurve errechnet. Hierdurch konnte die Cisplatin-Konzentration ermittelt werden, bei der 50 % der Zellen metabolisch inaktiv waren (Inhibitorische Konzentration 50%; IC-50_{WST}).

$$V_x = \frac{A_x}{V_0} * 100 \% \quad \text{Formel (1)}$$

mit V_x : Viabilität nach Konzentration x; V_0 : Viabilität der Kontrolle = 1; A_x : gemessene Absorption nach Konzentration x.

2.5 Koloniebildungstest zur Messung des klonogenen Überlebens

Der Koloniebildungstest dient als Goldstandard zur Bestimmung der klonogenen Fraktion nach einer Behandlung. Erstmals von Puck und Marcus 1956 (Puck und Marcus, 1956) beschrieben, lässt sich hiermit die Zellfraktion ermitteln, die nach einer Behandlung noch zu einer unbegrenzten Zellteilung fähig ist. Hierbei werden nach einer Behandlung und anschließender Kultivierung der Zellen die Zellen gezählt, die in der Lage sind, eine Kolonie aus mindestens 50 Zellklonen zu bilden. Zellen, die direkt durch die Behandlung absterben, oder in einen irreversiblen Zellzyklusarrest (Seneszenz) versetzt werden, können hierdurch ebenso ausgeschlossen werden, wie Zellen, die nach wenigen mitotischen Teilungsphasen im sog. "mitotischen Zelltod" sterben. Der mitotische Zelltod stellt nach einer Bestrahlung eine wichtige Zelltodform dar.

Erste Arbeiten zum klonogenen Überleben wurden unter Anleitung von Frau Dr. A. Arenz gemeinsam durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Versuche zum klonogenen Überleben selbstständig geplant, durchgeführt und ausgewertet.

Zunächst wurde die Plattierungseffizienz (PE) jeder Zelllinien bestimmt. Hierzu wurden die Zellen in Suspension gebracht und eine steigende Anzahl an Einzelzellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 14 bis 18 Tagen wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 4 ml PBS gewaschen, anschließend für 10 min mittels 10 % Formaldehyd fixiert und mit 0,1 % Kristallviolett gefärbt. Abschließend wurde die überschüssige Farblösung verworfen und die Petrischalen vorsichtig mit H₂O gespült, um überschüssige Farbreste auszuwaschen. Nach Trocknen der Petrischalen wurden die Kolonien hinsichtlich Größe und Zellzahl unter dem Mikroskop begutachtet und alle Kolonien in einer Petrischale, die aus mindestens 50 Zellen bestanden, gezählt. Hieraus wurde die Plattierungseffizienz nach folgender Formel berechnet:

$$PE = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen}} \quad \text{Formel (2)}$$

Durch die Ermittlung der Plattierungseffizienz konnte zum einen die für jede Zelllinie individuell erforderliche Anzahl an Zellen ermittelt werden, welche benötigt wird, um im Kontrollansatz ca. 50 Kolonien zu erhalten. Zum anderen konnte der Einfluss der Zelldichte bei Aussaat auf die Plattierungseffizienz untersucht werden, da eine zu hohe, sowie eine zu geringe Zelldichte bei Aussaat die Koloniebildung beeinträchtigen (Franken *et al.*, 2006).

Zur Prüfung der klonogenen Fraktion nach Bestrahlung wurden die Zellen in steigender Zellzahl (200 - 24000 Zellen/PS) ausgesät. Die Aussaat erfolgte 14 h vor Bestrahlung, um zu gewährleisten, dass die Zellen am Boden der Zellkulturschale adhärent waren aber noch keine Zellteilung stattgefunden hatte.

Nach der Bestrahlung (siehe 2.10) mit Photonen in einer Dosierung von 0-8 Gy wurden die Zellkulturschalen für 14 bis 18 Tage inkubiert und hiernach wie oben beschrieben gefärbt und ausgezählt.

Zur Prüfung der klonogenen Fraktion nach Cisplatininkubation wurden die Zellen 8 h vor Beginn der Inkubation in steigender Zellzahl ausgesät und anschließend mit Cisplatin in steigender Konzentration (0 / 0,1 / 0,5 / 1 / 2 / 5 µM) inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde das cisplatinhaltige Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend 4 ml konditioniertes Medium in die Kulturschalen gegeben. Die Zellen wurden bis zur Zählung der Kolonien für weitere 14 bis 18 Tage inkubiert. Zur Testung der klonogenen Fraktion nach kombinierter Behandlung wurden die Zellen 14 h vor der Behandlung in steigender Zellzahl ausgesät. Die Zugabe von Cisplatin (0,5 µM) erfolgte unmittelbar vor der Bestrahlung. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde das Cisplatin-haltige Medium wie oben beschrieben durch frisches Medium ersetzt. Die Kolonien wurden nach 14-18 Tagen gezählt.

Die Auswertung der Koloniebildungstests erfolgte durch Berechnung der Überlebensfraktion (survival fraction, SF) und anschließender halblogarithmischer Darstellung nach Franken *et al.* 2006 (Franken *et al.*, 2006). Bei Bestrahlungsexperimenten wurde die Dosis-Effekt Kurve auf Grundlage der Messpunkte der Überlebensfraktionen bei jeder Dosis nach dem linearquadratische Modell berechnet (Franken *et al.*, 2006).

$$SF = \frac{\text{Anzahl Kolonien nach Behandlung}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen} * PE} \quad \text{Formel (3)}$$

Formel zur Berechnung des linearquadratischen Modells:

$$\frac{S(D)}{S(0)} = \exp(aD + bD^2) \quad \text{Formel (4)}$$

wobei S: Überlebensfraktion; D: absorbierte Dosis; a: Gewebekonstante der lineare Komponente; b: Gewebekonstante der quadratischen Komponente.

Auf Grundlage dieser Kurven konnten die Überlebensfraktion bei 2 Gy (SF₂, survival fraction bei 2 Gy) und die dose enhancement ratio (DER) als Verhältnis der SF nach Kombinationsbehandlung mit der SF nach alleiniger Bestrahlung berechnet werden. Dafür gilt:

$$DER_2 = \frac{SF_{2_{RT}}}{SF_{2_{RCT}}} \quad \text{Formel (6)}$$

mit DER: dose enhancement ratio; SF_{2_{RT}}: Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy; SF_{2_{RCT}}: Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy und simultaner Cisplatininkubation.

2.6 Proteinbiochemie zur Messung der Proteinexpression

Durch Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien kann es zu Änderungen in der Proteinexpression onkogener oder tumorsuppressiver Proteine innerhalb der Tumorzellen kommen. Solche Änderungen in der Proteinexpression wurden mittels Western Blot Analyse quantifiziert.

Die Durchführung der Western Blots, im Besonderen die Gelelektrophorese, das Blotten und die Detektion erfolgte unter Mithilfe von Frau S. Preising. Die Planung der Versuche, die Probengewinnung und Analyse wurden komplett selbstständig durchgeführt.

Die Zelllinien wurden hierzu in einer Zellzahl von 2×10^4 Zellen / cm² ausgesät und 24 h später bestrahlt (6 Gy) und / oder mit Cisplatin (20 µM) behandelt. Die Analyse der Proteinexpression nach unten aufgeführtem Protokoll erfolgte zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 h nach Behandlung.

Zum Analysezeitpunkt wurden die Petrischalen auf Eis gestellt, um eine Änderung der Proteinexpression zu inhibieren. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit eiskaltem PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Zum Lysepuffer (siehe Tabelle 3.) RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer) wurden jeweils frischer Proteaseinhibitoren Cocktail (PIC) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS) zugegeben. Der Zellrasen wurde mit 200 µl eiskaltem Lysepuffer überschichtet und die Zellen mittels Zellschaber von der Petrischale gelöst. Das Lysat wurde anschließend mit einer 21 G Kanüle und einer Spritze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und fünfmal durch die Spritze vorsichtig auf- und abgesogen. Hierdurch konnten die Zellen durch die Scherkräfte zusätzlich vereinzelt werden. Die Proben wurden für 20 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Puffers zur Herstellung von Proteinlysaten und der Proteaseinhibitoren.

RIPA Lysepuffer	150 mM NaCl 1,0 % NP-40 0,5 % Deoxycholat 0,1% SDS 50 mM Tris-HCl pH 8.0
Proteaseinhibitoren Cocktail 5 Mamm/Cell (PIC)	gelöst in Milli-Q H ₂ O (100x Stammlösung) 500 µM AEBSF HCl 150 nM Aprotinin 1 µM E-64 1 µM Leupeptin-Hemisulfat
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS)	100 mM in EtOH

Zur Bestimmung der Proteinmenge jeder Probe wurde der Bicinchoninsäure (BCA) Assay verwendet, welcher auf der Reduktion von zweifach-positiven Kupferionen zu einfach-positiven Kupferionen basiert. Die Reaktion wird temperaturabhängig durch Aminosäurereste und Peptidbindungen vermittelt. Die reduzierten Kupferionen bilden mit der Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex, der zu einem Farbumschlag von Hellblau ins Violette führt. Die Menge an Protein korreliert mit der Intensität des Farbumschlages, der photometrisch bestimmt werden kann. Hierzu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration angefertigt und eine Standardkurve erstellt. Die Standardreihe wurde mit Bovinem Serum Albumin (BSA) angefertigt. Hierzu wurde die Stammlösung (5 mg/ml) mit RIPA-Puffer in folgenden Verdünnungen erstellt:

2500 µg/ml; 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml; 62,5 µg/ml; 0 µg/ml (Leerwert nur Lysepuffer).

Die Analyse der Standardreihe und der Proben erfolgte in 96 well-Platten jeweils in Duplikaten. Hierzu wurden 25 µl Probe bzw. Standard vorgelegt und 200 µl Arbeitsreagenz (Pierce BCA Protein Assay Reagenz A (Bicinchoninsäure) und Pierce BCA Protein Assay Reagenz B (Kupfersulfat); Verhältnis 50:1) in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 25 min bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 526 nm in einem Plattenreader photometrisch bestimmt. Anhand des Proteinstandards konnte die Proteinmenge jeder Probe spezifisch ermittelt werden.

Mittels Gelelektrophorese (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Elektrophorese, SDS-PAGE) können Proteine anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Die Gelmatrix, in der die Proteine laufen, basiert auf Acrylamidpolymeren. Zur Polymerisation des Acrylamids wird Tetramethylethylendiamin (TEMED) über Ammoniumperoxodisulfat (APS) aktiviert und eine Kettenreaktion eingeleitet, die zu N'-N'-Methylenbisacrylamid Quervernetzungen führt. Da die Polymerisierungsreaktion direkt durch die Zugabe von TEMED eingeleitet wird, wurde TEMED unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben.

Eine hohe Konzentration an Acrylamid führt zu einer kleinporigen Matrix und ermöglicht die genauere Auftrennung kleiner Proteine, während große Proteine bei niedrigeren Acrylamidkonzentrationen besser aufgetrennt werden. Die Geltaschen wurden durch einen Gelkamm (0.75 mm) gebildet. Die gegossenen Gele wurden anschließend bei 4°C für 24 h gelagert, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Proteine p53, HPV-16 E6 und HPV-16 E7 Trenngele mit 12 % Polyacrylamid und für die Proteine Cyclin A2 und E2 Trenngele mit 8 % Polyacrylamid verwendet. So konnte je nach zu bestimmendem Protein eine ideale Auftrennung der Proben im Größenbereich dieses Proteins gewährleistet werden. Zusätzlich wurde bei beiden Trenngelen ein Sammelgel (5 % Polyacrylamid) vorgeschaltet, um die Proben in einer scharfen Bande zu sammeln und anschließend die Proteine gleichmäßig im Trenngel zu separieren. Zunächst wurden die Trenngele in Gelkammern gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche und einen Luftausschluss zu erzielen. Nach 25 min Polymerisation wurde das Isopropanol mittels Filterpapier entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Eine Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für die SDS-PAGE.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (8 %)	Trenngel (12 %)
Milli-Q H₂O	3,05 ml	4,7 ml	3,4 ml
Acrylamid Rotiphorese® 30 Gel (Acrylamid:Bisacrylamid 5:1)	650 µl	2,7 ml	4,0 ml
Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	-	2,5 ml	2,5 ml
Tris HCl 0,5 M (pH 6,8)	1,25 ml	-	-
10 % SDS	50 µl	100 µl	100 µl
APS	25 µl	75 µl	75 µl
TEMED	5 µl	7,5 µl	7,5 µl

Die Proteinproben wurden mit einer Proteinmenge von 20 µg in 20 µl aufgetragen. Hierzu wurden die Proben mit Reinstwasser entsprechend verdünnt und 5 µl 4X Ladepuffer hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Gele wurden in den Laufständer eingespannt und die Kammer mit 1x Laufpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) gefüllt. Das Gesamtvolumen (20 µl) der Proben wurde in die vorbereiteten Gele pipettiert und zusätzlich 5 µl eines Molekulargewichtsstandards als Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10-170 kDa , # 26616, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 90 min. Danach wurden die Gele im Western Blot weiter verarbeitet.

Tabelle 5: Zusammensetzung des verwendeten Laufpuffers.

10x Laufpuffer (pH 8,8)	30,3 g Tris Base 144,0 g Glycin 10,0 g SDS Auffüllen auf 1l mit Milli-Q H ₂ O
--------------------------------	---

Mittels Western Blot lassen sich die in der Elektrophorese anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen. Hierzu wurde das semidry Blotverfahren angewendet. Die Membran und das Filterpapier wurden jeweils auf die erforderliche Größe geschnitten. Zunächst wurden die PVDF-Membranen (Polyvinylidenfluorid, 0,2 mm Porengröße) für 2 min in Methanol aktiviert und danach in Milli-Q H₂O gewaschen. Filterpapier und Membranen wurden anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Die fertig gelaufenen Gele wurden ebenfalls auf die erforderliche Größe geschnitten und das Sammelgel abgetrennt. Anschließend wurde der Blot in der Blotkammer wie folgt zusammengebaut:

Anode - Filterpapier – Membran – Gel –Filterpapier – Kathode.

Hierbei wurde darauf geachtet, dass Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten vermieden wurden und die Blotkammer leicht mit Transferpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 6) befeuchtet war. Der Transfer der Proteine erfolgte über 1 h bei 1,2 mA pro cm² Membran.

Tabelle 6: Zusammensetzung des verwendeten Transferpuffers.

Transferpuffer (pH 8,3)	3,03 g Tris Base 14,4 g Glycin Auffüllen auf 800 ml mit Milli-Q H ₂ O 200 ml Methanol 1 ml 10 %iges SDS
--------------------------------	--

Die auf die Membran übertragenen Proteine können mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Hierbei bindet zunächst ein für das Protein spezifischer primärer Antikörper an das Protein auf der Membran und anschließend kann ein sekundärer Antikörper an dem primären Antikörper binden.

Zunächst wurden die Membranen für 1 h in 5 % Milch in TBST geblockt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit TBST wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung auf die Membran gegeben und bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST für 10 min entfernt, die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper auf dem Schüttler inkubiert und anschließend erneut dreimalig mit TBST für 10 min auf dem Schüttler

gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Pipettieren von eigens angesetztm Enhanced Chemiluminescence (ECL) -Reagenz nach Haas *et al.* (Haas Stefan Jean-Pierre, 2005) auf die Membran. Hierbei wird das Luminol durch die horseradish peroxidase (HRP) des Sekundärantikörpers oxidiert. Die dabei entstehende Chemolumineszenz wurde mittels eines Intas Chemocam Imagers detektiert. Das ECL wurde vor jeder Detektion frisch angesetzt (5 ml Solution A + 3 µl H₂O₂ + 500 µl Solution B) und in der Detektierkammer direkt auf die Membran gegeben. Die Membran wurde abhängig von dem untersuchten Protein für 0,5 bis 5 min belichtet. Die Auswertung der Proben erfolgte mit der Software Quantity One. Anschließend wurde die Proteinexpression auf das Haushaltsprotein GAPDH normalisiert und in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Die zur Analyse verwendeten Antikörper finden sich in Tabelle 7, die Zusammensetzung des Waschpuffers und der ECL-Reagenz in Tabelle 8.

Tabelle 7: Auflistung der zur Proteindetektion verwendeten Antikörper.

Protein	primärer Antikörper	Verdünnung (5 % BSA in TBST)	sekundärer Antikörper	Verdünnung (TBST)
p53	Mouse anti-p53 –Klon DO-7 - #554294, BD Pharmingen	1:1500	Goat anti-Mouse IgG HRP - #AP308P, Millipore	1:5000
HPV-16 E7	Mouse anti-HPV-16 E7 – Klon ED17 – #sc-6981, Santa Cruz Biotechnology	1:200	Goat anti-Mouse IgG HRP - #AP308P, Millipore	1:5000
HPV-16 E6	Mouse anti-HPV-16 E6 – Klon E1-6F4 - Euromedex	1:1000	Goat anti-Mouse IgG HRP - #AP308P, Millipore	1:5000
Cyclin E2	Rabbit anti-Cyclin E2 - #4132, Cell Signaling	1:1000	Goat anti-Rabbit IgG HRP - #AP132P, Millipore	1:5000
Cyclin A2	Mouse anti-Cyclin A2 – Klon BF683 - #4656, Cell Signaling	1:2000	Goat anti-Mouse IgG HRP - #AP308P, Millipore	1:5000
GAPDH	Rabbit anti-GAPDH – Klon 14C10 -#2118, Cell Signaling	1:3000	Goat anti-Rabbit IgG HRP - #AP132P, Millipore	1:5000

Table 8: Zusammensetzung des verwendeten Waschpuffers und der Enhanced Chemiluminescence Reagenz.

TBST	100 ml 10x TBS (pH 7,4)	12,1 g Tris Base 43,8 g NaCl Auffüllen auf 500 ml mit Milli-Q H ₂ O
	1 ml Tween 20 900 ml Milli-Q H ₂ O	
ECL	Solution A	200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) 500 mg Luminol
	Solution B	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure 10 ml DMSO

2.7 Durchflusszytometrie zur Analyse der Zellzyklusprogression

Die Bestrahlung ebenso wie eine Behandlung mit Zytostatika können neben einem Zelltod auch zu einer Arretierung der Zellen an spezifischen Punkten innerhalb der einzelnen Zellzyklusphasen führen, einen permanenten Arrest induzieren oder nach kurzem Arrest einen Zelltod initiieren (Fojer und te Riele, 2006; Maddika *et al.*, 2007).

Während des Zellzyklus verändert sich der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen von einem einfachen DNA-Gehalt (2n) in der G1-Phase zu einem doppelten DNA-Gehalt (4n) in der G2/M-Phase. Innerhalb der S-Phase weisen die Zellen einen intermediären DNA-Gehalt auf. Abgestorbene Zellen und Zelltrümmer, die DNA-Fragmente enthalten, finden sich in der sog. subG1-Phase. Diese kann zur Analyse des Zelltodes genutzt werden (siehe 2.8.).

Die Änderung des DNA-Gehaltes (von 2n zu 4n) kann mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) detektiert werden. So sind Rückschlüsse auf die Proliferation und die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen möglich.

Im Experiment wurde zur Messung des DNA-Gehalts der Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) verwendet. PI interkaliert nicht nur in die DNA sondern auch in andere Nukleinsäurestrukturen (z.B. RNA), was zu einem fälschlich hohen Fluoreszenzsignal führen würde. Um dies zu vermeiden, wurde den Proben RNaseA zugesetzt, die zu einer Verdauung von RNA Strukturen führt.

Für den Versuch wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^4 Zellen / cm² in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h entweder nur bestrahlt (6 Gy), mit Cisplatin (20 µM) behandelt oder kombiniert behandelt, wobei Cisplatin direkt vor der Bestrahlung zu den Zellen pipettiert wurde. Anschließend wurden die Zellen bis zum jeweiligen Analysezeitpunkt inkubiert. Zum Analysezeitpunkt wurde zunächst das Medium in ein 15 ml Reagenzröhrchen überführt, der Zellrasen mit 4 ml PBS gewaschen und danach das PBS zum Medium in das Reagenzröhrchen pipettiert, um bereits gelöste Zellen und Zellreste nicht zu verwerfen.

Der Zellrasen wurde mit 1,5 ml Accutase überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen für 10 min inkubiert. Das Gemisch aus Medium und PBS wurde für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen.

Die durch Accutase abgelösten Zellen wurden mit einer Pipette vereinzelt und zu dem Pellet in das 15 ml Reagenzröhrchen gegeben. Zuletzt wurde bei mildem Vortexen 3,5 ml Ethanol (100%) zu der Zellsuspension pipettiert, um die Zellen zu fixieren. Die Zellen wurden so bis zur Färbung und Analyse bei -20°C gelagert.

Zum Färben der Proben wurden die Zellen zunächst für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und anschließend das Pellet mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet je nach Größe in 250 – 500 µl frisch angesetztem Färbepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) resuspendiert und für mindestens 30 min lichtgeschützt inkubiert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des verwendeten Färbepuffers.

Färbepuffer	Propidiumiodid (Stock 1 mg/ml)	20 µg/ml
	RNaseA (Stock 5 mg/ml)	200 µg/ml
	Triton X-100 (Stock 10%)	0,1 %
	in 1x PBS	

Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte unter Anleitung von Frau Dr. A. Arenz am Durchflusszytometer LSR II in der Flow Cytometry Core Facility der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Philipps-Universität Marburg. Zur Anregung der Zellen wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet und die Emission von PI im PerCP-Fluoreszenzkanal (Peridinin-chlorophyll-Protein Kanal) gemessen. Die Flussrate wurde so eingestellt, dass möglichst nur eine Zelle zu einem Zeitpunkt den Laser passieren kann. So wurde vermieden, dass zwei Zellen mit einfachem DNA-Gehalt, die gemeinsam den Laser passieren, als eine größere Zelle mit doppeltem DNA-Gehalt detektiert werden. Insgesamt wurden pro Probe mindestens 20.000 Zellen detektiert.

Die Auswertung der Proben erfolgte mit der Software FlowJo 7.5. Für die Auswertung wurden die Zellen anhand ihrer Morphologie im Forward und Sideward Scatter (FSC und SSC) beurteilt und Zelldebris ausgeschlossen. Anschließend wurden über die Pulsweite des PerCP-Signals (PerCP-W) Dubletten aussortiert. Zuletzt wurde die Zellzyklusverteilung der Zellen anhand eines Algorithmus nach Watson *et al.* (Watson, Chambers und Smith, 1987) im PerCP-A (PerCP Fläche) Kanal als Histogramm dargestellt. Anhand dieser Werte wurde die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen im Balkendiagramm dargestellt und die Änderung der Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen in Relation zur unbehandelten Kontrollprobe analysiert.

2.8 Detektion der Apoptose

Zytostatika wie z.B. Cisplatin und ionisierende Strahlung können in Zellen einen sog. programmierten Zelltod induzieren, wobei vorwiegend drei mechanistisch unterschiedliche Formen unterschieden werden: Nekrose, Autophagie und Apoptose (Kroemer, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose als ein bedeutender Zelltodmechanismus untersucht (Long und Ryan, 2012).

Da die einzelnen Zelltodmechanismen teilweise durch sich überlappende Signalkaskaden gesteuert und gleiche Proteine exprimiert werden, wurden zur Unterscheidung und genauen Bestimmung der Zelltodart mehrere Testverfahren kombiniert (Galluzzi *et al.*, 2012). Zusätzlich zu der unter 2.8 beschriebenen Methode wurde der Anteil der Zellen untersucht, der sich im Zellzyklus in der subG1-Phase befand (vgl. hierzu 2.7).

Des Weiteren wurde die Apoptoserate durch ein Annexin V-FITC / PI Assay analysiert. Prinzip dieses Assays ist es, dass die Zellmembran als Lipiddoppelschicht unterschiedliche Verteilungsmuster der einzelnen Lipide zwischen Innen- und Außenschicht aufweist. So findet sich in vitalen Zellen Phosphatidylserin als anionisches Phospholipid nur auf der inneren Membran. Zu einem frühen Zeitpunkt in der Apoptose und während der Formation der so genannten Apoptosekörperchen (apoptotic bodies) wird Phosphatidylserin von der Inneren- in die äußere Membran verlagert. *In vivo* dient dies als Makrophagen stimulierendes Signal und induziert eine Phagozytose der Apoptosekörperchen (Long und Ryan, 2012). In dem hier durchgeführten Assay dient das Phosphatidylserin als Bindepartner für Annexin V. Dieses Phospholipid-bindende Protein weist eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin auf, kann aber keine intakte Zellmembran passieren. Somit bindet es nur an Phosphatidylserin, wenn dieses in die äußere Membran verlagert wird. In diesem Assay ist Annexin V an das Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. So kann das Signal mittels FACS detektiert und die Rate an früh apoptotischen Zellen analysiert werden. Um auch spätapoptotische Zellen zu detektieren und diese ebenfalls analysieren zu können, wurde zusätzlich zum Annexin V-FITC der unter 2.7 beschriebene Stoff Propidiumiodid (PI) verwendet. Damit PI sich in die DNA einlagern kann, muss die Zellmembran bereits größere Lücken aufweisen, was erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Apoptose geschieht. Somit sind frühapoptotische Zellen negativ für PI aber positiv für Annexin V-FITC, während spätapoptotische Zellen sowohl für PI als auch Annexin V-FITC positiv sind.

Für den Assay wurden die Zellen 24 h vor Beginn der Behandlung in einer Zellzahl von 2×10^4 Zellen / cm^2 ausgesät und 24 h und 72 h nach Bestrahlung (6 Gy) und / oder Cisplatininkubation (10 μM) analysiert. Zunächst wurde das Zellmedium in ein 15 ml Reagenzröhrchen überführt, die Zellen anschließend mit PBS gewaschen und das PBS ebenfalls in das Reagenzröhrchen gegeben. So konnten auch nicht mehr adhärenente Zellen, die im Medium flottieren, mit erfasst werden. Medium und PBS wurden bei 1200 rpm für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Währenddessen wurde der Zellrasen mit 2 ml Accutase überschichtet und bis zum Ablösen aller Zellen (ca. 10 min) inkubiert. Die gelösten Zellen wurden zum Pellet hinzu pipettiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 500 µl Binding Buffer (Binding Buffer + 5 µl Annexin V-FITC + 5 µl PI) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation im Dunkeln erfolgte die durchflusszytometrische Messung am Durchflusszytometer LSR II und die anschließende Analyse mit dem Analyseprogramm FlowJo 7.5. Hierbei wurden die Zellen zunächst wie unter 2.7 als Dotplot anhand von FSC und SSC dargestellt und Zelltrümmer ausgeschlossen.

Danach wurden die eingeschlossenen Zellen ebenfalls als Dotplot mit dem PI-Signal auf der Ordinate und FITC-Signal auf der Abszisse dargestellt. Der Dotplot wurde in vier Quadranten nach folgendem Kriterium unterteilt: Q1 PI-positive / FITC-negative Zellen; Q2 PI- / FITC-positive Zellen; Q3 PI-negative / FITC-positive Zellen; Q4 PI- / FITC-negative Zellen. Zellen in Q1 wurden aus der Auswertung ausgeschlossen, da die Rolle eines nur PI-positiven Signals bislang nicht genau geklärt ist. So finden sich in diesem Quadranten wahrscheinlich u.a. RNA als auch sehr spät nekrotische Zellen, die nicht voneinander unterschieden werden (Cummings, Wills und Schnellmann, 2004; Rieger *et al.*, 2010). In den anderen Quadranten befinden sich nach dem Gating folgende Populationen: Q4 vitale Zellen; Q3 frühapoptotische Zellen; Q2 spätapoptotische Zellen. Die Summe der Zellen aus Q2-4 wurde auf 100 % normiert und die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Quadranten mit dem Programm GraphPad Prism 5 berechnet (siehe Anhang B Abbildung A 3).

2.9 Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen -Immunfluoreszenzfärbung

DNA-Doppelstrangbrüche (DDSBs) stellen den wesentlichen Schadensmechanismus nach ionisierender Bestrahlung und nach Cisplatininkubation dar. Mittels Immunfluoreszenzfärbung können die durch eine Behandlung verursachten DDSBs in den Zellen detektiert werden. Hierbei bindet zunächst ein proteinspezifischer Antikörper an das Zielprotein. Im Falle von DDSBs eignet sich hierzu die phosphorylierte Form des Histons 2AX (γ H2AX), das mit anderen Proteinen einen Komplex an der Stelle des Doppelstrangbruches bildet und sich daher als Marker für DDSBs etabliert hat. An den an γ H2AX gebundenen Primärantikörper bindet ein Sekundärantikörper, der spezifisch gegen die Spezies ist, in welcher der Primärantikörper generiert wurde. Dieser sekundäre Antikörper ist zusätzlich mit einem Fluorochrom gekoppelt und so unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Die Zellen wurden für die Detektion von γ H2AX-Foci in einer Zellzahl von 2×10^4 Zellen / cm^2 auf Deckgläschen in einer 6 Well-Platte ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz wurden die Zellen mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, mit Cisplatin ($0,5 \mu\text{M}$) inkubiert oder mit einer Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min zur Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 10 min auf dem Schüttler wurde das überschüssige PFA entfernt. Um eine Antikörperbindung an die Zielstruktur im Inneren der Zelle zu ermöglichen, erfolgte anschließend die Permeabilisierung mit 500 µl Triton X-100 für 20 min auf dem Schüttler. Die Proben wurden danach dreimalig für je 10 min auf dem Schüttler gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit 500 µl Blockierlösung überschichtet, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit dem primären Antikörper inkubiert. Hierzu wurden 20 µl Antikörper auf einen Parafilm pipettiert und die Deckgläschen anschließend mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf die Antikörperlösung gelegt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten, lichtgeschützten Kammer bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Deckgläschen in eine 6 well-Platte überführt und dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörperreste zu entfernen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls auf Parafilm für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung wurde die DNA mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. Hierzu wurden die Deckgläschen erneut auf Parafilm mit 20 µl DAPI-Lösung in einer feuchten, lichtgeschützten Kammer für 20 min inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen viermal mit PBS gewaschen und mit 20 µl Eindeckmedium (Mowiol/Dabco) auf Objektträgern eingebettet. Die Proben wurden bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Zusammensetzung der hierzu verwendeten Lösungen und Antikörper findet sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Zusammensetzung der für Detektion der DDSBs verwendeten Lösungen und Antikörper.

Permeabilisierungslösung	1x PBS 1 % BSA 0,25 % Triton X-100
Blockierlösung	1x PBS 1 % BSA 10 % FCS
Waschpuffer	1x PBS 1 % BSA 0,5 % Tween 20
Primärantikörper (1:150)	Mouse anti-phospho-Histone H2AX – Klon JBW310, Millipore
Sekundärantikörper (1:200)	Alexa Fluor-488 conjugated Goat anti-Mouse – PK-PF-488-AK-M1, Promokine
DNA-Farbstoff (Stock 5mg/ml; 1:2000)	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Roth
Eindeckmedium	Mowiol/Dabco

Die gefärbten Proben wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus IX81) ausgewertet und repräsentative Zellen fotografiert. Für die Auswertung wurden in jeder Probe mindestens 100 Zellkerne analysiert und die Anzahl der γH2AX-Foci bestimmt.

Zellen, die ein zu starkes pannukleäres Signal für γ H2AX aufwiesen, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für die Auswertung wurde die Anzahl der Foci auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

2.10 Bestrahlung von Zellkulturen

Die Bestrahlung der Zellen für Koloniebildungstests und die Detektion von Doppelstrangbrüchen erfolgte mit 6 MeV Photonen am Linearbeschleuniger (Elekta Supernova, Elekta, Stockholm, Schweden) in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg bei Raumtemperatur. Vor Beginn der Experimente wurde durch die Medizinische Physik der Abteilung (Leitung: Prof. Dr. K. Zink) eine Absolutdosimetrie durchgeführt. Der Aufbaueffekt wurde berücksichtigt, indem die Zellkulturschalen auf einer 1,5 cm dicken Polymethylmethacrylat-Platte gelagert wurden und aus einem Gantrywinkel von 180° bestrahlt wurden, sodass das Dosismaximum im Bereich der bestrahlten Zellen lag. Der Fokus-Oberflächenabstand (Zellkulturschalen) betrug 105 cm. Als Streukörper wurde eine 3 cm dicke Polymethylmethacrylat-Platte auf die Zellkulturschalen aufgelegt. Die Dosisleistung betrug 4 Gy / min.

Alle weiteren Bestrahlungsexperimente wurden an der experimentellen Röntgenbestrahlungseinrichtung X-RAD 320iX im strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) durchgeführt. Die Röntgenröhre für die Forschung wurde während der Experimentalphase der Arbeit installiert. Da hierdurch der für die Zellen aufwändige Transport in die Klinik für Strahlentherapie entfiel, wurden die weiteren Bestrahlungsexperimente im BMFZ durchgeführt. Hierbei erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit Photonen einer Energie von 320 kV. Durch einen Filter (0,5 mm Kupfer + 0,5 mm Aluminium) wurde niedrigenergetische Strahlung herausgefiltert. Die Zellkulturschalen wurden auf einer 3 cm dicken Polymethylmethacrylat-Platte als Rückstreukörper gelagert. Die Dosisrate betrug 1,2 Gy / min. Vor Beginn der Experimente wurde auch an diesem Gerät eine Absolutdosimetrie durch Medizinphysikexperten der Abteilung durchgeführt.

2.11 Inkubation mit Cisplatin

Cisplatin (1 mg/ml) wurde durch die Zentrale Zytostatika Zubereitung des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, bereitgestellt. Hieraus wurde eine Stammlösung (0,33 mg /ml in 0,9 % NaCl), die maximal eine Woche aufbewahrt wurde, hergestellt. Die Endkonzentration für den jeweiligen Versuch wurde durch Verdünnung der Stammlösung in Zellkulturmedium erzielt. Cisplatin wurde, sofern nicht anders angegeben, entsprechend der Halbwertszeit im menschlichen Körper für 24 h in den Zellkulturschalen belassen und anschließend mittels Mediumwechsel und einmaligem Waschen mit PBS aus den Kulturschalen entfernt.

Für die Kombinationsexperimente wurde Cisplatin unmittelbar vor der Bestrahlung in die Zellkulturschalen pipettiert und anschließend für 24 h, sofern nicht anders angegeben, zur Inkubation in den Kulturgefäßen belassen und anschließend wie oben beschrieben ausgewaschen.

2.12 Geräte, Plastik und Glaswaren, Reagenzien

Tabellen mit Auflistung der verwendeten Geräte, Plastik- / Glaswaren, Reagenzien und der benutzten Software und Internetseiten finden sich im Anhang A dieser Arbeit.

2.13 Datenanalyse und Statistische Auswertung

Die Daten der einzelnen Untersuchungen wurden zunächst in Excel übertragen und Berechnungen wie Normierungen auf Kontrollen und Haushaltproteine wurden mit Excel durchgeführt. Anschließend wurden die Daten der einzelnen Versuche in Graph Pad Prism übertragen und hier zunächst Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Sofern nicht anders angegeben, wurde aus diesen Werten eine entsprechende Grafik in Graph Pad Prism generiert. Zudem wurden sämtliche statistische Berechnungen mit dem Programm Graph Pad Prism durchgeführt.

Für die Auswertung der Zelllinien anhand ihres HPV-Status wurden die Zellen in HPV+ und HPV- Zelllinien gruppiert und jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen für beide Gruppen berechnet. Anschließend wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mittels zweiseitigem Student's-t Test auf Signifikanz überprüft. Als Signifikanzniveau wurde hierbei ein p-Wert < 0,05 gewählt.

Zum Vergleich der Behandlungsgruppen (Kontrolle vs. Bestrahlung vs. Cisplatin vs. Bestrahlung + Cisplatin) untereinander bei verschiedenen Messzeitpunkten wurde eine Varianzanalyse mittels Zweifache Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Der post-Hoc Test nach Bonferroni wurde angewendet, um Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich ihrer Signifikanz zu testen. Man teilt hierzu das Signifikanzniveau (0,05) durch die Anzahl an Messungen und testet anschließend alle Reihen gegen dieses neue Signifikanzniveau. Hierdurch kann trotz multiplen Testungen eine Kumulation des Alphafehlers vermieden werden. Allerdings können nur große Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden (Greenhalgh, 1997).

Die Untersuchung, ob Korrelationen zwischen verschiedenen untersuchten Endpunkten bestehen, erfolgte durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) und Testung der Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des HPV-Status in HNSCC Tumorzelllinien

Zunächst wurde überprüft, ob die vier Zelllinien, die als HPV+ beschrieben sind (UM-SCC-47, UM-SCC-104, 93-VU-147T, UPCI:SCC152) auch tatsächlich virale DNA aufweisen. Im Kooperationslabor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Justus Liebig Universität, Gießen wurde durch Frau Mayer mittels PCR für das virale L1 Gen der in der Literatur beschriebene HPV-Status bestätigt. Hierzu wurden die Primer (GP5+ und GP6+) wie in der Arbeit von de Roda Husman *et al.* (de Roda Husman *et al.*, 1995) verwendet. Neben dem Vorhandensein viraler DNA wurde durch Frau Dr. A. Arenz in unserem Labor auch die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 mittels real-time qPCR bestätigt. Es zeigte sich bei allen Zelllinien ein mit der Literatur übereinstimmendes Ergebnis. So konnte sowohl in der PCR die virale DNA nachgewiesen (Mayer, 2014), als auch in der real-time qPCR die aktive Expression der mRNA der viralen Onkogene bestätigt werden (Arenz *et al.*, 2014).

3.2 Wachstumsverhalten HPV+ und HPV- Tumorzelllinien

Grundlegend für weiterführende Experimente wurden initial die Wachstumscharakteristika der einzelnen Zelllinien bestimmt. Bereits in Vorversuchen wurde durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Engenhardt-Cabillic das für die Tumorzellen geeignete Zellkulturmedium inklusive Zusatzstoffen evaluiert. Anschließend wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der HNSCC Zelllinien in diesem Medium mittels Wachstumskurven ermittelt (Abbildung 2; A1). Diese Experimente wurden gemeinsam mit Frau Mayer und Frau Roth aus dem Kooperationslabor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Justus Liebig Universität, Gießen erhoben.

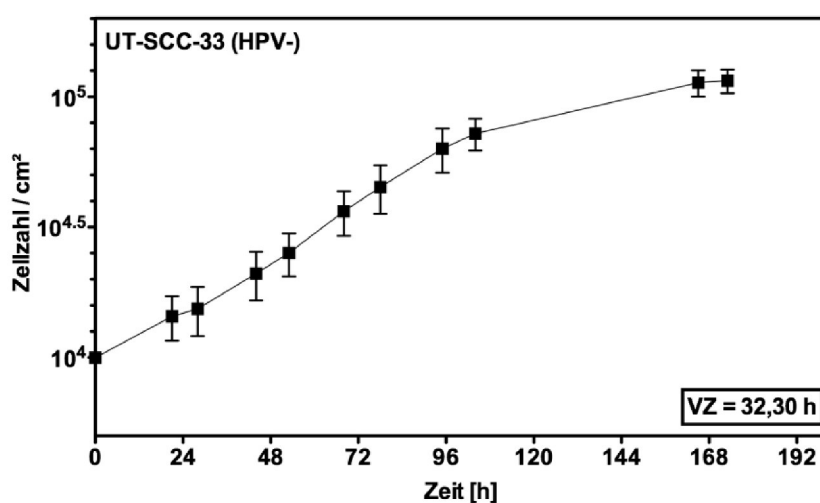


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer Wachstumskurve der HPV- Zelllinie UT-SCC-33 über einen Zeitraum von 0-172 h. Die Berechnung der Verdoppelungszeit (VZ) erfolgte durch Ermittlung der Steigung (k) innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase nach folgender Formel: $VZ = \ln(2)/k$.

Die Verdopplungszeit der Zelllinien wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden der exponentiellen Wachstumsphase für jede Zelllinie separat berechnet. Insgesamt zeigte sich für alle Zelllinien ein charakteristischer sigmoidaler Verlauf der Wachstumskurve mit anfänglicher Latenzphase nach Aussaat, exponentieller Phase und anschließendem Plateau nach spätestens 168 h. Die Verdopplungszeiten für alle acht Zelllinien sind in Tabelle 11 angegeben. Eine beispielhafte Wachstumskurve einer HNSCC Zelllinie findet sich in Abbildung 2. Die grafischen Auswertungen der weiteren Zelllinien finden sich in Anhang B Abbildung A1.

Tabelle 11: Verdopplungszeit der HNSCC Zelllinien in Stunden bei einer Aussaatdichte von 1×10^4 Zellen / cm^2 .

HPV- Zelllinien	Verdopplungszeit in [h]
UD-SCC-1	17,69
UM-SCC-11b	20,60
UT-SCC-33	32,30
UM-SCC-6	33,91
HPV+ Zelllinien	Verdopplungszeit in [h]
UM-SCC-47	24,06
UM-SCC-104*	35,92
UPCI:SCC-152	36,27
93-VU-147T	42,55

* Für diese Zelllinie erfolgte die Aussaat mit 2×10^4 Zellen / cm^2 .

3.3 Einfluss von Cisplatin auf die Zellviabilität

Die Zellviabilität der HPV+ und HPV- Zelllinien nach Cisplatininkubation wurde zur Dosisfindung für weiterführende Experimente, wie den Koloniebildungstest und die Zellzyklusanalysen gemessen. Die Zellviabilität wurde mittels NADPH abhängiger Umwandlung von Tetrazolin zu Formazan photometrisch analysiert. Hierzu wurden die Zellen 24 h nach Aussaat mit ansteigenden Cisplatinkonzentrationen (0 - 40 μ M) für 24 h inkubiert. Es zeigt sich, dass die HPV+ Zelllinien nach Cisplatininkubation eine wesentlich geringere Zellviabilität aufwiesen, als HPV- Zellen. Innerhalb beider Gruppen finden sich jedoch Zelllinien, die sensitiver bzw. resistenter gegenüber Cisplatin sind, sodass sich die Gruppen zum Teil überlagern (Abbildung 3A). Dies zeigte sich auch bei Analyse der Cisplatinkonzentration, bei der die Viabilität der Zellen um 50 % vermindert ist (Inhibitorische Konzentration 50%, IC-50_{WST}). Diese liegt für alle Zelllinien in einem Bereich zwischen 10,17 bis 38,47 μ M (Abbildung 3B).

Die Auswertung der nach HPV-Status gruppierten Mittelwerte der $IC_{50_{WST}}$ zeigt eine höhere Sensitivität der Gruppe der HPV+ Zelllinien gegenüber Cisplatin im Vergleich zu der Gruppe der HPV- Zelllinien ($IC_{50_{WST}}$: $13,72 \pm 2,68 \mu M$ vs. $25,35 \pm 5,09 \mu M$; $p = 0,09$ für HPV+ vs. HPV-; Abbildung 3B).

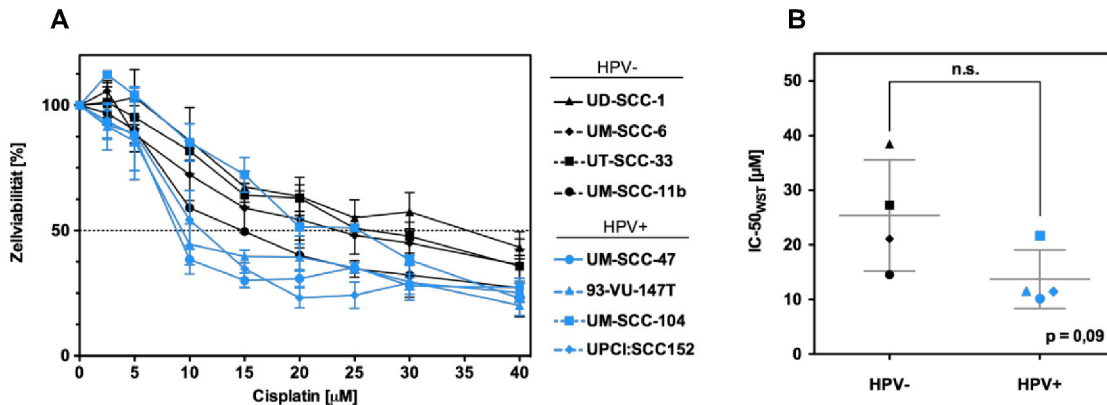


Abbildung 3: (A) Zellviabilität der HNSCC-Zelllinien nach 24 h Inkubation mit Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen (2,5 – 40 μM). (B) Nach HPV-Status gruppierte Darstellung derjenigen Cisplatinkonzentration, die zu einer 50 %igen Reduktion der Zellviabilität im WST-Test führt ($IC_{50_{WST}}$); $p = 0,09$. HPV- (schwarz) und HPV+ (blau).

3.4 Koloniebildungstest

3.4.1 Klonogenes Überleben nach Inkubation mit Cisplatin

Zur Untersuchung der Wirkung von Cisplatin auf die Überlebensfähigkeit der HNSCC Zelllinien wurde die Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinien nach 24 h Inkubation mit steigenden Cisplatinkonzentrationen (0 - 5 μM) ermittelt. Lediglich in zwei HPV- (UD-SCC-1, UT-SCC-33) und einer HPV+ (UM-SCC-47) Zelllinie war bei einer Dosis von 5 μM Cisplatin noch ein Wachstum von Kolonien nachweisbar (Abbildung 4A). Generell zeigt sich, dass die HPV+ Zelllinien auch im Koloniebildungstest deutlich sensitiver auf die Cisplatininkubation reagieren. Zusätzlich zur Cisplatinkonzentration bei der die Überlebensfraktion um 50 % vermindert ist ($IC_{50_{CFA}}$), wurde die Überlebensfraktion bei einer Dosis von 1 μM Cisplatin (SF1, survival fraction nach 1 μM) ermittelt und zu einer nach HPV-Status gruppierten Auswertungen herangezogen. Es zeigt sich, dass die HPV+ Zelllinien signifikant sensitiver gegenüber einer Cisplatininkubation sind, als die HPV- Zelllinien ($IC_{50_{CFA}}$: $0,13 \pm 0,03 \mu M$ vs. $0,35 \pm 0,03 \mu M$; $p = 0,003$; SF1: $0,006 \pm 0,003$ vs. $0,15 \pm 0,04$; $p = 0,009$ für HPV+ vs. HPV-; Abbildung 4B/C).

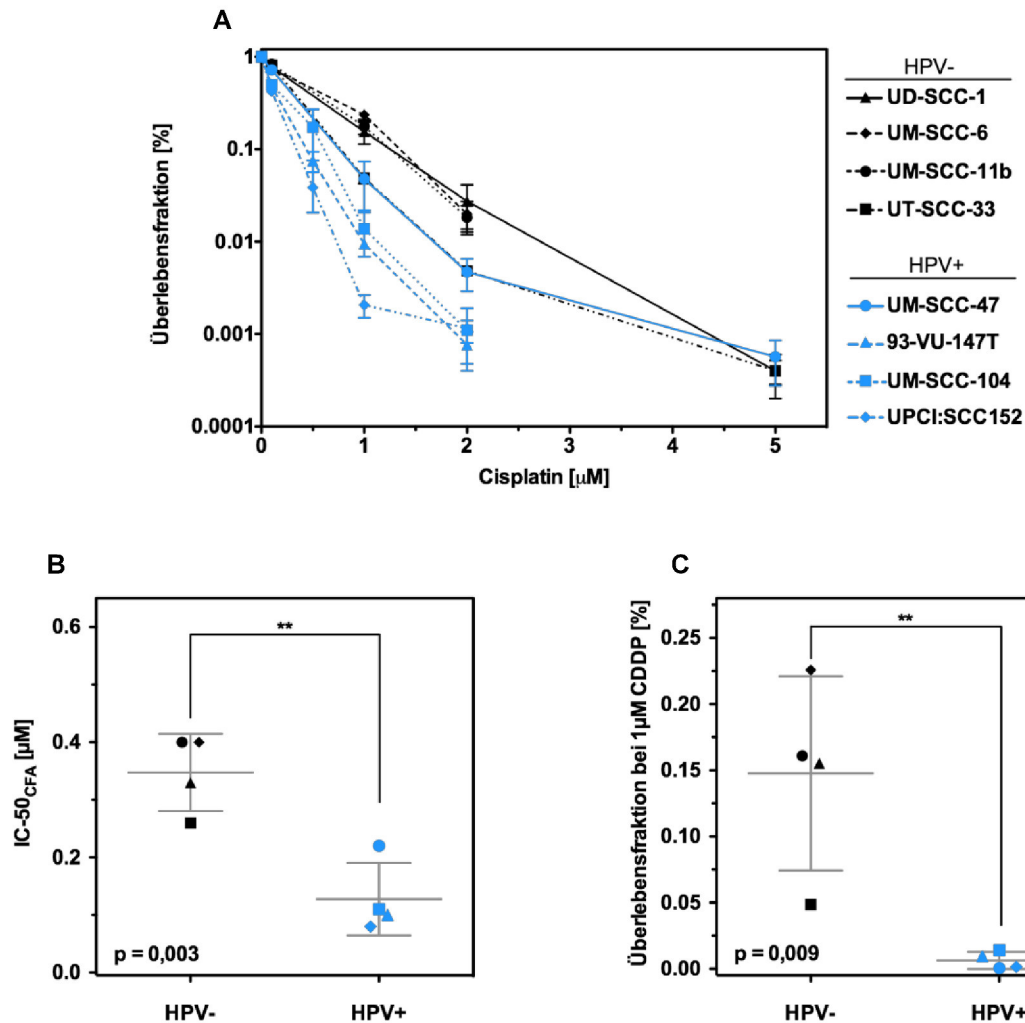


Abbildung 4: (A) Klonogenes Überleben von HPV- und HPV+ Zelllinien nach Inkubation mit Cisplatin (0,1 - 5 μM) für 24 h. (B/C) Nach HPV-Status gruppierte Auswertung der Cisplatinkonzentration, durch die das klonogene Überleben um 50 % reduziert wird (IC-50_{CFA}; p= 0,003; B), sowie der Überlebensfraktion bei einer Cisplatinkonzentration von 1 μM (p= 0,009; C). HPV- (schwarz) und HPV+ (blau); (Teile veröffentlicht in Ziemann et al., 2015).

3.4.2 Koloniebildungsfähigkeit nach Photonenbestrahlung

Im folgenden Versuch wurde die Koloniebildungsfähigkeit nach alleiniger Bestrahlung (1 - 10 Gy) untersucht. Sowohl HPV+ als auch HPV- Zelllinien waren sensitiv gegenüber der alleinigen Photonenbestrahlung, sodass bei einer Dosis von 10 Gy in keiner der acht Zelllinien eine Koloniebildung festgestellt werden konnte. Die Gruppe der HPV+ Zelllinien ist im Vergleich zu der Gruppe der HPV- Zelllinien sensitiver gegenüber einer einmaligen Photonenbestrahlung. So konnte bei einer HPV+ Zelllinie (UM-SCC-47) bereits bei einer Dosis von 8 Gy kein klonogenes Überleben mehr detektiert werden (Abbildung 5A). Die höhere Strahlensensibilität der HPV+ Zelllinien zeigte sich auch in den Gruppenauswertungen. So fand sich für die Gruppe der HPV+ Zelllinien eine signifikant geringere Überlebensfraktion bei 2 Gy (SF2, survival fraction at 2 Gy) (SF2: $0,20 \pm 0,008$ vs. $0,34 \pm 0,04$; p= 0,01 für HPV+ vs. HPV-; Abbildung 5B).

Die Dosis, bei der die Überlebensfraktion 10 % betrug (D10), war in der Gruppe der HPV+ Zelllinien geringer als in der Gruppe der HPV- Linien (D10; $2,86 \pm 0,13$ Gy vs. $3,34 \pm 0,24$ Gy; $p = 0,13$ für HPV+ vs. HPV-; Abbildung 5C).

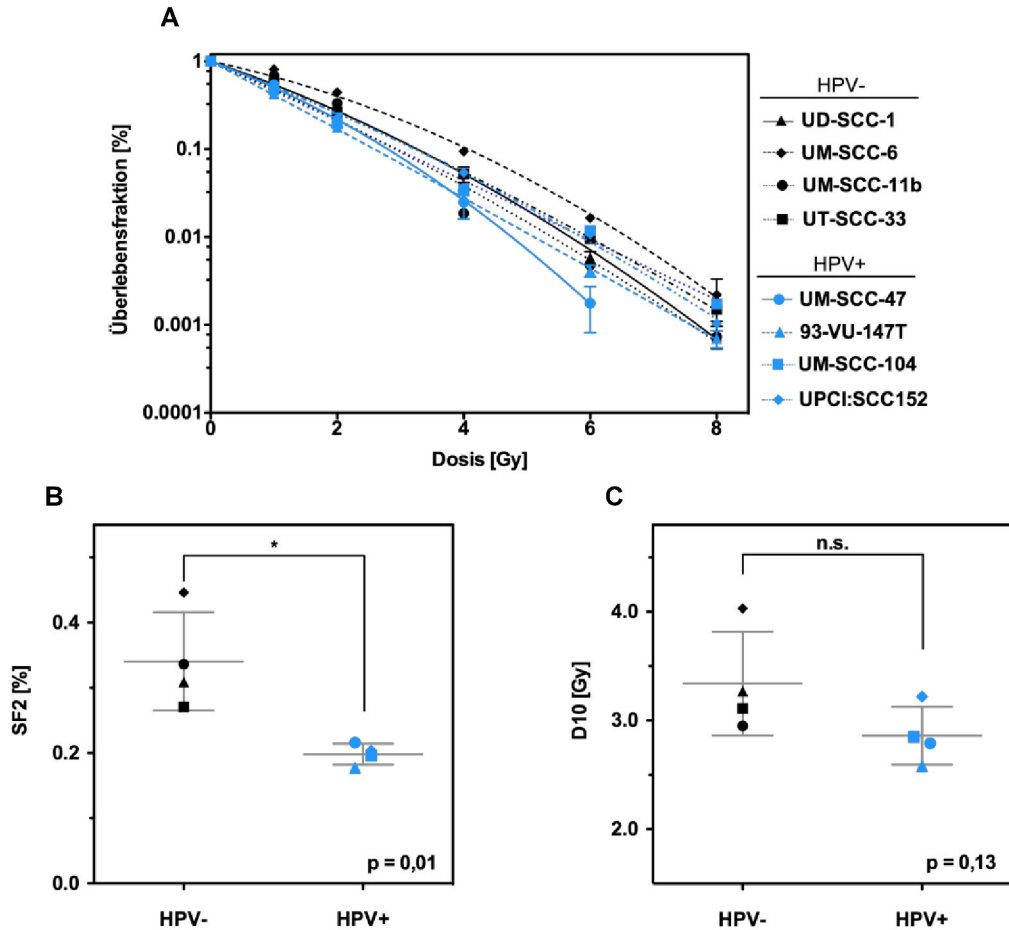
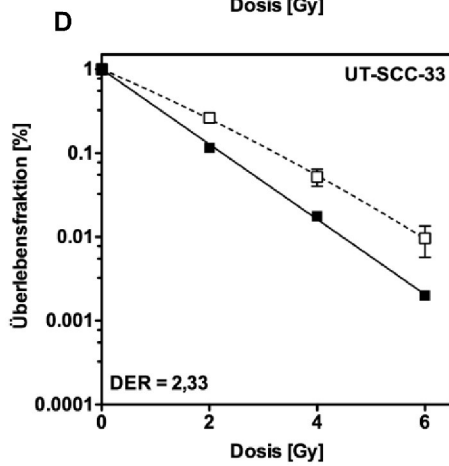
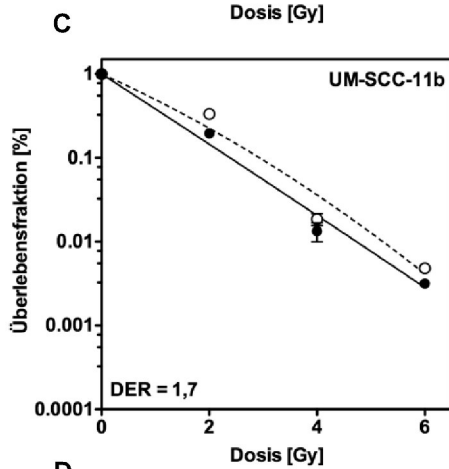
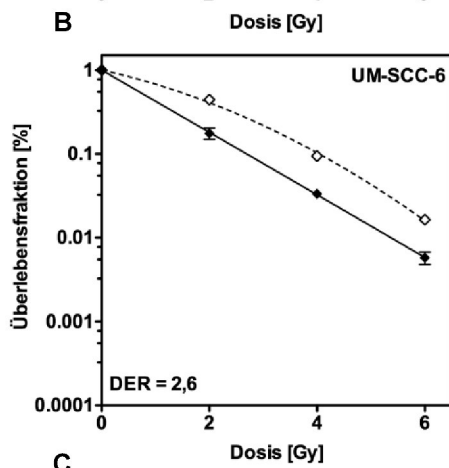
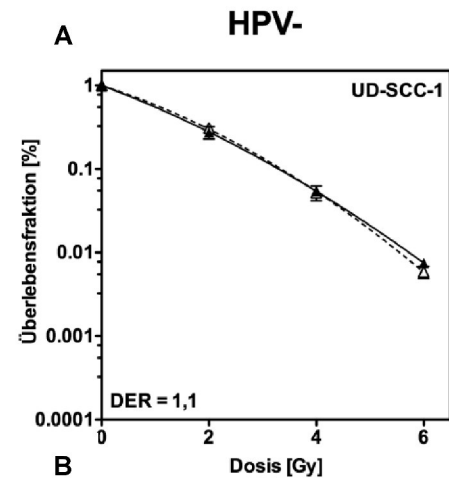


Abbildung 5: (A) Klonogenes Überleben von HNSCC-Zelllinien nach Bestrahlung mit steigenden Dosen (0 - 8 Gy). (B/C) Nach HPV-Status gruppierte Auswertung der Überlebensfraktion bei einer absorbierten Dosis von 2 Gy (SF2; $p = 0,01$; B) bzw. Bestrahlungsdosis, bei der die Überlebensfraktion 10 % betrug (D10; $p = 0,13$; C). HPV- (schwarz) und HPV+ (blau); (Teile veröffentlicht in Arenz et al., 2014).

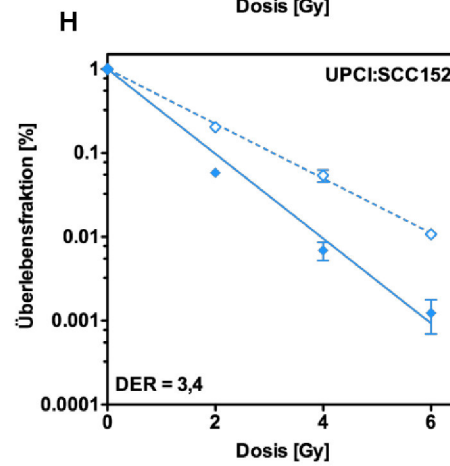
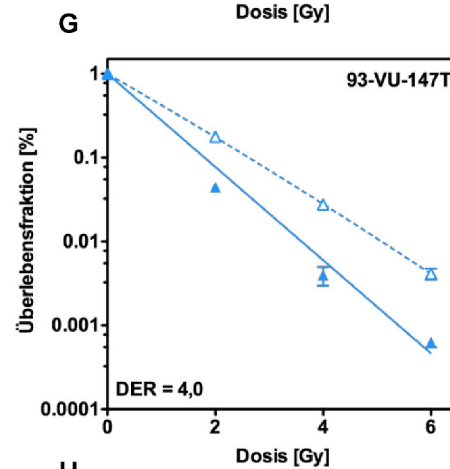
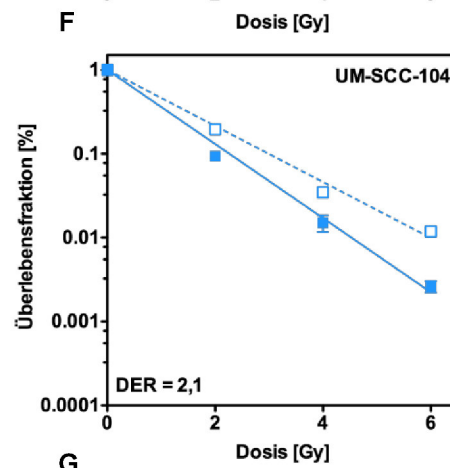
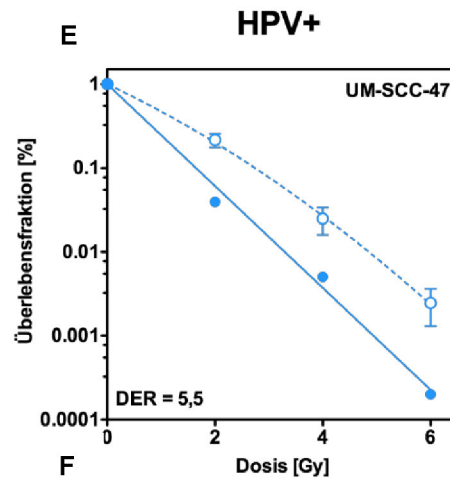
3.4.3 Klonogenes Überleben nach Kombination von Bestrahlung und Cisplatininkubation

Die Überlebensfraktion von HNSCC Zelllinien wurde nach Photonenbestrahlung in steigender Dosis (2 - 6 Gy) und konstanter Cisplatinkonzentration (0,5 μ M, für 24 h) untersucht. Es zeigte sich, dass bis auf die HPV- Zelllinie UD-SCC-1 alle Zelllinien unabhängig vom HPV-Status durch die Cisplatininkubation in Kombination mit der Photonenbestrahlung ein geringeres klonogenes Überleben aufwiesen, als nach alleiniger Bestrahlung (Abbildung 6A-H). Wie schon bei den Monobehandlungen fanden sich teilweise überlappende Werte für die Gruppe der HPV+ und HPV- Zelllinien.

Die zusätzliche Cisplatininkubation verringerte das klonogene Überleben in der Gruppe der HPV+ Zelllinien wesentlich stärker, als in der Gruppe der HPV- Zelllinien. Dies zeigt sich bei Analyse der Überlebensfraktionen nach alleiniger Bestrahlung in Verhältnis zur Überlebensfraktion bei gleicher Strahlendosis nach der Kombinationstherapie (dose enhancement ratio, *DER*). Bei einer Dosis von 2 Gy betrug der geringste *DER*-Wert für HPV+ Zelllinien 2,1 (UM-SCC-104; Abbildung 6F), für HPV- Zelllinien 1,1 (UD-SCC-1; Abbildung 6A). Der höchste *DER*-Wert einer HPV+ Zelllinie betrug 5,5 (UM-SCC-47; Abbildung 6E), einer HPV- Zelllinien 2,6 (UM-SCC-6, Abbildung 6B). Der SF2 Wert war in der Gruppen der HPV+ signifikant geringer als in der Gruppe der HPV- Zelllinien (SF2: $0,06 \pm 0,01$ vs. $0,19 \pm 0,03$; $p= 0,01$ für HPV+ vs. HPV-; Abbildung 7A). Der D10-Wert nach Kombinationsbehandlung war in der Gruppe der HPV+ Zelllinien signifikant geringerer (D10: $1,92 \pm 0,13$ Gy vs. $2,65 \pm 0,23$ Gy; $p= 0,03$ für HPV+ vs. HPV-; Abbildung 7B). Wie schon bei Auswertung der einzelnen Zelllinien fand sich ein deutlich höherer mittlerer *DER*-Wert bei 2 Gy (*DER*₂: $3,75 \pm 0,7$ vs. $1,81 \pm 0,8$; $p= 0,06$ für HPV+ vs. HPV-; Abbildung 7C). Bei höheren Dosen nahm der Unterschied in der *DER* zwischen HPV+ und HPV- Tumorzelllinien noch weiter zu, sodass sich nach einer Dosis von 4 und 6 Gy jeweils signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen fanden (Tabelle 13).



--- IR — IR + CDDP



--- IR — IR + CDDP

Abbildung 6: Klonogenes Überleben HPV- (A-D) und HPV+ (E-H) Zelllinien nach alleiniger Bestrahlung (0- 6 Gy; gestrichelte Linie) und nach Bestrahlung mit simultaner Cisplatininkubation (0,5 µM; durchgezogene Linie). Angegeben ist jeweils der Faktor, um den die Zelllinien durch die Cisplatininkubation (24 h) für eine Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy sensibilisiert wurden (dose enhancement ratio; DER); (Ziemann et al., 2015).

Tabelle 12: Cisplatininkubation bedingte Strahlensensibilisierung HPV+ und HPV- Zelllinien. Die dose enhancement ratio (DER) ist jeweils für die Gruppe der HPV+ und der HPV- Zelllinien angegeben.

Absorbierte Dosis [Gy]	DER der Gruppe der HPV+ Zelllinien	DER der Gruppe der HPV- Zelllinien	p-Wert
2	3,8 ± 0,7	1,9 ± 0,3	0,06
4	5,4 ± 1,2	2,1 ± 0,5	0,04
6	7,4 ± 1,2	2,6 ± 1,0	0,02

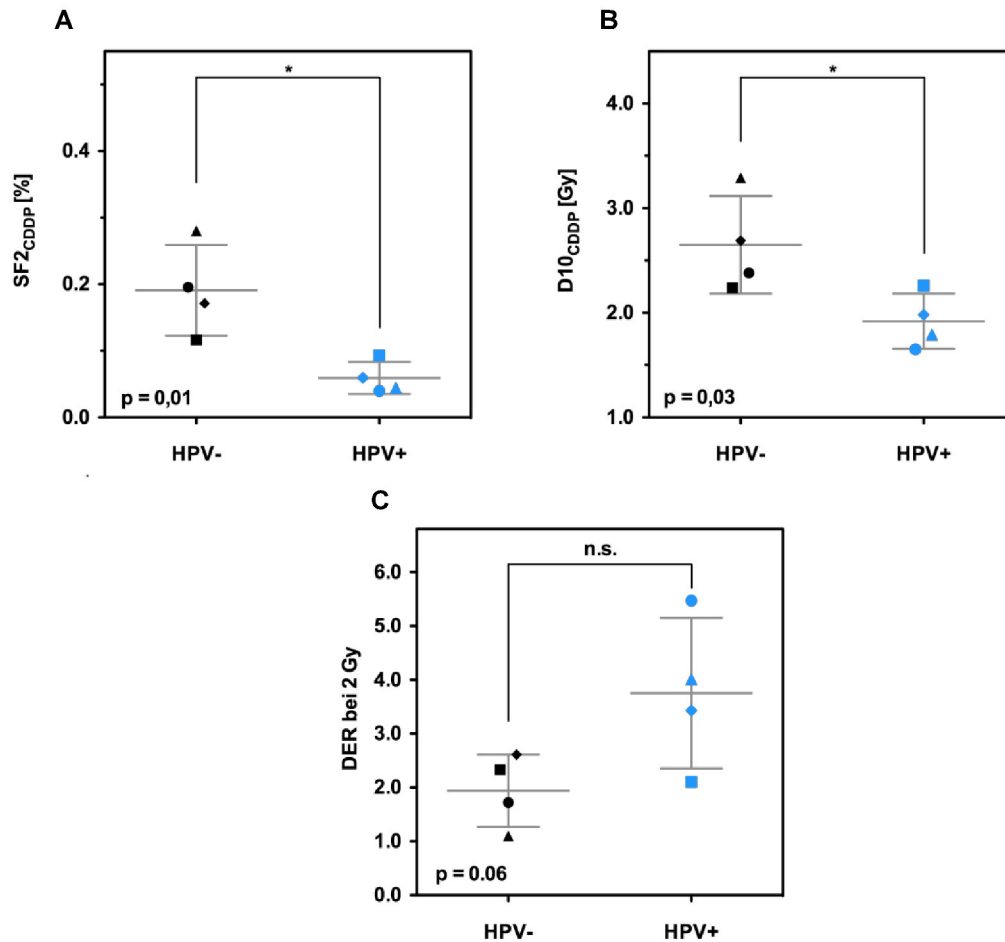


Abbildung 7: Auswertung der Kombinationsbehandlung aus Bestrahlung und Cisplatin (CDDP). (A) Überlebensfraktion HPV- (schwarz) und HPV+ (blau) Zelllinien bei einer Dosis von 2 Gy und Cisplatininkubation (0,5 μ M) (SF2_{CDDP}; $p = 0,01$). (B) Dosis, bei der die Überlebensfraktion 10 % betrug (D10_{CDDP}; $p = 0,03$). (C) Faktor, um den die Zelllinien durch Cisplatin gegenüber einer Bestrahlungsdosis mit 2 Gy sensibilisiert werden ($p = 0,06$); (Teile veröffentlicht in Ziemann et al., 2015).

3.5 Residuelle DNA-Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung und Cisplatininkubation

Die Untersuchung der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) 24 h nach Behandlung mit Cisplatin (0,5 μ M), Bestrahlung (2 Gy) oder einer Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung zeigte keine relevanten Unterschiede zwischen HPV+ und HPV- Zelllinien (Abbildung 8A/B). Nach alleiniger Cisplatininkubation fanden sich am wenigsten γ H2AX Foci pro Nucleus (MW Foci HPV+ 3,33 \pm 0,5; MW Foci HPV- 4,1 \pm 1,4). Die alleinige Bestrahlung führte zu einem leichten Anstieg an γ H2AX Foci sowohl in HPV+ als auch HPV- Zelllinien (MW Foci HPV+ 4,7 \pm 0,9; MW Foci HPV- 5,5 \pm 1,95). Am meisten residuelle DDBs fanden sich bei allen Zelllinien 24 h nach der Kombinationsbehandlung (MW Foci HPV+ 7,6 \pm 0,3; MW Foci HPV- 7,3 \pm 2,4).

Bei der Zweifache ANOVA Analyse der verschiedenen Behandlungsregime untereinander zeigte sich, dass die Kombinationsbehandlung bei HPV+ Zelllinien im Vergleich zur alleinigen Cisplatininkubation zu signifikant mehr residuellen Schäden führt ($p < 0,05$; Abbildung 8B).

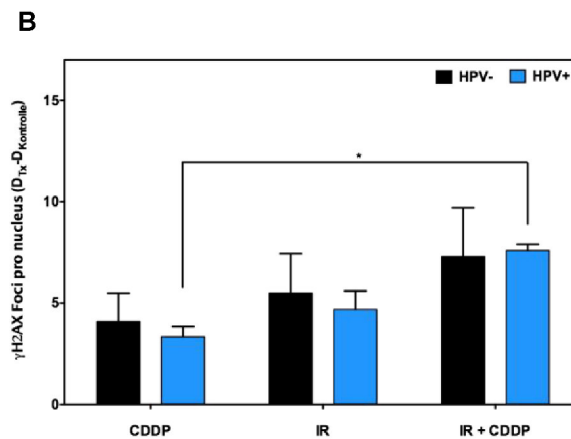
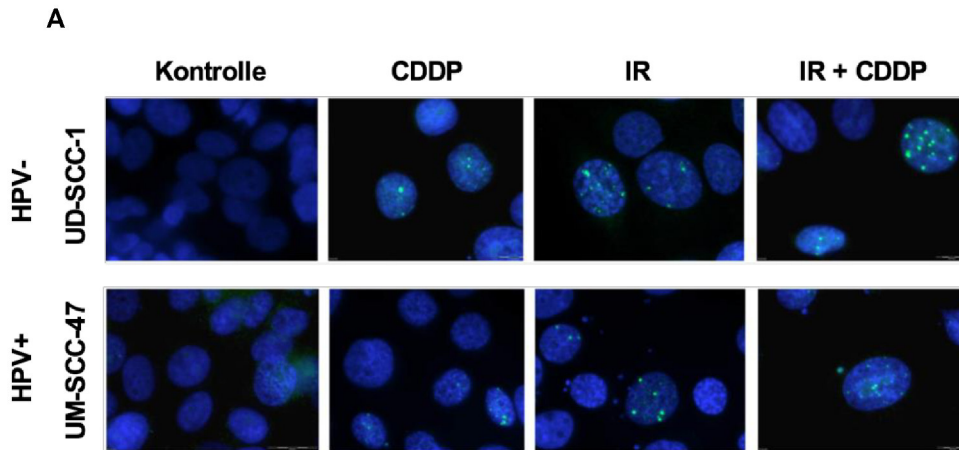


Abbildung 8: (A) Analyse residueller DNA-Doppelstrangbrüche mittels Färbung von γ H2AX Foci. Exemplarische Abbildung von γ H2AX Foci (grün) einer HPV- Zelllinie (UD-SCC-1, oberes Panel) und einer HPV+ Zelllinie (UM-SCC-47, unteres Panel). Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. Vergrößerung 100x. (B) gruppierte Auswertung von γ 2AX-Foci 24 h nach Cisplatininkubation (CDDP), Bestrahlung (IR) oder einer Kombination beider Behandlungen (IR+CDDP) in HPV- (schwarz) und HPV+ (blau) Zelllinien.

3.6 Zellzyklusprogression nach Cisplatininkubation und Photonenbestrahlung

Die Analyse der Verteilung der Zellen innerhalb der einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1, S und G2/M-Phase) wurde in zwei HPV- (UM-SCC-6, UM-SCC-11b) und zwei HPV+ (UM-SCC-47, 93-VU-147T) Zelllinien über eine Zeitkinetik bis 48 h nach der Behandlung durchgeführt (Abbildung 9).

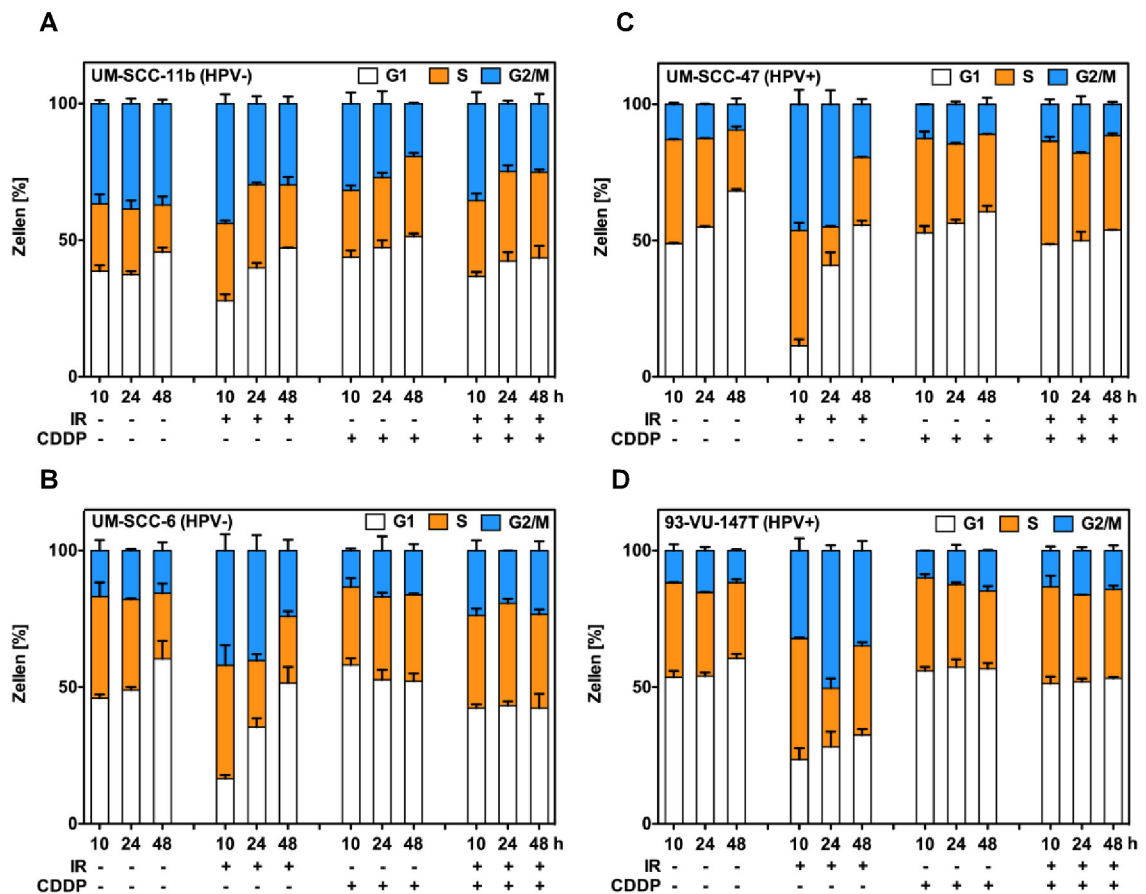


Abbildung 9: Verteilung von HPV- (A: UM-SCC-11b; B: UM-SCC-6) und HPV+ Zelllinien (C: UM-SCC-47; D: 93-VU-147T) innerhalb der einzelnen Zellzyklusphasen (G1-phase = weiß; S-phase = orange; G2/M-phase = blau). Dargestellt ist die Veränderung des Anteils der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen abhängig von Bestrahlung (IR; Mitte links), Cisplatin (CDDP; Mitte rechts) und der Kombination aus IR und Cisplatin (außen rechts), sowie die unbehandelte Kontrolle (außen links) in einer Zeitkinetik über 48 h; (Ziemann et al., 2015).

Eine Behandlung der Zelllinien mit Cisplatin (20 µM) bis 24 h führte in allen Zelllinien zu keiner Änderung der Zellzahl in den einzelnen Zellzyklusphasen in Relation zur unbehandelten Kontrolle. Nach 48 h konnte bei allen Zelllinien ein geringer S-Phase Arrest festgestellt werden (Abbildung 10A).

Die alleinige Bestrahlung der Zelllinien mit einer Dosis von 6 Gy führte nach 10 h in allen Zelllinien zu einer Verringerung des Zellanteils in der G1-Phase.

Im Gegensatz hierzu ließ sich zum gleichen Zeitpunkt ein Anstieg der relativen Zellzahl innerhalb der G2/M-Phase detektieren (Abbildung 10B). Sowohl die Verminderung der G1-Phase als auch der G2/M-Arrest waren in HPV+ Zelllinien deutlich stärker ausgeprägt (Zellen in der G2/M-Phase [D/D0] nach 24 h: $3,44 \pm 0,4$ vs. $1,51 \pm 0,9$; für HPV+ vs. HPV-; Abbildung 10B) als in HPV- Zelllinien. In HPV- Zelllinien zeigte sich bereits nach 10 h wieder ein Anstieg des G1-Phase Anteils und eine Abnahme der G2-M-Phase Fraktion. Nach 48 h wiesen HPV- Zelllinien eine Zellzyklusverteilung auf, die mit der Verteilung der unbehandelten Kontrolle vergleichbar war. Im Gegensatz hierzu hielt der G2/M-Arrest in HPV+ Zelllinien über den gesamten Untersuchungszeitraum an. Der Anteil der Zellen in der G1-Phase stieg zum Zeitpunkt 24 h wieder an, blieb aber über den gesamten Zeitraum geringer als in der unbehandelten Vergleichsgruppe.

Die Analyse des Anteils der Zellen in der S-Phase zeigte nur bei HPV+ Zelllinien zum Zeitpunkt 24 h eine Abnahme der S-Phase Fraktion (Abbildung 10B). In der nach HPV-Status gruppierten Auswertung zeigt sich, dass der G2/M-Arrest in HPV+ Zelllinien während der gesamten Untersuchung signifikant stärker ausgeprägt war, als in HPV- Zelllinien ($p < 0,05$ nach 10 h und 48 h; $p < 0,001$ bei 24 h; Abbildung 10B).

Die Kombinationsbehandlung aus Cisplatin ($20 \mu\text{M}$) und Radiatio (6 Gy) führte im Vergleich zu den Einzelbehandlungen zu einer Zunahme des S-Phase Arrests in HPV+ und HPV- Zelllinien (Zellen in der S-Phase [D/D0] nach 48 h: $1,4 \pm 0,2$ für HPV+, $1,7 \pm 0,4$ für HPV-; Abbildung 10C). Im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zeigte sich nur bei HPV+ Zelllinien ein Arrest in der G2/M-Phase. Dieser war deutlich geringer ausgeprägt und trat erst zu späteren Zeitpunkten auf, als bei alleiniger Bestrahlung (Abbildung 10C). In der gruppierten Auswertung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen HPV+ und HPV- Zelllinien.

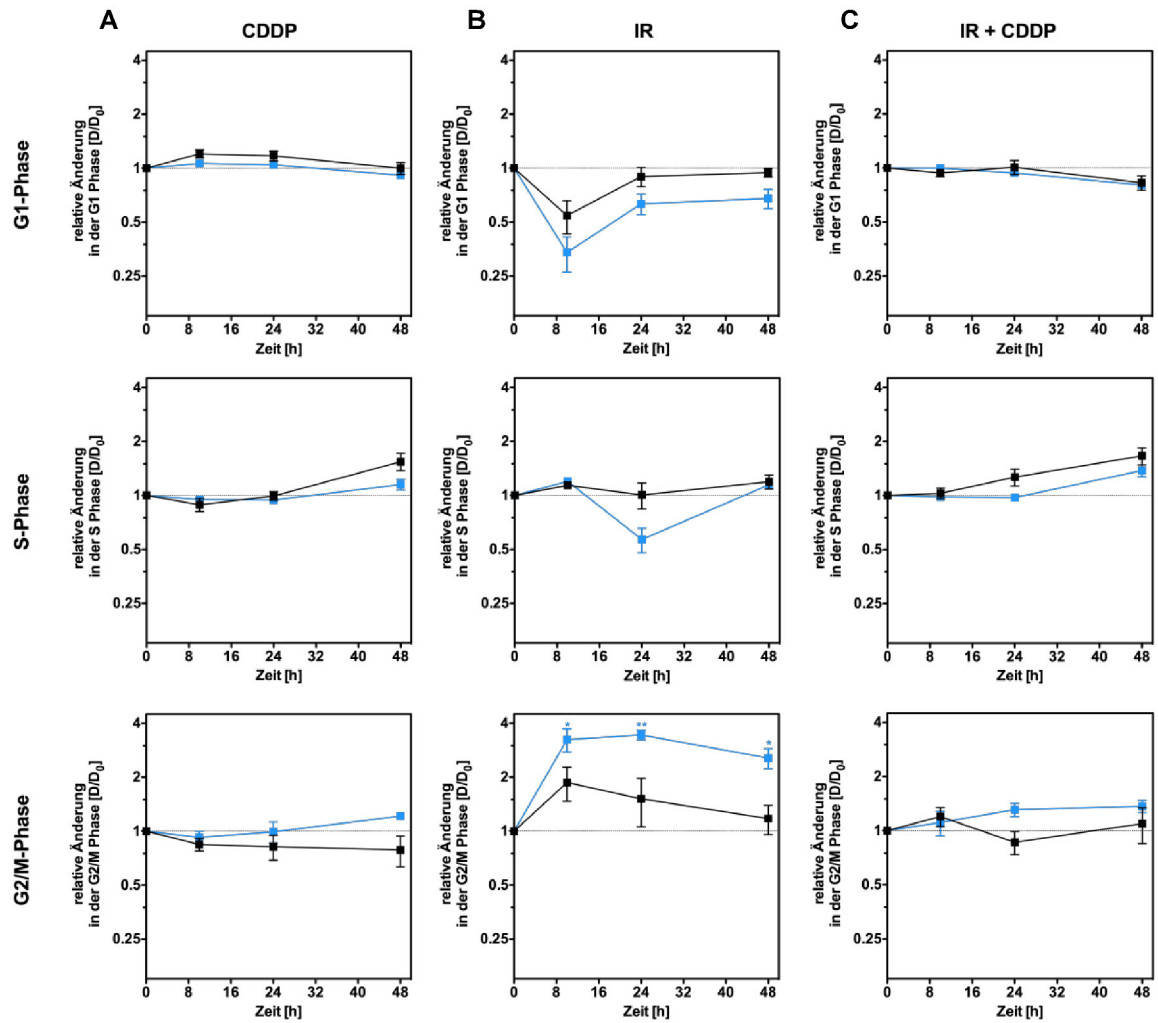


Abbildung 10: (A-C) Auswertung der relativen Änderung Verteilung HPV- (schwarz) und HPV+ (blau) Zelllinien innerhalb der einzelnen Zellzyklusphasen (G1: oben; S: Mitte; G2/M: unten) über ein Zeitintervall von 48 h. Gezeigt ist die relative Änderung nach Cisplatininkubation (A), Bestrahlung (B) und der Kombination aus Bestrahlung und Cisplatininkubation (C). Die relative Änderung ist hierbei auf einer logarithmischen Skala zur Basis 2 nach Hosseinpoor et al. (Hosseinpoor und Abouzahr, 2010) aufgetragen; (Ziemann et al., 2015).

3.7 Expressionsänderung der zellzyklusregulierenden Proteine nach Bestrahlung und Cisplatininkubation

Die Analyse der Proteinexpression der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin A2 und E2 erfolgte in zwei HPV- (UM-SCC-6, UM-SCC-11b) und zwei HPV+ (UM-SCC-47, 93-VU147T) HNSCC Zelllinien in einem Zeitintervall 6 – 24 h nach Behandlung (Abbildung 11A).

3.7.1 Expressionsänderung des Proteins Cyclin A2 nach Bestrahlung und Cisplatin

In HPV+ und HPV- Zelllinien führte die alleinige Behandlung mit Cisplatin (20 μ M) zu keiner signifikanten Änderung der Cyclin A2 Proteinexpression innerhalb des Analysezeitraums (Abbildung 11A/B/D).

Die alleinige Photonenbestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 6 Gy führte in HPV+ Zelllinien zu einem kontinuierlichen Anstieg der Cyclin A2 Expression. Nach 6 h war die Cyclin A2 Expression in den bestrahlten Zelllinien signifikant erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). Innerhalb des Untersuchungszeitraumes stieg Cyclin A2 weiter an und war nach 12 h und 24 h ebenfalls signifikant stärker exprimiert als in der unbehandelten Probe ($p < 0,001$; Abbildung 11A/D). In HPV- Zelllinien fand sich ebenfalls eine Zunahme der Cyclin A2 Expression. Der Proteinlevel stieg bis 12 h nach Bestrahlung auf eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant höhere Expression und blieb dann bis 24 h auf einem Plateau ($p < 0,05$; Abbildung 11A/B). In der nach HPV-Status gruppierten Analyse zeigt sich, dass zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung HPV+ Zelllinien eine signifikant höhere Cyclin A2 Expression aufweisen als HPV- Zelllinien ($p < 0,05$).

Bei der Kombination aus Cisplatin (20 μ M) und Bestrahlung (6 Gy) fanden sich bei HPV+ und HPV- Zelllinien Expressionsänderungen für Cyclin A2, die zwischen den Expressionsänderungen der alleinigen Bestrahlung und der alleinigen Cisplatininkubation lagen. Insgesamt zeigte sich trotz der leicht höheren Expression jedoch bei allen Zelllinien kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle und innerhalb der nach HPV-Status gruppierten Zelllinien (Abbildung 11A/B/D).

3.7.2 Expressionsänderung des Proteins Cyclin E2 nach Bestrahlung und Cisplatin

Die Inkubation mit Cisplatin (20 μ M) alleine führte in HPV+ und HPV- Zelllinien zu einer Zunahme der Expression von Cyclin E2 mit einem signifikanten Peak 12 h nach Cisplatininkubation, gefolgt von einer leichten Abnahme zu späteren Analysezeitpunkten. In HPV+ Zelllinien wurde Cyclin E2 signifikant höher exprimiert als in der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$ für 6 h bzw. 12 h; Abbildung 11A/E).

In HPV- Zelllinien zeigte sich zum Zeitpunkt 12 h eine signifikant höhere Expression im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$; Abbildung 11A/C).

Durch Bestrahlung der Zelllinien mit 6 Gy konnte keine signifikante Änderung der Cyclin E2 Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erzielt werden. In HPV+ Zelllinien zeigte sich 6 h nach Radiatio eine leichte Zunahme gefolgt von einer stetigen Abnahme bis hin zu einer etwas verminderten Expression 24 h nach Bestrahlung (Abbildung 11A/C/E).

Eine Kombination aus Cisplatininkubation und Bestrahlung führte zu einer Zunahme der Cyclin E2 Expression, die in HPV+ Zelllinien mit den Werten der alleinigen Cisplatininkubation vergleichbar und in HPV- Zelllinien etwas geringer ausgeprägt war (Abbildung 11A/C/E). Eine signifikant stärkere Expression von Cyclin E2 konnte bei der Kombinationsbehandlung nur in HPV+ Zelllinien zum Analysezeitpunkt 12 h festgestellt werden ($p < 0,001$; Abbildung 11E).

Die gruppierte Analyse der Zelllinien anhand des HPV-Status zeigte innerhalb des Untersuchungszeitraumes keine signifikanten Unterschiede zwischen HPV+ und HPV- HNSCC Zelllinien unabhängig vom Behandlungsregime.

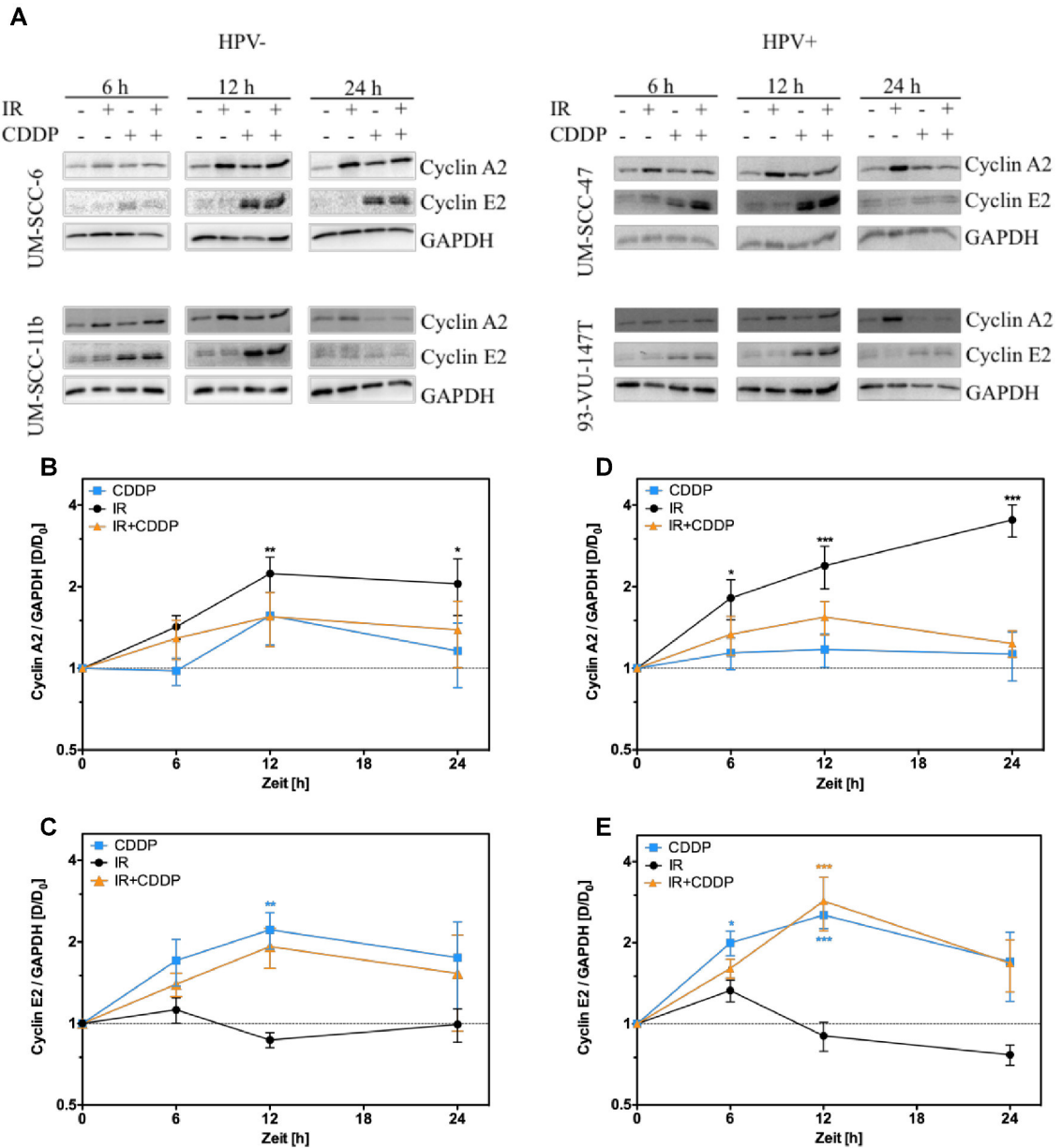


Abbildung 11: (A) Exemplarische Darstellung der Änderung der Proteinexpression von Cyclin A2 und Cyclin E2 in HPV- (links) und HPV+ (rechts) Zelllinien über eine Zeitkinetik von 6 - 24 h nach Behandlung mit IR, Cisplatin (CDDP) oder IR + Cisplatin. (B-E) Dotplot Auswertung der Änderung der Proteinexpression von Cyclin A2 (B,D) und Cyclin E2 (C,E) in HPV- (B,C) und HPV+ (D,E) Zelllinien. Die Proteinexpression wurde zunächst auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert und anschließend die relative Änderung zur unbehandelten Kontrolle (D/D₀) berechnet. Die relative Änderung ist hierbei auf einer logarithmischen Skala zur Basis 2 aufgetragen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; (Ziemann et al., 2015).

3.8 Expressionsänderungen der HPV-Proteine und des p53 Proteins nach Bestrahlung und Cisplatin

Die Expression der HPV Onkoproteine E6 und E7 vom HPV Typ 16 sowie des Tumorsuppressors p53 wurden in zwei HPV+ Zelllinien (UM-SCC-47, 93-V-147T) im Zeitraum 6 – 24 h nach Behandlung untersucht. Die Expression von p53 wurde zusätzlich in HPV-Zelllinien (UM-SCC-6, UM-SCC-11b) innerhalb des gleichen Zeitintervalls analysiert (Abbildung 12A).

Bislang gibt es nur wenige kommerziell erhältliche Antikörper gegen die viralen Proteine E6 und E7 die spezifisch für diese Proteine vom HPV Typ 16 gerichtet sind. Die meisten erhältlichen Antikörper erkennen vorwiegend die Proteine E6 und E7 vom HPV Typ 18 (persönliche Kommunikation mit K. Munger). Deswegen wurden nach Rücksprache mit K. Munger die verwendeten Antikörper verwendet und vorab die Spezifität der Antikörper verifiziert (Abbildung 12). In HPV- HNSCC Zelllinien fand sich keine Bande für die Proteine E6 und E7. Ebenso zeigte sich in der HPV Typ 18 positiven Zervixkarzinomzelllinie HeLa-S3 kein Signal für beide Proteine. Im Gegenzug, zeigte sich sowohl bei HPV Typ 16 positive HNSCC Zelllinien und bei Zervixkarzinomzelllinien (SiHa und CaSki) eine Bande für die Proteine E6 und E7. Somit konnte von einer guten Spezifität der verwendeten Antikörper für die Proteine E6 und E7 vom HPV Typ 16 ausgegangen werden (Abbildung 12).

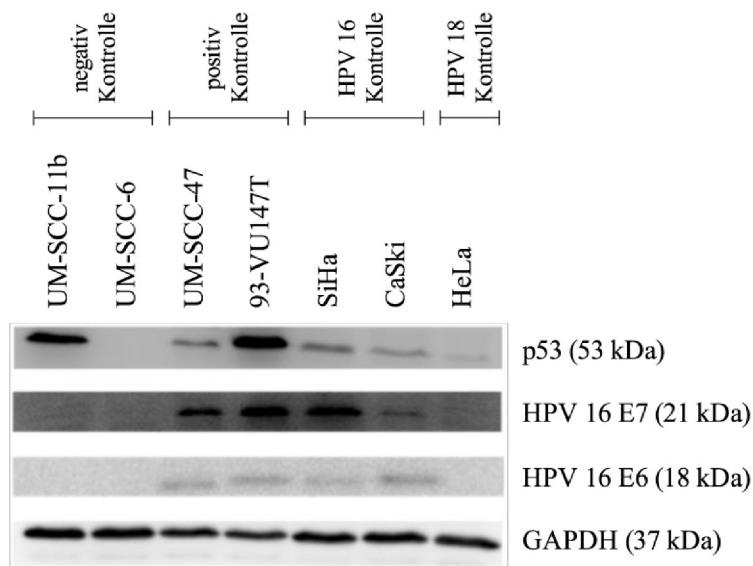


Abbildung 12: Verifizierung der Spezifität der Anti-HPV 16 E6 und E7 Antikörper für HPV-Subtyp 16 in HPV- (UM-SCC-11b, UM-SCC-6) Zelllinien, HPV-Typ 16 positiven HNSCC Zelllinien (UM-SCC-47, 93-VU-147T), sowie in zwei HPV-Typ 16 positiven Zervixkarzinomzelllinien (SiHa, CaSki) und einer HPV-Typ 18 positiven Zervixkarzinomzelllinie (HeLa-S3). Zusätzlich dargestellt ist die Expression des Tumorsuppressorproteins p53 (Ziemann et al., 2015).

3.8.1 Expressionsänderung der Proteine E6 und E7 nach Cisplatin und Bestrahlung

Durch die alleinige Inkubation mit Cisplatin (20 μ M) kam es zu einer über die Untersuchungszeit leicht abnehmenden Expression des HPV E6 Proteins (Abbildung 13A). Die Bestrahlung mit einer Dosis von 6 Gy führte im Gegensatz hierzu ab 12 h nach Bestrahlung zu einer Zunahme der Expression bis zu einer statistisch signifikanten Hochregulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 24 h ($p < 0,05$; Abbildung 13A,D). Die kombinierte Applikation von Cisplatin und Bestrahlung führte zu einer stärkeren Herabregulation von E6 als die alleinige Cisplatininkubation. Die Expression sank über den Untersuchungszeitraum und war zum Zeitpunkt 24 h signifikant vermindert gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$; Abbildung 13D).

Die Expressionsanalyse des HPV Proteins E7 zeigte eine durch Cisplatininkubation stark verminderte Expression zu allen Analysezeitpunkten (Abbildung 13A). Nach einer kontinuierlichen Abnahme bis 12 h nach Bestrahlung stellte sich bis 24 h ein Plateau ein und es kam zu keiner weiteren Abnahme von E7. Zu allen Untersuchungszeitpunkten war die Herabregulation des Proteins E7 im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p < 0,001$; Abbildung 13E). Im Gegensatz hierzu führte die alleinige Bestrahlung zu einer verstärkten Expression des HPV E7 Proteins. Nach Kombinationsbehandlung zeigten sich signifikant verminderte Expressionswerte ähnlich denen der alleinigen Inkubation mit Cisplatin ($p < 0,001$; Abbildung 13E).

3.8.2 Expressionsänderung des endogenen p53 Proteins nach Cisplatin und Bestrahlung

Bei der Untersuchung der Expression des endogenen p53 Tumorsuppressorproteins zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen bei HPV+ Zelllinien. Bei der Auswertung der Gruppe der HPV+ und HPV- Zelllinien führten weder Cisplatin, noch Bestrahlung oder die Kombination aus beidem zu einer Induktion der Expression von p53 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 13A-C). Bei allen Behandlungsregimen kam es in der gruppierten Auswertung zu keiner Änderung der Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 13B/C).

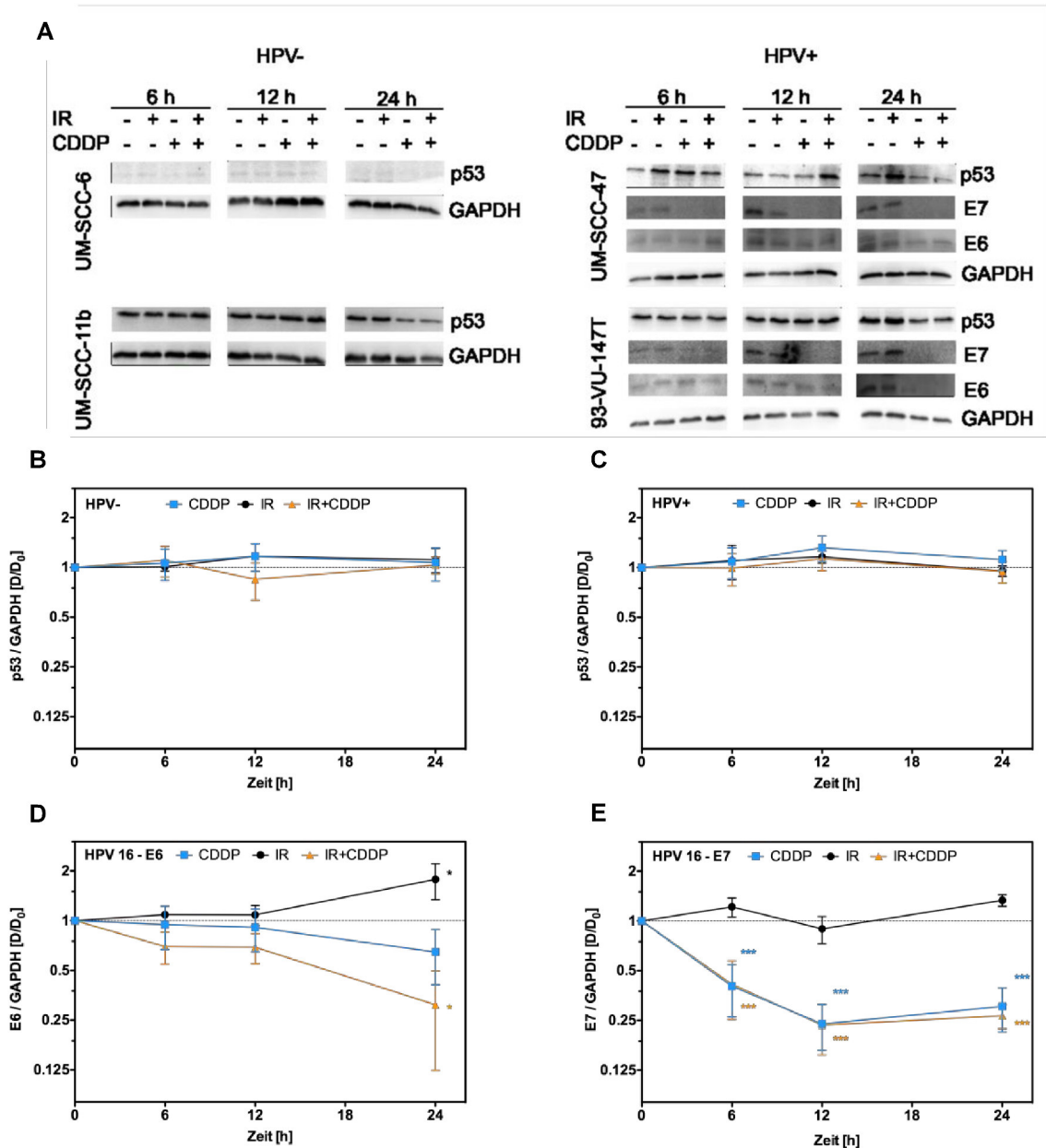


Abbildung 13: (A) Exemplarische Darstellung der Änderung der Proteinexpression von p53, E6 und E7 in zwei HPV- (linke Hälfte) und zwei HPV+ (rechte Hälfte) Zelllinien. Die Proteinexpression wurde zu den Zeitpunkten 6 – 24 h nach IR, Cisplatin (CDDP) oder IR + Cisplatin analysiert. (B,C) Dotplot Auswertung der p53 Expression in HPV- (B) und HPV+ (C) Zelllinien. (D, E) Dotplot Auswertung der E6 (D) und E7 (E) Expression in HPV+ Zelllinien. Die Werte wurden jeweils auf die GAPDH als Ladekontrolle normalisiert und die Änderung relativ zur unbehandelten Kontrolle (D/D₀) auf einer zur Basis 2 logarithmierten Skala dargestellt. Behandlung mit IR (schwarz), Cisplatin (blau), IR + Cisplatin (orange). **p*<0,05; ****p*<0,001; (Ziemann et al., 2015).

3.9 Analyse der Zelltodinduktion durch Photonenbestrahlung und Cisplatininkubation

3.9.1 Analyse der Zelltodinduktion – Zellzahl in der subG1-Phase

Für die Analyse des Zelltods in den HNSCC Zelllinien wurde zunächst der Anteil der Zellen in der subG1-Phase analysiert (siehe 2.8). Hierbei zeigte sich innerhalb des Untersuchungszeitraumes bis 48 h in allen Zelllinien eine sehr geringe basale Rate an Zellen in der subG1-Phase.

Die alleinige Bestrahlung führte in HPV+ Zelllinien zunächst zu keiner Zunahme der subG1-Phase bis zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung mit 6 Gy (Abbildung 14B). Nach 48 h fand sich eine signifikant höhere Rate an Zellen in der subG1-Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (subG1-Phase nach 48 h: $2,03 \pm 1,46$ % vs. $11,04 \pm 2,53$ %; $p < 0,05$ für Kontrolle vs. IR; Abbildung 14B). Die alleinige Behandlung mit Cisplatin ($20 \mu\text{M}$) führte bereits zu frühen Zeitpunkten (10 h) nach Cisplatininkubation zu einer Zunahme der subG1-Fraktion. Diese war bereits 24 h nach Beginn der Cisplatininkubation signifikant erhöht (subG1-Phase nach 24 h: $2,74 \pm 2,63$ % vs. $14,56 \pm 6,75$ %; $p < 0,001$) und nahm bis 48 h nach Cisplatininkubation weiter zu (subG1-Phase nach 48 h: $2,03 \pm 1,46$ % vs. $22,13 \pm 10,27$ %; $p < 0,001$ für Kontrolle vs. Cisplatin). Die Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung führte zu einem der alleinigen Cisplatininkubation ähnlichen Kurvenverlauf mit signifikanter Zunahme der subG1-Fraktion nach 24 h und weiterer signifikanter Zunahme nach 48 h (subG1-Phase nach 24 h: $12,11 \pm 2,18$ %, $p < 0,05$ bzw. nach 48 h: $22,12 \pm 9,65$ %; $p < 0,001$ jeweils für Kontrolle vs. IR + Cisplatin; Abbildung 14B).

In HPV- Zelllinien fand sich nach alleiniger Bestrahlung ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf mit einer Zunahme der Zellen in der subG1-Phase ab 24 h nach Bestrahlung. Diese Zunahme war zum Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung signifikant höher als in der unbehandelten Kontrolle (subG1-Phase nach 48 h: $3,04 \pm 3,42$ % vs. $7,78 \pm 2,48$ %; $p < 0,05$ für Kontrolle vs. IR; Abbildung 14A). Wie in HPV+ Zelllinien zeigte sich in HPV- Zelllinien eine deutliche Zunahme der subG1 Fraktion durch alleiniger Cisplatininkubation mit signifikanter Zunahme der Zellen in der subG1-Phase nach 24 und 48 h (subG1-Phase nach 24 h: $0,87 \pm 0,91$ % vs. $6,92 \pm 2,54$ %; $p < 0,01$ bzw. nach 48 h: $3,04 \pm 3,42$ % vs. $17,24 \pm 6,04$ %; $p < 0,001$ für Kontrolle vs. Cisplatin). Die Kombinationsbehandlung zeigte auch in HPV- Zelllinien keinen Unterschied zur alleinigen Cisplatininkubation. Es fanden sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Kombinationsbehandlung nach 24 h und 48 h (subG1-Phase nach 24h: $10,34 \pm 2,41$ %; $p < 0,001$ bzw. nach 48 h: $18,63 \pm 4,19$ %; $p < 0,001$ für Kontrolle vs. IR + Cisplatin; Abbildung 14A).

Die Auswertung zeigte nach keiner Behandlungsmodalität einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der HPV+ und HPV- Zelllinien. Sowohl in HPV+ als auch HPV- Zelllinien führte die Inkubation mit Cisplatin zu signifikant höheren Raten an Zellen in der subG1-Phase als die alleinige Bestrahlung (IR vs. Cisplatin nach 48 h: $p < 0,01$ für HPV+ bzw. $p < 0,001$ für HPV-).

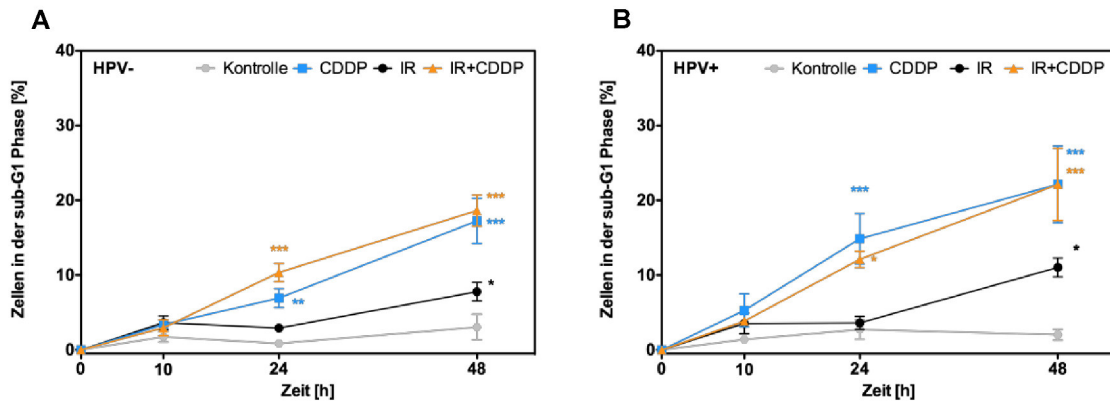


Abbildung 14: Auswertung der Zellen in der subG1-Phase in HPV- (A) und HPV+ (B) Zelllinien in einem Zeitraum von 10 – 48 h nach Behandlung in unbehandelten Kontrollen (K) und nach Behandlung mit Bestrahlung (6 Gy, IR), Cisplatin (20 μ M, CDDP) und der Kombination (IR + CDDP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; (Ziemann et al., 2015).

3.9.2 Analyse der Zelltodinduktion – Induktion der Apoptose

Die durchflusszytometrische Analyse der Annexin V-FITC positiven (einfach positive, frühapoptotische Zellen) und der Annexin V-FITC und Propidiumiodid positiven (doppelt positive, spätapoptotische Zellen) wurde nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy, 10 μ M Cisplatin und einer Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Rate früh und spätapoptotischer Zellen addiert und auf die unbehandelte Kontrolle normiert und so die Gesamtrate apoptotischer Zellen bestimmt.

In den HPV+ Zelllinien fand sich 24 h nach Bestrahlung nur eine geringe Zunahme apoptotischer Zellen (apoptotische Zellen nach 24 h: $4,53 \pm 1,94$ %; Abbildung 15A), 72 h nach Bestrahlung stieg die Apoptoserate deutlich an (Mittelwert doppelt positiver Zellen nach 72 h: $23,44 \pm 11,05$ %; Abbildung 15B). Die Behandlung mit Cisplatin (10 μ M) führte in HPV+ Zelllinien im Vergleich zur Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen nach 24 h und 72 h (apoptotische Zellen nach 24 h: $22,06 \pm 16,19$ %, $p < 0,01$ bzw. nach 72 h: $85,19 \pm 14,69$ %; $p < 0,001$ für IR vs. Cisplatin; Abbildung 15A/B). Die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin bewirkte keine weitere Zunahme der Apoptoserate in HPV+ Zelllinien im Vergleich zur alleinigen Cisplatininkubation. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen gegenüber der alleinigen Bestrahlung (apoptotische Zellen nach 24 h: $27,81 \pm 17,37$ %, $p < 0,001$ bzw. nach 72 h: $84,46 \pm 17,08$ %; $p < 0,001$ für IR vs. IR + Cisplatin).

Die Bestrahlung alleine bewirkt auch in HPV- Zelllinien nach 24 h nur eine geringe Rate apoptotischer Zellen (apoptotische Zellen nach 24 h: $5,15 \pm 5,03$ %; Abbildung 15A). Wie in HPV+ Zelllinien stieg diese Rate nach 72 h noch einmal deutlich an (apoptotische Zellen nach 72 h: $15,91 \pm 5,13$ %; Abbildung 15B). Es zeigte sich nach der alleinigen Inkubation mit Cisplatin eine leichte Zunahme der Apoptoserate nach 24 h (apoptotische Zellen nach 24 h: $13,17 \pm 10,73$ %; $p > 0,05$).

Diese Rate stieg bis 72 h weiter an und es fanden sich signifikant mehr apoptotische Zellen als nach alleiniger Bestrahlung (apoptotische Zellen nach 72 h: $73,21 \pm 18,14$ %; $p < 0,001$ für IR vs. Cisplatin). Die Kombinationstherapie von Bestrahlung und Cisplatin bewirkte keine wesentliche Zunahme im Vergleich zur alleinigen Cisplatininkubation.

Nach 72 h war die Rate apoptotischer Zellen signifikant höher als nach alleiniger Bestrahlung (apoptotische Zellen nach 24 h: $13,80 \pm 11,56$ %; $p > 0,05$, bzw. nach 72 h: $74,79 \pm 19,16$ %; $p > 0,001$ für IR vs. IR + Cisplatin).

In der gruppierten Auswertung der Zelllinien anhand des HPV-Status fand sich nach Bestrahlung lediglich nach 72 h ein geringer, nicht signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abbildung 15B). Durch Cisplatininkubation kam es gerade zum frühen Zeitpunkt (24 h) zu einer höheren Rate apoptotischer Zellen. Nach 72 h zeigten sowohl HPV+ und HPV- Zelllinien eine sehr starke Zunahme der Apoptose mit leicht höheren Werten in der Gruppe der HPV+ Zelllinien (Abbildung 15B). Nur die Kombinationsbehandlung bewirkte nach 24 h eine signifikant höhere Rate apoptotischer Zellen in der Gruppe HPV+ im Vergleich zu HPV- Zelllinien ($p < 0,05$; Abbildung 15A).

Insgesamt zeigten sich die einzelnen Zelllinien innerhalb der Gruppen sehr heterogen und teilweise überlappten sich die Apoptoseraten zwischen HPV+ und HPV- Zelllinien.

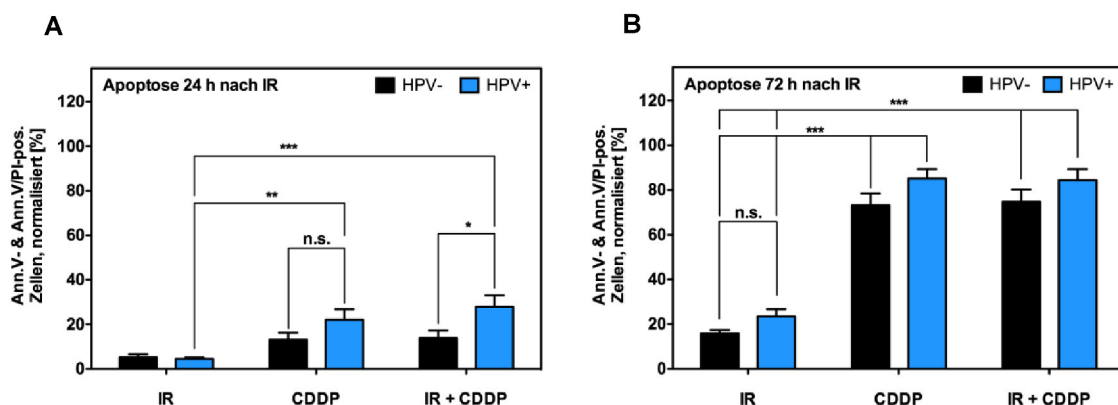


Abbildung 15: Apoptoserate in HPV- (schwarz) und HPV+ (blau) Zelllinien 24 h (A) und 72 h (B) nach Behandlung mit Bestrahlung (IR) ± Cisplatin (CDDP). Die Apoptoserate ist als Summe Annexin V-FITC positiver und Annexin V-FITC / PI positiver Zellen (Ann.V-&Ann.V/PI-pos. Zellen) normiert auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; (Ziemann et al., 2015).

3.10 Korrelation des zellulären Überlebens mit dem Zelltod

Durch Ermittlung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman wurde überprüft, ob die gefundenen Unterschiede in der Proteinexpression, der Apoptoserate und der subG1-Fraktion mit dem zellulären Überleben korrelieren und eine Ursache für ein besseres oder geringeres Überleben darstellen. Wäre dies der Fall, erwartet man eine Abnahme des Überlebens bei Zunahme der subG1-Fraktion und der Apoptoserate, also eine negative Korrelation.

Für die Expression der beiden Onkoproteine E6 und E7 hingegen würde man eine positive Korrelation mit dem zellulären Überleben erwarten, da eine Abnahme der treibenden Onkoproteine das Überleben verringern sollte.

Für die Analyse der Korrelation zwischen der subG1-Phase und der Expression von E6 und E7 mit dem zellulären Überleben lagen insgesamt zu wenige Daten vor, um diese valide zu berechnen, sodass keine detaillierte Auswertung vorgenommen wurde.

Es zeigte sich lediglich ein Trend, dass diese Parameter mit dem zellulären Überleben korrelieren. Wie erwartet war dieser Trend für die subG1-Fraktion negativ und für die Proteinexpression stark positiv.

Die Korrelationsanalyse der Apoptoserate nach 72 h mit dem klonogenen Überleben (SF2) nach Bestrahlung und der Kombinationstherapie in HPV+ Zelllinien zeigte eine signifikante negative Korrelation der Apoptoserate mit dem zellulären Überleben ($r_s = -0,76$; $p = 0,04$; Abbildung 16B). Bei höheren SF2-Werten fanden sich also geringere Werte an apoptotischen Zellen. Eine Zunahme der Apoptose bedingte eine Abnahme des SF2 Wertes.

Die gleiche Analyse in der Gruppe der HPV- Zelllinien zeigte keine solche Korrelation zwischen der Apoptoserate und dem SF2-Wert ($r_s = -0,69$; $p = 0,07$; Abbildung 16A), da sich zwar ein ähnlicher negativer Korrelationskoeffizient zeigt, jedoch keine Signifikanz dieses Wertes vorliegt.

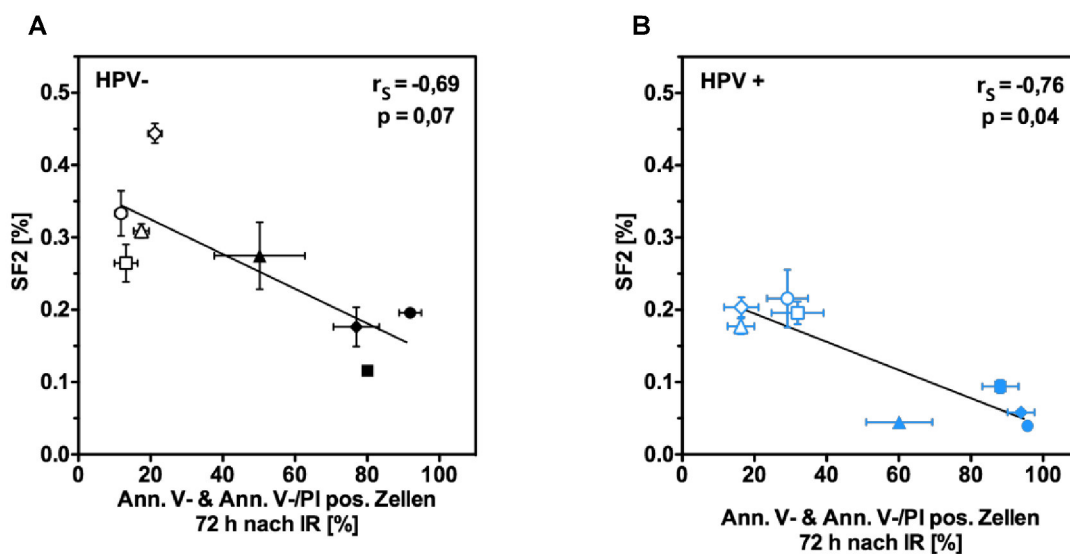


Abbildung 16: Korrelation des klonogenen Überlebens bei 2 Gy (SF2) aus Abbildung 5 mit der Apoptoserate aus Abbildung 13B in HPV- (A) und HPV+ (B) Zelllinien. Die Korrelation zwischen dem SF2 Wert und der Apoptoserate wurde für HPV- und HPV+ Zelllinien getrennt anhand des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) berechnet. Zur Verdeutlichung der Korrelation wurde mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade erstellt (Teile veröffentlicht in Ziemann et al., 2015).

4 Diskussion

Klinische Daten zeigen, dass Patienten mit HPV-assoziierten HNSCC besser auf die Therapie ansprechen, als Patienten mit Noxen-induzierten HNSCC. Ziel der Arbeit war es, Unterschiede in der zellulären und molekularen Schadensantwort von HPV+ und HPV- HNSCC Zelllinien nach Bestrahlung und Cisplatininkubation zu identifizieren, die diesen klinisch beobachteten Unterschiede erklären und hieraus ggf., gezielte Therapiestrategien abzuleiten.

4.1 HPV-Status der untersuchten Zelllinien

Während es eine Vielzahl an HPV-negativen Kopf-Hals Tumorzelllinien (KHTZ) gibt, stehen bislang lediglich sieben HPV-positive Zelllinien dieser Tumorentität zur Verfügung. In Vorarbeiten wurden auch einige weitere HPV+ Zelllinien analysiert, jedoch auf Grund von zu langer Verdopplungszeit und ungenügender Koloniebildungseffizienz nicht für diese Arbeit verwendet. In den genutzten Zelllinien liegt außer in der Linie 93-VU-147T p53 als Wildtyp vor, sodass die Situation im Patienten adäquat wiedergespiegelt wird. Für die Linie 94-VU-147T wurde erst während der Arbeit beschrieben, dass p53 auf einem Allel eine Mutation aufweist. Zunächst wurden Identität und HPV-Status der verwendeten Zelllinien verifiziert. Die Untersuchungen bestätigten, dass alle verwendeten HPV+ Zelllinien, entsprechend den Literaturangaben ein HPV-Genom besitzen. In den als HPV- beschriebenen Linien ließ sich keine HPV-DNA nachweisen (Arenz *et al.*, 2014). Inzwischen wurde von Olthof *et al.* (Olthof *et al.*, 2015) gezeigt, dass das virale Genom bei fast allen HPV+ Zelllinien in das humane Genom integriert wurde. Bei der Zelllinie UM-SCC-104 wurde ein episomales HPV Transkript nachgewiesen (Olthof *et al.*, 2015). Dies scheint die These zu stützen, dass die Integration des HPV Genoms einen essentiellen Schritt in der Karzinogenese von HPV+ Tumoren darstellt (zur Hausen, 2002). Zudem wurde eine aktive Expression der viralen Gene *E6* und *E7* nachgewiesen, was unsere eigenen Expressionsanalysen zu diesen Onkogenen bestätigt. Zusätzlich zeigten Olthof *et al.* (Olthof *et al.*, 2015) in allen HPV+ Zelllinien auch eine Expression des viralen Gens *E2*. Eine Erkenntnis, die in zukünftigen Analysen wichtig sein kann (siehe 4.7.).

4.2 Intrinsische Therapiesensibilität von HNSCC Zelllinien

Sofern die klinisch besseren Ansprechraten in einer höheren intrinsischen zellulären Sensibilität der Zellen begründet liegen, sollte sich auch *in vitro* eine höhere Sensibilität HPV+ Tumorzelllinien zeigen. Bislang wurde mit dieser Hypothese vorwiegend die Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung alleine überprüft. Zur Sensibilität von HNSCC Zelllinien gegenüber Cisplatin gibt es hingegen nur sehr wenige Daten. Der Therapiestandard in fortgeschrittenen Stadien beruht allerdings auf einer kombinierten, cisplatinhaltigen Radiochemotherapie. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Sensibilität HPV+ und HPV- HNSCC Zelllinien sowohl gegenüber Cisplatin und ionisierende Strahlung alleine, als auch gegenüber der Kombination aus Cisplatin und Photonenbestrahlung analysiert.

4.2.1 Intrinsische Sensibilität von HNSCC Zelllinien gegenüber Cisplatin

Die untersuchten HPV+ und HPV- HNSCC Zelllinien zeigten eine heterogene Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin, was möglicherweise die Situation im Patientenkollektiv widerspiegelt (R. Kimple *et al.*, 2013). So finden sich im Zellviabilitätstest einige Überlappungen in der Cisplatinsensibilität zwischen HPV+ und HPV- Zelllinien. Der Koloniebildungstest bewies hingegen, dass die Gruppe der HPV+ HNSCC Zelllinien im Vergleich zu der Gruppe der HPV- Zelllinien im Mittel signifikant sensibler gegenüber Cisplatin ist. Diese erhöhte Sensibilität HPV+ Tumore wurde auch in Tumorxenografts bestätigt (Stein *et al.*, 2015). Grund für die negativen Ergebnisse in früheren Publikationen *in vitro* kann die verwendete Analysemethode sein. Nagel *et al.* (Nagel *et al.*, 2013) verwendeten lediglich einen Zellviabilitätstest (CellTiter-Blue Assay; Promega) zur Überprüfung der zellulären Sensibilität. In einem mit diesem vergleichbaren Zellviabilitätstests zeigt sich auch in unseren Daten kein signifikanter Unterschied zwischen HPV+ und HPV- Zelllinien. Mittels Zellviabilitätsmessungen lässt sich lediglich ein aktiver Metabolismus in den Zellen nachweisen. Hierdurch werden auch Zellen erfasst, die sich nicht mehr aktiv teilen z.B. Zellen in Seneszenz. Für die strahlenbiologische Determinierung der Radiosensibilität ist es wichtig, solche sich nicht mehr aktiv teilende Zellen von der Analyse auszuschließen. Deswegen wurde das klonogene Überleben mittels Koloniebildungstest, der als Goldstandard zur Messung dieses Endpunktes gilt, analysiert. Anhand unserer Daten aus den Koloniebildungstest und den Tumorxenograftanalysen von Kimple *et al.* (R. J. Kimple *et al.*, 2013; Stein *et al.*, 2015) bestätigt sich somit eine höhere intrinsische Sensibilität HPV+ HNSCC Zelllinien gegenüber Cisplatin. Diese beiden Endpunkte sind auch aus klinischer Sicht relevanter als die Messung der Zellviabilität, da Zellen mit einem noch vorhandenen klonogenen Potential für das Auftreten von Rezidiven verantwortlich sind (Woodward und Bristow, 2009).

In der Arbeit von Kimple wurde auch nach weiteren Grundlagen für die Cisplatin-Empfindlichkeit gesucht, um neue potentielle Biomarker zu finden. Hierbei zeigte sich, dass HPV+, Cisplatin sensitive Tumore einen deutlich geringeren Level des Proteins excision repair cross-complementing 1 (ERCC1) aufweisen. Dieses Protein ist für den Nukleotid Exzisions-Reparaturweg (NER) wichtig, durch welchen Cisplatin-induzierte DNA Schäden repariert werden. Somit könnte ERCC1 potentiell als Biomarker zur Identifizierung Cisplatin-sensitiver Subgruppen innerhalb der heterogenen Gruppe der HPV-assoziierten Tumore dienen und ggf. eine Dosisreduktion bei Patienten mit sensiblen Tumoren erlauben (Stein *et al.*, 2015).

4.2.2 Intrinsische Sensibilität von HNSCC Zelllinien gegenüber Bestrahlung

In unserer Analyse zeigte sich, dass HPV+ Zelllinien im Mittel signifikant empfindlicher gegenüber einer Photonenbestrahlung sind, als HPV- Tumorzelllinien. Dieses Ergebnis stimmt mit *in vitro* Studien von Kimple *et al.* (R. Kimple *et al.*, 2013) und Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013) überein. Zudem ist unsere Analyse kongruent zu der klinischen Beobachtung, dass HPV+ Tumore besser auf eine Radiotherapie ansprechen (Sethi *et al.*, 2012). Trotz des gefundenen Unterschiedes zeigt sich auch nach alleiniger Bestrahlung (ähnlich wie nach Cisplatin), dass die Gruppen HPV+ und HPV- Tumorzelllinien insgesamt heterogen bezüglich ihrer Strahlensensitivität sind.

So finden sich teilweise Überlappungen zwischen beiden Gruppen bei höheren Bestrahlungsdosen, was beispielsweise dazu führt, dass die Dosis, bei der die Überlebensfraktion 10 % beträgt (D10), in der Gruppe der HPV+ Zelllinien nicht signifikant von der entsprechenden Dosis in HPV- Zelllinien abweicht. Somit tragen die Betrachtung anderer Endpunkte (bei Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013) SF3 und SF6) und Unterschiede in der Methodik zu abweichenden Ergebnissen publizierter Daten bei (Spanos *et al.*, 2009; Nagel *et al.*, 2013).

Gerade zur Analyse der Strahlenempfindlichkeit ist der von Nagel *et al.* (Nagel *et al.*, 2013) verwendete Zellviabilitätstest kritisch zu betrachten. In diesem Assay wird über die Stoffwechselaktivität ein Rückschluss auf die Toxizität einer Behandlung geschlossen, die unterschiedlichen Zelltodmechanismen nach einer Bestrahlung sowie deren zeitliche Abfolge finden jedoch keine Berücksichtigung. Gruppen, die zur Analyse einen klassischen Koloniebildungstest anwendeten, beschreiben übereinstimmend die Gruppe HPV+ HNSCC Zelllinien als strahlensensibler bei allerdings leichten Unterschieden in den verwendeten Zelllinien und der Methodik (R. Kimple *et al.*, 2013; Rieckmann *et al.*, 2013; Arenz *et al.*, 2014). Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013) beschreibt die HPV+ Zelllinien leicht radioresistenter als in unseren Untersuchungen, wobei die Arbeitsgruppe ein so genanntes "Delayed-Plating" Protokoll benutzt, bei dem die Zellen erst nach der Bestrahlung ausgesät werden, was den gefundenen Unterschied erklären kann. Zudem wurde in diesen Arbeiten ein jeweils unterschiedliches Panel HPV- Zelllinien verwendet, was zum einen die gefundenen Unterschiede zwischen HPV+ und HPV- Zelllinien stützt, zum anderen aber auch gewisse Unterschiede in der Ausprägung der gefundenen Unterschiede erklärt. Gerade HPV- HNSCC Zelllinien zeichnen sich durch eine große Heterogenität innerhalb der Gruppe aus, da diese Tumorzelllinien über unterschiedliche Mutationsspektren verfügen und zu verschiedenen Zeitpunkten (vor bzw. nach einer Tumorthherapie) aus Patienten etabliert wurden. Somit gibt es sowohl sensiblere und resistentere HPV- HNSCC Zelllinien, was die Ausprägung der unterschiedlichen Sensibilität im Vergleich zu HPV+ HNSCC Zelllinien mit bestimmt.

Generell konnte aber inzwischen durch unsere Arbeiten und die Arbeiten von Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013) und Kimple *et al.* (R. Kimple *et al.*, 2013) gezeigt werden, dass im Mittel HPV+ HNSCC Zelllinien strahlensensitiver sind, als HPV- HNSCC Tumorzelllinien und somit die klinische Beobachtung des höheren therapeutischen Ansprechens auch in einer höheren intrinsischen Sensibilität der Tumorzellen begründet ist (Arenz *et al.*, 2014).

4.2.3 Intrinsische Sensibilität von HNSCC Zelllinien gegenüber Bestrahlung und Cisplatininkubation

Wir konnten zeigen, dass besonders in der Gruppe der HPV+ Zelllinien ein zusätzlicher Effekt durch Kombination der Bestrahlung mit einer Cisplatininkubation vorhanden war. Insgesamt konnten alle HPV+ Zelllinien durch die Inkubation mit Cisplatin für die Bestrahlung sensibilisiert werden. Hingegen bewirkte Cisplatin in einigen HPV- Zelllinien im Vergleich zu einer alleinigen Bestrahlung keinen zusätzlichen Effekt auf das zelluläre Überleben (siehe Abbildung 6A: UD-SCC-1). Insgesamt zeigte sich hierbei erneut die Heterogenität beider Gruppen. So gab es bei einer Dosis von 2 Gy auch HPV+ Zelllinien die eine geringere DER (also eine Sensibilisierung durch Cisplatin) aufwiesen, als einige HPV- Tumorzelllinien.

Dennoch konnten wir zeigen, dass Cisplatin gerade nach einer Dosis von 4 oder 6 Gy HPV+ Zelllinien signifikant stärker gegenüber der Bestrahlung sensibilisiert als HPV- Zelllinien. Diese *in vitro* Ergebnisse sind kongruent mit klinischen Studien an HPV+ und HPV- HNSCC Patientenkohorten (Sethi *et al.*, 2012).

Generell zeigt sich, dass es teilweise gegensätzliche Ergebnisse bezüglich der Sensitivität HPV+ Tumorzelllinien gegenüber Cisplatin und Bestrahlung, sowohl alleine als auch in Kombination gibt (siehe auch 4.2.1 und 4.2.2). Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse können sowohl im methodischen Vorgehen liegen, als auch der Auswahl der Zelllinien und in Besonderen in der Tatsache, dass einige Gruppen mit HPV transfizierten Zelllinien gearbeitet haben. Die Überprüfung des Vorhandenseins von HPV DNA erscheint hierbei unerlässlich. So konnten Kimple *et al.* (R. Kimple *et al.*, 2013) feststellen, dass in einigen verwendeten Zelllinien keine HPV DNA nachgewiesen werden kann. Diese Tatsache und die methodischen Unterschiede erklären die heterogenen Ergebnisse bzgl. der Strahlen- und Chemosensitivität. Zudem ist die Anzahl der zur Verfügung stehenden HPV+ Tumorzelllinien aus der Kopf-/Halsregion sehr klein, sodass je nach untersuchtem Endpunkt die Heterogenität innerhalb der Gruppe der HPV+ Zelllinien zu unterschiedlichen Ergebnissen bei Gruppenanalysen führen kann.

Mögliche zelluläre Grundlagen für die höhere Sensibilität HPV+ HNSCC Zelllinien können u.a. Störungen in der DNA-Schadensreparatur, Zellzyklusdysregulation, Änderungen der Expression von Onko- / Tumorsuppressorprotein, oder ein vermehrter Zelltod sein. Ob die genannten Mechanismen wichtig sind für die Sensibilität HPV+ HNSCC Zelllinien, wurde daher nachfolgend im Vergleich mit HPV- HNSCC Zelllinien analysiert.

4.3 Residuelle DNA-Doppelstrangbrüche

Eine mögliche Ursache für eine erhöhte intrinsische Sensibilität gerade gegenüber Bestrahlung kann eine gestörte Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen sein (Rieckmann *et al.*, 2013). Die Analyse der Phosphorylierung am Histon H2AX (γ H2AX) gilt als ein Marker für Doppelstrangbrüche innerhalb der DNA (Sak und Stuschke, 2010). Obwohl wir zeigen konnten, dass die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin zu mehr residuellen γ H2AX Foci führt, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen HPV+ und HPV- Zelllinien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Doppelstrangbrüche zu reparieren. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu späteren Analysen in unserem Labor und zu Veröffentlichungen von Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013; Arenz *et al.*, 2014). Beide Arbeiten konnten zeigen, dass HPV+ Zelllinien 24 h nach Bestrahlung signifikant mehr residuelle γ H2AX Foci aufweisen als HPV- Zelllinien. In der Arbeit von Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013) konnte zudem gezeigt werden, dass eine Korrelation der residuellen γ H2AX Foci mit der Überlebensfraktion nach 6 Gy besteht. Die Gruppe unterstreicht damit die Bedeutung der DNA-Reparatur als einen wichtigen Mechanismus, der zur höheren intrinsischen Sensitivität HPV+ Zelllinien gegenüber Bestrahlung beiträgt (Rieckmann *et al.*, 2013). Grund für unser negatives Ergebnis ist, dass die Analyse in dieser Arbeit mit maximal konfluent gewachsenen Zelllinien durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu wurden bei Arenz *et al.* (Arenz *et al.*, 2014) und Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013) exponentiell wachsende Zellen verwendet.

Die Anzahl und die Kinetik von γ H2AX Foci unterscheidet sich in konfluenten Zellen von derjenigen proliferierender Zellen (Kang, So und Ouchi, 2012; Martin *et al.*, 2013), sodass ein möglicher Unterschied zwischen HPV+ und HPV- Zelllinien durch unser methodisches Vorgehen wahrscheinlich nicht detektierbar war.

4.4 Zellzyklusprogression und Expression von Zellzyklusproteinen nach Cisplatininkubation \pm Bestrahlung

Ein bedeutendes Tumor Hallmark ist die Zellzyklusprogression unabhängig von vorhandenen Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden und äußeren Einflüssen (Hanahan und Weinberg, 2011). In HPV+ HNSCC findet sich eine Virus induzierte und in HPV- HNSCC eine durch Mutationen bedingte gestörte Regulation des Zellzyklus (zur Hausen, 2002). Wir haben daher untersucht, wie sich eine Photonenbestrahlung und / oder eine Cisplatininkubation auf den Zellzyklus in HNSCC Zelllinien auswirken.

Die Analyse der Zellzyklusprogression zeigte nach ionisierender Strahlung eine schnellere Progression HPV+ Zelllinien von der G1- in die S-Phase und einen stärkeren und länger anhaltenden G2/M-Arrest. HPV- Zelllinien zeigten zwar ebenfalls einen deutlichen Arrest in der G2/M-Phase, dieser war jedoch innerhalb von 48 h wieder vollständig reversibel. Für die alleinige Bestrahlung lassen sich unsere Daten mit den Ergebnissen aus den Arbeiten von Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013), Kimple *et al.* (R. Kimple *et al.*, 2013) und Arenz *et al.* (Arenz *et al.*, 2014) vergleichen und zeigen eine Übereinstimmung zu diesen Arbeiten.

Kongruent zur Arretierung der Zellen innerhalb des Zellzyklus fanden wir eine erhöhte Expression von Cyclin A2, welches in der G2-Phase maximal exprimiert wird und anschließend schnell abgebaut wird. Eine erhöhte Expression weist somit auf eine Arretierung der Zellen in der G2-Phase hin.

In den meisten Zelllinien wird durch Behandlung mit Cisplatin eine Arretierung innerhalb der G1-Phase erreicht (Cepeda *et al.*, 2007). In unseren Analysen konnten wir jedoch weder nach Cisplatin noch nach der Kombination aus Cisplatin und Photonenbestrahlung eine Arretierung der Zelllinien in der G1-Phase finden. Dieses Defizit zur Arretierung in der G1-Phase, kann durch das Fehlen eines funktionalen p53 Proteins begründet sein. Als Tumorsuppressor reguliert p53 in normalen Zellen einen Zellzyklusstopp in der G1-Phase durch Expression des CDK-Inhibitors p21 (Weinberg, 2013). In HPV+ Zelllinien wird dieses Signal jedoch durch das Protein E6 blockiert, während HPV- HNSCC oftmals eine Mutation im *p53* Gen aufweisen. Somit liegt in HPV+ und HPV- Zelllinien kein funktionales p53 vor. Es zeigt sich nach Cisplatin und nach der Kombinationsbehandlung ein leichter Arrest in der S-Phase und nach der Kombination zusätzlich ein Arrest in der G2/M-Phase, der geringer ausgeprägt war, als nach alleiniger Bestrahlung. Gleichzeitig war nach Cisplatininkubation und in der Kombination die Fraktion der subG1-Zellen deutlich erhöht, was auf einen vermehrten Zelltod schließen lässt. HPV+ und HPV- Zelllinien waren also nicht in der Lage, innerhalb der G1-Phase zu arretieren. Zudem weisen HPV+ Zelllinien zusätzlich zu dem ausgeprägten und prolongierten Arrest eine vermehrte Rate an Zelltod auf.

Dies bestätigt sich auch in unserer Analyse der Apoptoseinduktion. Foijer *et al.* (Foijer und te Riele, 2006) konnten zeigen, dass Zellen, die keinen intakten G1-Arrest aufweisen, nicht direkt sterben, sondern zunächst in die S- und G2/M-Phase fortschreiten und aus diesen Zellzyklusphasen heraus der Zelltod eintritt. HPV+ HNSCC weisen sowohl einen starken Arrest und einen vermehrten Zelltod auf, sodass dieser Mechanismus für HPV+ Zelllinien sehr wahrscheinlich erscheint. Zudem könnte der lange Arrest auch bedingt sein durch die vermehrte Rate an residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen, wie Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013) beschrieben haben. Zusätzlich zu den gefundenen Störungen in der Zellzyklusprogression und Cyclin A2 Regulation konnten wir nach Cisplatininkubation eine Hochregulation von Cyclin E2 in HPV+ Zelllinien beobachten. Ein Zusammenhang zwischen der Cyclin A und E Expression und HPV wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Noya und Chien, 2001; Nguyen und Münger, 2008). So konnte gezeigt werden, dass durch das virale E7 Protein beide Cycline vermehrt exprimiert werden und zur malignen Transformation beitragen (Zubillaga-Guerrero *et al.*, 2013). Zudem ist bekannt, dass eine gestörte Cyclin E Regulation zu einer gesteigerten chromosomalen Instabilität und vermehrtem Zelltod führt (Mazumder, Plesca und Almasan, 2007; Caldon *et al.*, 2013). Ob die in dieser Arbeit beschriebene vermehrte Expression von Cyclin E2 direkt im Zusammenhang mit der höheren Zelltodrate und zellulären Sensibilität gegenüber Cisplatin steht, sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden. Bislang sind die genauen Mechanismen, wie eine gestörte Cyclin Regulation neben einer Zellzyklusdysregulation auch zu vermehrtem Zelltod führt, nicht hinreichend beschrieben.

Es zeigt sich also, dass sowohl HPV+ als auch HPV- HNSCC Tumorzelllinien Alterationen in der Zellzyklusprogression aufweisen. In HPV+ HNSCC bedingt die Expression des viralen Onkoproteins E7 eine Inhibition des Tumorsuppressors pRB und verhindert so einen Arrest der Zellen am Kontrollpunkt zwischen der G1 und der S-Phase (Roman und Munger, 2013). Gleichzeitig wird durch das virale Protein E6 verhindert, dass es zu p53 abhängigen Zellzyklusarresten, die nach DNA- und Zellschäden eintreten können, kommt (Vande Pol und Klingelhutz, 2013). Somit sind die viralen Onkoproteine maßgebend für die gestörte Zellzyklusregulation und -progression.

Im Gegensatz hierzu wurden bei HPV- HNSCC eine Vielzahl von Mutationen in zellzyklusregulierenden Proteinen, wie den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), Cyclinen und proliferativen Transkriptionsfaktoren beschrieben (Lawrence *et al.*, 2015). Diese Mutationen scheinen in HPV- HNSCC den Zellzyklus stark zu beeinflussen und könnten neben der häufig vorhandenen Mutation in p53 die gefundene gestörte Zellzyklusregulation erklären.

4.5 Expression der Onkoproteine HPV E6 / E7 und des Tumorsuppressors p53

Die beiden viralen Onkoproteine E6 und E7 sind für die Karzinogenese HPV+ HNSCC von essentieller Bedeutung (siehe 1.1.1). In HPV-transformierten Zelllinien scheint die Proliferation abhängig von der Expression der viralen Proteine E6 und E7 zu sein, ein Phänomen, das 2002 von Bernard Weinstein generell für Tumore als *“oncogenic addiction”* bezeichnet wurde (Weinstein, 2002). Das Konzept beschreibt die Abhängigkeit der Tumorzellen von einigen wenigen Proteinen und überaktivierten Signalkaskaden und eine damit verbundene hohe Sensibilität der Tumorzellen auf eine Inhibition dieser Tumor treibenden Proteine (Weinstein und Joe, 2006). Eine Möglichkeit, warum HPV+ HNSCC sensibel gegenüber einer Strahlen- und Cisplatintherapie sind, könnte in einer Änderung der Expression der viralen Proteine, von deren Expression die Tumorzellen abhängen, nach Behandlung liegen.

Wir konnten zeigen, dass es nach alleiniger Bestrahlung zu einem Anstieg der Expression von E6 und E7 kommt. Eine vermehrte Expression eines Onkoproteins erscheint zunächst paradox, da die Zellen gleichzeitig eine vermehrte Sensibilität gegenüber Bestrahlung aufweisen. Neue Studien zeigen jedoch, dass eine vermehrte Expression des Proteins E7 zu einer verzögerten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen führt (Park *et al.*, 2014). Durch E7 scheint es also zu einer vermehrten genomischen Instabilität und verstärktem Zelltod zu kommen. Rieckmann *et al.* (Rieckmann *et al.*, 2013) konnten bereits zeigen, dass die höhere Sensibilität HPV+ HNSCC gegenüber Bestrahlung mit einer vermehrten Rate an residuellen γ H2AX-Foci (nicht reparierten DNA-Doppelstrangbrüchen) korreliert. Für das Protein E6 ist bislang nicht genau geklärt, wie E6 mit der Doppelstrangbruchreparatur interferiert (Wallace und Galloway, 2014). Beschrieben sind bislang eine verzögerte Schadenserkennung durch Interaktion mit dem Protein ATR (Wallace *et al.*, 2012) und eine Interaktion mit dem *breast cancer 1* (BRCA1) Protein, das an der Reparatur durch homologe Rekombination (HR) beteiligt ist (Zhang *et al.*, 2005).

Somit scheint eine vermehrte Expression der Onkoproteine E6 und E7 die Reparatur von DNA-Schäden zu beeinflussen und so zu einer erhöhten Sensibilität HPV-assoziiierter Tumore gegenüber Photonenbestrahlung beizutragen.

Im Gegensatz dazu bewirkt eine Inkubation mit Cisplatin und die Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung eine signifikante Herabregulation der Proteine E6 und E7 in HNSCC Zelllinien. Ähnliche Effekte wurden auch in HPV+ Zervixkarzinomzelllinien beschrieben (Butz *et al.*, 1996). Eine verminderte Expression der HPV Proteine bedingt in transformierten Zelllinien eine erhöhte Rate an apoptotischen Zellen (Gubanova *et al.*, 2012). Tatsächlich konnten wir zeigen, dass eine Cisplatininkubation zu signifikant mehr Apoptose in HPV+ Zelllinien führt. Es zeigt sich also, dass die HPV+ HNSCC Zelllinien in ihrer Proliferation stark von beiden Onkoproteinen abhängen und eine Herabregulation von E6 und E7 wichtig für eine höhere Sensibilität gegenüber Cisplatin und einer Kombinationstherapie aus Cisplatin und Bestrahlung sind. Diese Beobachtung erscheint zunächst paradox zur Situation nach alleiniger Bestrahlung in der eine Hochregulation gefunden wurde. Grund hierfür ist die sehr große Vielfalt an Interaktionen zwischen E6 und E7 und zelleigenen Proteinen (siehe Einleitung Abbildung 1). So führt eine vermehrte Expression von E7 zu einer gestörten DNA-Reparatur und trägt so zu einer höheren Strahlensensibilität bei (Park *et al.*, 2014). Im Gegenzug stellen E6 und E7 aber auch sehr stark die Proliferation fördernde Onkoproteine dar und eine verminderte Expression dieser führt somit ebenfalls zu einer höheren Sensibilität HPV+ HNSCC Zelllinien.

Eine Möglichkeit, wie eine verminderte Expression von E6 in HPV+ HNSCC zu vermehrter Apoptose führt, ist die Reaktivierung des Tumorsuppressors p53 (Li und Johnson, 2013; Caicedo-Granados *et al.*, 2014). Dieser liegt in HPV+ Tumorzelllinien oftmals als *Wildtyp* vor und kann bei Reaktivierung durch DNA-Schäden und zellulärem Stress Zellzyklusarreste (vornehmlich in der G1-Phase) und Zelltod induzieren (Stiewe, 2007). In unseren HPV+ HNSCC Zelllinien konnten wir sowohl nach Bestrahlung als auch durch Cisplatin oder die Kombination aus beiden Therapieformen keine Änderung der p53-Expression nachweisen. Die Wirkung von Cisplatin auf HNSCC-Zelllinien beruht vornehmlich auf der Bildung von DNA-Addukten, wobei die Rate an Addukten ausschlaggebend für die Sensibilität von Zellen gegenüber Cisplatin zu sein scheint (Martens-de Kemp *et al.*, 2013). Hierdurch kommt es zu einer Beeinflussung einer Vielzahl von Proteinen und deren Expression, sodass der Zelltod auch über p53 unabhängige Mechanismen eingeleitet werden kann.

Dennoch scheint die Herabregulation der Onkoproteine wichtig für diesen Mechanismus. Arbeiten anderer Gruppen zeigen, dass eine spezifische Herabregulation von E6 und E7 mittels siRNA zu einer p53-Reaktivierung und zu einer vermehrten p53-abhängigen Apoptose führt (Li und Johnson, 2013). Neben einer siRNA-vermittelten Herabregulation von E6 und E7 konnte auch durch Inkubation von Zellen mit anderen Therapeutika, wie Proteasominhibitoren eine Reaktivierung von p53 in HPV+ HNSCC erreicht werden (Li und Johnson, 2013). Unsere Daten legen jedoch nahe, dass die Reaktivierung von p53 nicht der Hauptmechanismus ist, der zu einer Sensibilisierung von HPV+ HNSCC führt, da sowohl nach Bestrahlung und nach Cisplatin keine signifikanten Änderungen der Expression von p53 nachweisbar waren.

Vielmehr scheint die verminderte Expression der treibenden Onkogene *E6* und *E7* zu einem vermehrten Zelltod und damit einer höheren Sensibilität der HPV+ HNSCC zu führen: ein Effekt, der sowohl mit neueren Substanzen, aber auch mit klassischen Chemotherapeutika, wie Cisplatin erzielt werden kann (Gubanova *et al.*, 2012). Grundlegend hierfür könnte eine Abhängigkeit der Tumorzellen von der Expression der viralen Proteine *E6* und *E7* sein, wie Weinstein (Weinstein, 2002) dies für andere Onkoproteine beschrieben hat.

4.6 Zelltodanalysen

Die Rolle der Apoptose als eine Zelltodform für ein besseres Ansprechen HPV+ HNSCC wurde bislang in einigen Studien, die zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen kommen, untersucht. Generell konnten Arbeiten mit HPV+ Zelllinien (vorwiegend aus dem Bereich der Zervix) und HPV *E6* und /oder *E7* transfizierten Zellen zeigen, dass eine vermehrte Apoptose in HPV+ Zelllinien induziert werden kann. Ob die intrinsische Sensibilität HPV+ HNSCC Zelllinien zu einer höheren Apoptoserate führt und dieser Zelltodmechanismus in HPV+ Tumoren von Bedeutung ist, ist jedoch bislang umstritten. So konnten Rieckmann *et al.* keine vermehrte Apoptose in HPV+ HNSCC im Vergleich zu HPV- HNSCC 24 h nach Bestrahlung finden (Rieckmann *et al.*, 2013). Hingegen zeigte sich in der Arbeit von Kimple *et al.* (R. Kimple *et al.*, 2013) sowohl eine Zunahme der Caspase-Aktivität, als auch der Annexin-Färbung. Dies spricht beides für eine vermehrte Apoptoseinduktion in HPV+ HNSCC.

Wir konnten 24 h nach Bestrahlung mit 6 Gy keinen Unterschied zwischen HPV- und HPV+ Zelllinien in der Rate Annexin-V positiver Zellen und auch keine Zunahme der Zellen in der subG1-Phase (beides Hinweise auf eine fehlende Apoptose bzw. fehlenden Zelltod) finden. Jedoch zeigte sich nach 72 h eine signifikant höhere Rate an apoptotischen Zellen in der Gruppe der HPV+ Zelllinien. Somit scheint es erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung zu einer Zunahme der Zelltodinduktion zu kommen. Es könnte sein, dass die Zellen zunächst durch einen vermehrten Arrest in der G2/M-Phase innerhalb des Zellzyklus arretieren und dann auf Grund nicht reparierter DNA-Schäden die Apoptose induziert wird (Foijer und te Riele, 2006). So scheinen eine gestörte DNA-Schadensreparatur und eine vermehrte Apoptose zur höheren intrinsischen Sensibilität HPV+ HNSCC nach Photonenbestrahlung beizutragen (Blitzer *et al.*, 2014).

Bedeutender scheint die Induktion der Apoptose nach Behandlung der Zellen mit Cisplatin zu sein. Die Rate apoptotischer Zellen war nach Cisplatininkubation alleine deutlich und nach Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin signifikant höher in HPV+ als in HPV- HNSCC. Dies zeigte sich sowohl in der Messung der Annexin V-FITC positiven Zellen und der Bestimmung der subG1-Fraktion.

Zudem konnten wir die höhere Rate apoptotischer Zellen mit einem geringeren SF2-Wert korrelieren, was die Bedeutung der Apoptose für das bessere Ansprechen auf Cisplatin und / oder Bestrahlung bekräftigt.

Die höhere Rate apoptotischer Zellen in HPV+ HNSCC hängt vermutlich mit der verringerten Expression der Onkoproteine E6 und E7 zusammen, da beide die treibenden Onkoproteine in HPV transformierten Tumoren darstellen und auch antiapoptotische Signalkaskaden aktivieren (Rautava und Syrjänen, 2012). Ob hierzu eine Aktivierung von p53 benötigt ist, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht schließen, da wir keine Zunahme der Expression von p53 feststellen konnten. Kimple *et al.* (R. Kimple *et al.*, 2013) und andere Gruppen (Abdulkarim, Sabri und Deutsch, 2002), haben nachgewiesen, dass sich p53 prinzipiell in HPV+ Tumoren reaktivieren lässt und hierdurch ein p53 vermittelter Zelltod eintritt. Da E6 und E7 aber auch p53 unabhängige Apoptosewege inhibieren, wäre auch eine vermehrte Apoptose ohne p53 Reaktivierung denkbar (Garnett *et al.*, 2006). HPV-16 E6 inhibiert in transformierten Zellen die Apoptose unabhängig von p53 durch Degradation pro-apoptotischer Proteine wie Bak (Thomas und Banks, 1998, 1999) und Bax (Struijk *et al.*, 2008). Des Weiteren unterdrückt E6 die Freisetzung des Apoptose induzierenden Faktors (AIF) aus den Mitochondrien (Leverrier *et al.*, 2007) und inhibiert die Aktivität von Caspasen (Tungteakkhun *et al.*, 2009). Somit hat E6 einen großen Einfluss auf den Zelltod in HPV-transformierten Tumoren und eine Reduktion des E6 Proteinlevels, wie wir sie nach Cisplatin beobachtet haben, kann zu einer Reaktivierung der Apoptose auch unabhängig von p53 führen.

Dies stützt sich auch durch die Tatsache, dass eine erneute Expression des viralen E2 Proteins, das die Expression von E6 und E7 unterdrückt, zu einer vermehrten Apoptose in HeLa Zelllinien führt (Desaintes *et al.*, 1997, 1999).

Es zeigt sich also, dass der apoptotisch vermittelte Zelltod in HPV+ HNSCC wichtig ist und sich in größerem Maße durch Cisplatin induzieren lässt. Wie Apoptose nach Cisplatininkubation in HPV+ HNSCC vermittelt wird, ist allerdings nicht genau geklärt. Die Zelllinien scheinen jedoch von der Expression der HPV-Proteine E6 und E7 abhängig im Sinne eines "oncogene addiction" (Weinstein, 2002) zu sein, da das Wachstum gefördert und der Zelltod unterdrückt wird. Die Inhibition der tumortreibenden Proteine führt dann zu einem Proliferationsstopp und einem vermehrten Zelltod, wie durch uns nachgewiesen.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Insgesamt legen die Ergebnisse der dargestellten Versuche nahe, dass gerade für HPV+ HNSCC Tumore eine kombinierte Behandlung aus Cisplatin und Bestrahlung vorteilhaft ist. Grundlegend hierfür scheinen eine gestörte Zellzyklusregulation, eine verminderte Expression der Proteine E6 und E7, sowie eine vermehrte Apoptose zu sein. Insgesamt scheinen diese Mechanismen zusammen mit einer gestörten DNA Reparatur (Rieckmann *et al.*, 2013) und einer Reaktivierung von p53 (R. Kimple *et al.*, 2013) die bessere Prognose in HPV+ HNSCC Tumoren zu vermitteln (Blitzer *et al.*, 2014).

Derzeit rekrutieren einige klinische Studien Patienten, mit dem Ziel, die Therapie für HPV+ Tumor zu individualisieren und die Therapieintensität zu reduzieren, da man bislang davon ausgeht, dass die derzeitige leitliniengerechte Therapie der HNSCC für Patienten mit HPV-assozierten Tumoren möglicherweise eine Übertherapie darstellt (Kimple und Harari, 2014).

Die dargestellten Daten legen jedoch nahe, dass bei Patienten mit HPV-assozierten Tumoren nicht auf die cisplatinhaltige Chemotherapie verzichtet werden sollte. Günstiger könnte es sein, die Bestrahlungsdosis und / oder die Dosis der Chemotherapie anzupassen, wie gerade ebenfalls in einigen Studien evaluiert wird. Hierdurch könnten sich auch etwaige Nebenwirkungen reduzieren lassen. Diese Studien beschäftigen sich mit der Modulation der Dosis von bereits etablierten und zugelassenen Medikamenten und Therapieformen. Neuere Therapeutika haben bislang keine wesentliche Verbesserung der Prognose bei HNSCC Tumoren erbracht.

Durch genomische Analysen sowohl HPV+ als auch HPV- HNSCC Tumore konnte mittlerweile gezeigt werden, dass auch diese beiden Gruppen nicht homogen sind, sondern sich anhand des Genprofils 5 verschiedene Subtypen identifizieren lassen (Keck *et al.*, 2014). Trotzdem gibt es bislang keine individualisierte Tumorthherapie bei HNSCC Tumoren die auf der Analyse bestimmter Biomarker basiert ist.

Für HPV+ Tumore könnte ein solcher prognostisch relevanter Biomarker das virale Protein E2 sein. Wie oben erwähnt, haben Olthof *et al.* (Olthof *et al.*, 2015) gezeigt, dass in allen etablierten Tumorzelllinien trotz Integration des viralen Genoms ein Expression von E2 nachweisbar ist. Dies ist besonders interessant, da man bisher davon ausging, dass bei der Integration Teile des viralen Genoms herausgeschnitten werden und besonders häufig die Gene *E2* und *E5* vollständig oder zumindest teilweise verloren gehen. Der Verlust des *E2* Gens führt zu einer fehlenden Regulation der Expression der Onkogene *E6* und *E7*, was die Grundlage der malignen Transformation HPV+ Tumore darstellt (zur Hausen, 2002). Insgesamt ist die Bedeutung des viralen Proteins *E2* bei HPV+ Tumoren nur wenig untersucht.

Lediglich Arbeiten von Lindl *et al.* (Lindel *et al.*, 2005, 2006; Hauswald *et al.*, 2011) konnten zeigen, dass ein intaktes *E2* Gen mit einer verbesserten Gesamtüberlebensrate von Patienten mit HPV+ Tumoren des Oropharynx- und der Zervix assoziiert ist. Zusätzlich wurde in Zervixkarzinomzelllinien ein positiver Einfluss eines intakten *E2* Gens auf die Strahlensensitivität *in vitro* gezeigt (Lindel *et al.*, 2012).

Inzwischen ist bekannt, dass trotz eines intakten *E2* Gens eine Überexpression von *E6* und *E7* stattfinden kann: Reuschenbach *et al.* (Reuschenbach *et al.*, 2015) zeigten, dass der Methylierungs-Status der *E2* Bindungsstellen sowohl in HNSCC Zelllinien, als auch in Tumorproben von Patienten mit HNSCC stark unterschiedlich sein kann. Ein hoher Methylierungs-Status verhindert die *E2* bedingte Repression von *E6* und *E7*, da *E2* nicht mehr an die entsprechenden regulatorischen Stellen im HPV-Genom binden kann. Eine Prognostische Relevanz eines intakten *E2* Proteins und des Methylierungs-Status ist nicht abschließend geklärt, sodass dessen Bedeutung für Patienten mit HPV+ HNSCC weiterführend untersucht werden sollte (Reuschenbach *et al.*, 2015).

Neben diesen beiden Ansatzpunkten scheint auch eine Modulation der DNA-Schadensreparatur ein Ansatz, um HNSCC Tumore für eine Bestrahlungstherapie zu sensibilisieren und so die Ansprechraten zu verbessern (Busch *et al.*, 2013; Guster *et al.*, 2014).

Arbeiten von Balermipas *et al.* (Balermipas *et al.*, 2014, 2016) und retrospektive Analysen der Bonner Studie zur Wirkung von Cetuximab in HNSCC (Bonner *et al.*, 2010), zeigen, dass neben intrinsischen Faktoren in der Zelle auch immunvermittelte Effekte zu einem besseren therapeutischen Ansprechen beitragen und bes. für HPV+ HNSCC relevant sein können.

Zur genaueren Untersuchung immunvermittelter Effekte fehlen bisher transgene, orthotope Tiermodelle in denen solche Effekte wie auch das Tumorstroma *in vivo* analysiert werden können. Zudem werden Anstrengungen unternommen, die Anzahl der HPV+ HNSCC Tumorzelllinien durch Primärkulturen zu steigern, da die bisherige Gruppe aus sieben HPV+ HNSCC Zelllinien sehr klein ist, um statistisch valide Gruppenunterschiede gut detektieren zu können. Ziel sollte sein, aus *in vitro* Daten Gruppenunterschiede und mögliche Biomarker, in denen sich HPV+ und HPV- Tumoren unterscheiden, zu generieren, die dann in einer klinischen Studie verifiziert werden können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bessere Prognose HPV-assoziierter im Vergleich zu HPV-negativen HNSCC Tumore auch in einer höheren intrinsischen Sensibilität der Tumorzellen gegenüber einer cisplatinbasierten Radiochemotherapie begründet ist. Bedeutend hierfür scheint neben einer gestörten Zellzyklusregulation auch eine verminderte Expression der viralen Onkoproteine *E6* und *E7* zu sein, was zu einer vermehrten Rate apoptotischen Zelltods führt. Die Rolle des Tumorsuppressorproteins *p53* hierfür ist noch nicht abschließend geklärt und sollte weitergehend untersucht werden. Zudem scheinen gerade für HPV-positive Zelllinien kombinierte Effekte der Radio- und Cisplatintherapie relevant zu sein. Diese sollten auch bei der Diskussion der Änderung von Therapieschemata berücksichtigt werden. So scheint anhand dieser Arbeit eher eine Reduktion der Bestrahlungs- oder Cisplatinosis zielführend, anstatt Cisplatin im Therapieregime zu vermeiden. Zudem sollten weiterführende Untersuchungen die bereits identifizierten zelluläre Unterschiede mit neuen Therapeutika gezielt ausnutzen und mit der klassischen Radiochemotherapie kombinieren, um die Überlebensraten weiter zu steigern und die Nebenwirkungen für Patienten zu reduzieren, ohne die Effektivität der Therapie zu senken.

5 Literaturverzeichnis

- Abdulkarim, B.**, Sabri, S. and Deutsch, E. (2002) 'Antiviral agent Cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers', *Oncogene*, pp. 2334–2346. doi: 10.1038/sj/onc/1205006.
- Ang, K. K.**, Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P. and Gillison, M. L. (2010) 'Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer.', *The New England journal of medicine*. Massachusetts Medical Society, 363(1), pp. 24–35. doi: 10.1056/NEJMoa0912217.
- Arenz, A.**, Ziemann, F., Mayer, C., Wittig, A., Dreffke, K., Preising, S., Wagner, S., Klussmann, J.-P., Engenhart-Cabillic, R. and Wittekindt, C. (2014) 'Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis.', *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]*, pp. 1–8. doi: 10.1007/s00066-014-0605-5.
- Balermipas, P.**, Michel, Y., Wagenblast, J., Seitz, O., Weiss, C., Rödel, F., Rödel, C. and Fokas, E. (2014) 'Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer.', *British journal of cancer*, 110(2), pp. 501–9. doi: 10.1038/bjc.2013.640.
- Balermipas, P.**, Rödel, F., Rödel, C., Krause, M., Linge, A., Lohaus, F., Baumann, M., Tinhofer, I., Budach, V., Gkika, E., Stuschke, M., Avlar, M., Grosu, A. L., Abdollahi, A., Debus, J., Bayer, C., Stangl, S., Belka, C., Pigorsch, S., Multhoff, G., Combs, S. E., Mönnich, D., Zips, D. and Fokas, E. (2016) 'CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG)', *International Journal of Cancer*, 138(1), pp. 171–181. doi: 10.1002/ijc.29683.
- Ballo, H.**, Koldovsky, P., Hoffmann, T., Balz, V., Hildebrandt, B., Gerharz, C.-D. D. and Bier, H. (1999) 'Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model.', *Anticancer research*. GREECE, 19(5B), pp. 3827–3836.
- Blitzer, G. C.**, Smith, M. A., Harris, S. L. and Kimple, R. J. (2014) 'Review of the Clinical and Biologic Aspects of Human Papillomavirus-Positive Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck', *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*. Elsevier Inc., 88(4), pp. 761–770. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.08.029.
- Bol, V.** and Grégoire, V. (2014) 'Biological basis for increased sensitivity to radiation therapy in HPV-positive head and neck cancers.', *BioMed research international*, p. 696028. doi: 10.1155/2014/696028.

- Bonner, J. A.**, Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K. and Ang, K. K. (2006) 'Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck.', *The New England journal of medicine*. United States, 354(6), pp. 567–78. doi: 10.1056/NEJMoa053422.
- Bonner, J.**, Harari, P., Giralt, J. and Cohen, R. (2010) 'Cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash', *The Lancet Oncology*, pp. 21–28. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70311-0.
- Bosch, F. X.**, Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A. R., de Sanjose, S., Bruni, L., Tortolero-Luna, G., Kjaer, S. K. and Muñoz, N. (2008) 'Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia', *Vaccine*, 26, Supple, pp. K1–K16. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.064>.
- Bourhis, J.**, Sire, C., Graff, P., Grégoire, V., Maingon, P., Calais, G., Gery, B., Martin, L., Alfonsi, M., Desprez, P., Pignon, T., Bardet, E., Rives, M., Geoffrois, L., Daly-Schweitzer, N., Sen, S., Tuchais, C., Dupuis, O., Guerif, S., Lapeyre, M., Favrel, V., Hamoir, M., Lusinchi, A., Temam, S., Pinna, A., Tao, Y. G., Blanchard, P. and Aupérin, A. (2012) 'Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or without concomitant chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma', *The Lancet Oncology*, 13(2), pp. 145–153. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70346-1.
- Busch, C. J.**, Kriegs, M., Laban, S., Tribius, S., Knecht, R., Petersen, C., Dikomey, E. and Rieckmann, T. (2013) 'HPV-positive HNSCC cell lines but not primary human fibroblasts are radiosensitized by the inhibition of Chk1', *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 108, pp. 495–499. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.035.
- Butz, K.**, Geisen, C., Ullmann, a, Spitkovsky, D. and Hoppe-Seyler, F. (1996) 'Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7-oncogene expression and induction of apoptosis.', *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 68(4), pp. 506–13. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19961115)68:4<506::AID-IJC17>3.0.CO;2-2.
- Caicedo-Granados, E.**, Lin, R., Fujisawa, C., Yueh, B., Sangwan, V. and Saluja, A. (2014) 'Wild-type p53 reactivation by small-molecule Minnelide™ in human papillomavirus (HPV)-positive head and neck squamous cell carcinoma.', *Oral oncology*. Elsevier Ltd, 50(12), pp. 1149–1156. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.09.013.
- Caldon, C. E.**, Sergio, C. M., Burgess, A., Deans, A. J., Sutherland, R. L. and Musgrove, E. A. (2013) 'Cyclin E2 induces genomic instability by mechanisms distinct from cyclin E1.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. United States, 12(4), pp. 606–617. doi: 10.4161/cc.23512.

- Castro, F.**, Dirks, W. G., Fähnrich, S., Hotz-Wagenblatt, A., Pawlita, M. and Schmitt, M. (2013) 'High-throughput SNP-based authentication of human cell lines', *International Journal of Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 132(2), pp. 308–314. doi: 10.1002/ijc.27675.
- Cepeda, V.**, Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C. and Perez, J. M. (2007) 'Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity.', *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. Netherlands, 7(1), pp. 3–18.
- Chao, K. S. C.**, Majhail, N., Huang, C., Simpson, J. R., Perez, C. A., Haughey, B. and Spector, G. (2001) 'Intensity-modulated radiation therapy reduces late salivary toxicity without compromising tumor control in patients with oropharyngeal carcinoma: a comparison with conventional techniques', *Radiotherapy and Oncology*, 61(3), pp. 275–280. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8140\(01\)00449-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8140(01)00449-2).
- Chaturvedi, A. K.**, Engels, E. A., Anderson, W. F. and Gillison, M. L. (2008) 'Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States', *Journal of Clinical Oncology*. United States, 26(4), pp. 612–619. doi: 10.1200/JCO.2007.14.1713.
- Chung, C. H.** and Gillison, M. L. (2009) 'Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(22), pp. 6758–62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0784.
- Clifford, G. M.**, Gallus, S., Herrero, R., Munoz, N., Snijders, P. J. F., Vaccarella, S., Anh, P. T. H., Ferreccio, C., Hieu, N. T., Matos, E., Molano, M., Rajkumar, R., Ronco, G., De Sanjos, S., Shin, H. R., Sukvirach, S., Thomas, J. O., Tunsakul, S., Meijer, C. J. L. M. and Franceschi, S. (2005) 'Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: A pooled analysis', *The Lancet*, 366(9490), pp. 991–998. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67069-9.
- Cummings, B. S.**, Wills, L. P. and Schnellmann, R. G. (2004) 'Measurement of Cell Death in Mammalian Cells', *Curr Protoc Pharmacol*, 1(Lemasters 1999), pp. 1–30. doi: 10.1002/0471141755.ph1208s25.Measurement.
- D'Souza, G.**, Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H. and Gillison, M. L. (2007) 'Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer.', *The New England journal of medicine*. United States, 356(19), pp. 1944–1956. doi: 10.1056/NEJMoa065497.

- Das, L. C.**, Karrison, T. G., Witt, M. E., Muller, C., Stenson, K., Blair, E. a, Cohen, E. E. W., Seiwert, T. Y., Haraf, D. J. and Vokes, E. E. (2015) 'Comparison of outcomes of locoregionally advanced oropharyngeal and non-oropharyngeal squamous cell carcinoma over two decades.', *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 26(1), pp. 198–205. doi: 10.1093/annonc/mdu511.
- Desaintes, C.**, Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. and Thierry, F. (1997) 'Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis', *The EMBO Journal*, 16(3), p. 504 LP-514. Available at: <http://emboj.embopress.org/content/16/3/504.abstract>.
- Desaintes, C.**, Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M. and Thierry, F. (1999) 'Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells.', *Oncogene*, 18(32), pp. 4538–4545. doi: 10.1038/sj.onc.1202818.
- Dikomey, E.**, Borgmann, K., Köcher, S., Kriegs, M., Mansour, W. Y., Parplys, A. C., Rieckmann, T. and Rothkamm, K. (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 Therapy: Molecular Targets and Clinical Applications*. 2nd edn. Elsevier Science, pp. 330–352.
- Fojer, F.** and te Riele, H. (2006) 'Check, Double Check: The G2 Barrier to Cancer', *Cell Cycle*, 5(8), pp. 831–836. doi: 10.4161/cc.5.8.2687.
- Franken, N. A. P.**, Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. (2006) 'Clonogenic assay of cells in vitro.', *Nature protocols*, 1(5), pp. 2315–9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.
- Friedman, J. M.**, Stavas, M. J. and Cmelak, A. J. (2014) 'Clinical and scientific impact of human papillomavirus on head and neck cancer.', *World journal of clinical oncology*, 5(4), pp. 781–91. doi: 10.5306/wjco.v5.i4.781.
- Friedman, J.**, Nottingham, L., Duggal, P., Pernas, F. G., Yan, B., Yang, X. P., Chen, Z. and Van Waes, C. (2007) 'Deficient TP53 expression, function, and cisplatin sensitivity are restored by quinacrine in head and neck cancer.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(22 Pt 1), pp. 6568–78. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1591.
- Galluzzi, L.**, Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V, Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. a, Kumar, S., Lipton, S. a, Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H.-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. and Kroemer, G. (2012) 'Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.', *Cell death and differentiation*, 19(1), pp. 107–20. doi: 10.1038/cdd.2011.96.

- Gao, G.**, Chernock, R. D., Gay, H. A., Thorstad, W. L., Zhang, T. R., Wang, H., Ma, X.-J. J., Luo, Y., Lewis, J. S. and Wang, X. (2013) 'A novel RT-PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis', *International Journal of Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 132(4), pp. 882–890. doi: 10.1002/ijc.27739.
- Garnett, O. T.**, Duerksen-Hughes, J. P., Garnett, T. O. and Duerksen-Hughes, P. J. (2006) 'Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins', *Archives of Virology*, 151(12), pp. 2321–2335. doi: 10.1007/s00705-006-0821-0.
- Gillison, M. L.**, Castellsagué, X., Chaturvedi, A., Goodman, M. T., Snijders, P., Tommasino, M., Arbyn, M. and Franceschi, S. (2013) 'Comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix.', *International journal of cancer*. *Journal international du cancer*. doi: 10.1002/ijc.28201.
- Glenny, A.-M.**, Furness, S., Worthington, H. V, Conway, D. I., Oliver, R., Clarkson, J. E., Macluskey, M., Pavitt, S., Chan, K. K. W., Brocklehurst, P. and Panel, T. C. E. (2010) 'Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: radiotherapy', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, (12). doi: 10.1002/14651858.CD006387.pub2.
- Greene, F. L.**, Balch, C. M., Fleming, I. D., Fritz, A., Haller, D. G., Morrow, M. and Page, D. L. (2002) *AJCC Cancer Staging Handbook: TNM Classification of Malignant Tumors*. Springer New York (STAT!Ref electronic medical library). Available at: <https://books.google.de/books?id=0SP-gyH0-bMC>.
- Greenhalgh, T.** (1997) 'How to read a paper. Statistics for the non-statistician. II: "Significant" relations and their pitfalls.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 315, pp. 422–425. doi: 10.1136/bmj.315.7105.422.
- Grenman, R.**, Carey, T. E., McClatchey, K. D., Wagner, J. G., Pekkola-Heino, K., Schwartz, D. R., Wolf, G. T., Lacivita, L. P., Ho, L., Baker, S. R., Krause, C. J. and Lichter, A. S. (1991) 'In Vitro radiation resistance among cell lines established from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck', *Cancer*, 67(11), pp. 2471–2747.
- Gubanova, E.**, Brown, B., Ivanov, S. V, Helleday, T., Mills, G. B., Yarbrough, W. G. and Issaeva, N. (2012) 'Downregulation of SMG-1 in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma due to promoter hypermethylation correlates with improved survival.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(5), pp. 1257–67. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2058.
- Guster, J. D.**, Weissleder, S. V., Busch, C.-J., Kriegs, M., Petersen, C., Knecht, R., Dikomey, E. and Rieckmann, T. (2014) 'The inhibition of PARP but not EGFR results in the radiosensitization of HPV/p16-positive HNSCC cell lines.', *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. Ireland, 113(3), pp. 345–351. doi: 10.1016/j.radonc.2014.10.011.

- Haas Stefan J.-P.** (2005) Laborjournal online: Tricks - ECL-Blots hausgemacht, Laborjournal. Online. Available at: <http://www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick81.lasso> (Accessed: 13 September 2016).
- Hanahan, D.** and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation.', Cell. Elsevier Inc., 144(5), pp. 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hanahan, D.** and Weinberg, R. A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', Cell, 100(1), pp. 57–70. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- zur Hausen, H.** (1976) 'Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer', Cancer research, 36:794(2 Part 2), p. 794. Available at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/36/2_Part_2/794.short.
- zur Hausen, H.** (2002) 'Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.', Nature reviews. Cancer, 2(5), pp. 342–50. doi: 10.1038/nrc798.
- Hauswald, H.,** Simon, C., Hecht, S., Debus, J. and Lindel, K. (2011) 'Long-term outcome and patterns of failure in patients with advanced head and neck cancer.', Radiation oncology (London, England). BioMed Central Ltd, 6(1), p. 70. doi: 10.1186/1748-717X-6-70.
- Helleday, T.,** Lo, J., Gent, D. C. Van, Engelward, B. P. and van Gent, D. C. (2007) 'DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment.', DNA repair, 6(7), pp. 923–35. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.006.
- Hosseinpoor, A. R.** and AbouZahr, C. (2010) 'Graphical presentation of relative measures of association', The Lancet. Elsevier Ltd, 375(9722), p. 1254. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60541-7.
- Jemal, A.,** Bray, F., Ferlay, J., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) 'Global cancer statistics.', CA: a cancer journal for clinicians. United States, 61(2), pp. 69–90. doi: 10.3322/caac.20107.
- Kandoth, C.,** McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M. D. M., Miller, C. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J. and Ding, L. (2013) 'Mutational landscape and significance across 12 major cancer types', Nature. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 502(7471), pp. 333–339. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12634>.
- Kang, M. A.,** So, E.-Y. and Ouchi, T. (2012) 'Deregulation of DNA Damage Response Pathway by Intercellular Contact', Journal of Biological Chemistry , 287(20), pp. 16246–16255. doi: 10.1074/jbc.M111.337212.

- Keck, M. K.**, Zuo, Z., Khattri, A., Stricker, T. P., Brown, C., Imanguli, M., Rieke, D., Endhardt, K., Fang, P., Bragelmann, J., DeBoer, R., El Dinali, M., Aktolga, S., Lei, Z., Tan, P., Rozen, S. G., Salgia, R., Weichselbaum, R. R., Lingen, M. W., Story, M. D., Ang, K. K., Cohen, E. E., White, K. P., Vokes, E. E. and Seiwert, T. Y. (2014) 'Integrative analysis of Head and Neck Cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2481.
- Kimble, R. J.** and Harari, P. M. (2014) 'Is radiation dose reduction the right answer for HPV-positive head and neck cancer?', *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 50(6), pp. 560–564. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.09.015.
- Kimble, R. J.**, Harari, P. M., Torres, A. D., Yang, R. Z., Soriano, B. J., Yu, M., Armstrong, E. a., Blitzer, G. C., Smith, M. a, Lorenz, L. D., Lee, D., Yang, D. T., McCulloch, T. M., Hartig, G. K. and Lambert, P. F. (2013) 'Development and characterization of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma tumorgrafts.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(4), pp. 855–64. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2746.
- Kimble, R.**, Smith, M., Blitzer, G. and Torres, A. (2013) 'Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer', *Cancer research*, pp. 4791–4800. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0587.
- Knecht, R.**, Bussmann, L., Möckelmann, N. and Lörincz, B. B. (2016) 'Is (chemo)radiotherapy really the future standard in the treatment of oropharyngeal carcinoma?', *HNO*, 64(4), pp. 221–226. doi: 10.1007/s00106-016-0147-5.
- Kreimer, A. R.**, Clifford, G. M., Boyle, P. and Franceschi, S. (2005) 'Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review', *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* , 14(2), pp. 467–475. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.
- Kroemer, G.** (2009) 'Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell death 2009', *Cell death and differentiation*, 16(1), pp. 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.Classification.
- Lansford, C. D.**, Grenman, R., Bier, H., Somers, K. D., Kim, S. Y., Whiteside, T. L., Clayman, G. L., Welkoborsky, H.-J. and Carey, T. E. (2002) 'Head and Neck Cancers', in Masters, J. R. W. and Palsson, B. (eds) *Human Cell Culture: Cancer Cell Lines Part 2*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 185–255. doi: 10.1007/0-306-46861-1_12.
- Lawrence, M. S.**, Sougnez, C., Lichtenstein, L., Cibulskis, K., Lander, E., Gabriel, S. B., Getz, G., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Bowlby, R., Brooks, D., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Cheng, D., Chu, A., Dhalla, N., Guin, R., Holt, R. a., Jones, S. J. M., Lee, D., Li, H. I., Marra, M. a., Mayo, M., Moore, R. a., Mungall, A. J., Gordon Robertson, a., Schein, J. E., Sipahimalani, P., Tam, A., Thiessen, N., Wong, T., Protopopov, A., Santoso, N., Lee, S., Parfenov, M., Zhang, J., Mahadeshwar, H. S.,

Tang, J., Ren, X., Seth, S., Haseley, P., Zeng, D., Yang, L., Xu, A. W., Song, X., Pantazi, A., Bristow, C. a., Hadjipanayis, A., Seidman, J., Chin, L., Park, P. J., Kucherlapati, R., Akbani, R., Casasent, T., Liu, W., Lu, Y., Mills, G., Motter, T., Weinstein, J., Diao, L., Wang, J., Hong Fan, Y., Liu, J., Wang, K., Todd Auman, J., Balu, S., Bodenheimer, T., Buda, E., Neil Hayes, D., Hoadley, K. a., Hoyle, A. P., Jefferys, S. R., Jones, C. D., Kimes, P. K., Liu, Y., Marron, J. S., Meng, S., Mieczkowski, P. a., Mose, L. E., Parker, J. S., Perou, C. M., Prins, J. F., Roach, J., Shi, Y., Simons, J. V., Singh, D., Soloway, M. G., Tan, D., Veluvolu, U., Walter, V., Waring, S., Wilkerson, M. D., Wu, J., Zhao, N., Cherniack, A. D., Hammerman, P. S., Tward, A. D., Sekhar Pedamallu, C., Saksena, G., Jung, J., Ojesina, A. I., Carter, S. L., Zack, T. I., Schumacher, S. E., Beroukhim, R., Freeman, S. S., Meyerson, M., Cho, J., Chin, L., Getz, G., Noble, M. S., DiCara, D., Zhang, H., Heiman, D. I., Gehlenborg, N., Voet, D., Lin, P., Frazer, S., Stojanov, P., Liu, Y., Zou, L., Kim, J., Sougnez, C., Gabriel, S. B., Lawrence, M. S., Muzny, D., Doddapaneni, H., Kovar, C., Reid, J., Morton, D., Han, Y., Hale, W., Chao, H., Chang, K., Drummond, J. a., Gibbs, R. a., Kakkar, N., Wheeler, D., Xi, L., Ciriello, G., Ladanyi, M., Lee, W., Ramirez, R., Sander, C., Shen, R., Sinha, R., Weinhold, N., Taylor, B. S., Arman Aksoy, B., Dresdner, G., Gao, J., Gross, B., Jacobsen, A., Reva, B., Schultz, N., Onur Sumer, S., Sun, Y., Chan, T. a., Morris, L. G., Stuart, J., Benz, S., Ng, S., Benz, C., Yau, C., Baylin, S. B., Cope, L., Danilova, L., Herman, J. G., Bootwalla, M., Maglinte, D. T., Laird, P. W., Triche, T., Weisenberger, D. J., Van Den Berg, D. J., Agrawal, N., Bishop, J., Boutros, P. C., Bruce, J. P., Averett Byers, L., Califano, J., Carey, T. E., Chen, Z., Cheng, H., Chiosea, S. I., Cohen, E., Diergaarde, B., Marie Egloff, A., El-Naggar, A. K., Ferris, R. L., Frederick, M. J., Grandis, J. R., Guo, Y., Haddad, R. I., Hammerman, P. S., Harris, T., Neil Hayes, D., Hui, A. B. Y., Jack Lee, J., Lippman, S. M., Liu, F.-F., McHugh, J. B., Myers, J., Kwok Shing Ng, P., Perez-Ordonez, B., Pickering, C. R., Prystowsky, M., Romkes, M., Saleh, A. D., Sartor, M. a., Seethala, R., Seiwert, T. Y., Si, H., Tward, A. D., Van Waes, C., Waggott, D. M., Wiznerowicz, M., Yarbrough, W. G., Zhang, J., Zuo, Z., Burnett, K., Crain, D., Gardner, J., Lau, K., Mallery, D., Morris, S., Paulauskis, J., Penny, R., Shelton, C., Shelton, T., Sherman, M., Yena, P., Black, A. D., Bowen, J., Frick, J., Gastier-Foster, J. M., Harper, H. a., Leraas, K., Lichtenberg, T. M., Ramirez, N. C., Wise, L., Zmuda, E., Baboud, J., Jensen, M. a., Kahn, A. B., Pihl, T. D., Pot, D. a., Srinivasan, D., Walton, J. S., Wan, Y., Burton, R. a., Davidsen, T., Demchok, J. a., Eley, G., Ferguson, M. L., Mills Shaw, K. R., Ozenberger, B. a., Sheth, M., Sofia, H. J., Tamuzzer, R., Wang, Z., Yang, L., Claude Zenklusen, J., Saller, C., Tarvin, K., Chen, C., Bollag, R., Weinberger, P., Golusiński, W., Golusiński, P., Ibbs, M., Korski, K., Mackiewicz, A., Suchorska, W., Szybiak, B., Wiznerowicz, M., Burnett, K., Curley, E., Gardner, J., Mallery, D., Penny, R., Shelton, T., Yena, P., Beard, C., Mitchell, C., Sandusky, G., Agrawal, N., Ahn, J., Bishop, J., Califano, J., Khan, Z., Bruce, J. P., Hui, A. B. Y., Irish, J., Liu, F.-F., Perez-Ordonez, B., Waldron, J., Boutros, P. C.,

Waggott, D. M., Myers, J., William, W. N., Lippman, S. M., Egea, S., Gomez-Fernandez, C., Herbert, L., Bradford, C. R., Carey, T. E., Chepeha, D. B., Haddad, A. S., Jones, T. R., Komarck, C. M., Malakh, M., McHugh, J. B., Moyer, J. S., Nguyen, A., Peterson, L. a., Prince, M. E., Rozek, L. S., Sartor, M. a., Taylor, E. G., Walline, H. M., Wolf, G. T., Boice, L., Chera, B. S., Funkhouser, W. K., Gulley, M. L., Hackman, T. G., Neil Hayes, D., Hayward, M. C., Huang, M., Kimryn Rathmell, W., Salazar, A. H., Shockley, W. W., Shores, C. G., Thorne, L., Weissler, M. C., Wrenn, S., Zanation, A. M., Chiosea, S. I., Diergaarde, B., Marie Egloff, A., Ferris, R. L., Romkes, M., Seethala, R., Brown, B. T., Guo, Y., Pham, M. and Yarbrough, W. G. (2015) 'Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas', *Nature*, 517(7536), pp. 576–582. doi: 10.1038/nature14129.

Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. and Brakenhoff, R. H. (2011) 'The molecular biology of head and neck cancer.', *Nature reviews. Cancer*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 9–22. doi: 10.1038/nrc2982.

Leverrier, S., Bergamaschi, D., Ghali, L., Ola, A., Warnes, G., Akgül, B., Blight, K., García-Escudero, R., Penna, A., Eddaoudi, A. and Storey, A. (2007) 'Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria', *Apoptosis*, 12(3), pp. 549–560. doi: 10.1007/s10495-006-0004-1.

Li, C. and Johnson, D. E. (2013) 'Liberation of functional p53 by proteasome inhibition in human papilloma virus-positive head and neck squamous cell carcinoma cells promotes apoptosis and cell cycle arrest.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(6), pp. 923–34. doi: 10.4161/cc.23882.

Lieber, M. R. (2010) 'The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway', *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), pp. 181–211. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.

Lin, C. J., Grandis, J. R., Carey, T. E., Gollin, S. M., Whiteside, T. L., Koch, W. M., Ferris, R. L. and Lai, S. Y. (2007) 'Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection.', *Head & neck. United States*, 29(2), pp. 163–188. doi: 10.1002/hed.

Lindel, K., Burri, P., Studer, H. U., Altermatt, H. J., Greiner, R. H. and Gruber, G. (2005) 'Human papillomavirus status in advanced cervical cancer: predictive and prognostic significance for curative radiation treatment.', *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 15(2), pp. 278–84. doi: 10.1111/j.1525-1438.2005.15216.x.

Lindel, K., Rieken, S., Daffinger, S., Weber, K. J., Villiers, E. De and Debus, J. (2012) 'The transcriptional regulator gene E2 of the Human Papillomavirus (HPV) 16 influences the radiosensitivity of cervical keratinocytes', *Radiat Oncol*, pp. 1–8. doi: 10.1186/1748-717X-7-187.

- Lindel, K.**, de Villiers, E.-M., Burri, P., Studer, U., Altermatt, H. J., Greiner, R. H. and Gruber, G. (2006) 'Impact of viral E2-gene status on outcome after radiotherapy for patients with human papillomavirus 16-positive cancer of the uterine cervix.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 65(3), pp. 760–5. doi: 10.1016/j.ijrobp.2006.01.023.
- Long, J. S.** and Ryan, K. M. (2012) 'New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy', *Oncogene*. Macmillan Publishers Limited, 31(49), pp. 5045–5060. doi: 10.1038/onc.2012.7.
- Maddika, S.**, Ande, S. R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K. D., Wiechec, E. and Los, M. (2007) 'Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy.', *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 10(1–2), pp. 13–29. doi: 10.1016/j.drup.2007.01.003.
- Martens-de Kemp, S. R.**, Dalm, S. U., Wijnolts, F. M. J., Brink, A., Honeywell, R. J., Peters, G. J., Braakhuis, B. J. M. and Brakenhoff, R. H. (2013) 'DNA-Bound Platinum Is the Major Determinant of Cisplatin Sensitivity in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells.', *PloS one*, 8(4), p. e61555. doi: 10.1371/journal.pone.0061555.
- Martin, O. A.**, Ivashkevich, A., Choo, S., Woodbine, L., Jeggo, P. a., Martin, R. F. and Lobachevsky, P. (2013) 'Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity', *DNA Repair*. Elsevier B.V., 12(10), pp. 844–855. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.07.002.
- Martins, R. G.**, Parvathaneni, U., Bauman, J. E., Sharma, A. K., Raez, L. E., Papagikos, M. A., Yunus, F., Kurland, B. F., Eaton, K. D., Liao, J. J., Mendez, E., Futran, N., Wang, D. X., Chai, X., Wallace, S. G., Austin, M., Schmidt, R. and Hayes, D. N. (2013) 'Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: A randomized phase ii trial', *Journal of Clinical Oncology*, 31(11), pp. 1415–1421. doi: 10.1200/JCO.2012.46.3299.
- Mayer, C.** (2014) *Strahlenbiologische Charakterisierung humaner Oropharynx-Karzinom-Zelllinien*. phdthesis. Justus-Liebig-Universität. Available at: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2015/11481>.
- Mazumder, S.**, Plesca, D. and Almasan, A. (2007) 'A Jekyll and Hyde Role of Cyclin E in the Genotoxic Stress Response', *Cell Cycle*, 6(15), pp. 1437–1442.
- Mehanna, H.**, Beech, T., Nicholson, T., El-Hariry, I., McConkey, C., Paleri, V. and Roberts, S. (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*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 35(5), pp. 747–755. doi: 10.1002/hed.22015.

- Mesri, E. A.**, Feitelson, M. A. and Munger, K. (2014) 'Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis.', *Cell host & microbe*. Elsevier Inc., 15(3), pp. 266–282. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011.
- Van Monsjou, H. S.**, Balm, A. J. M., Van Den Brekel, M. M. and Wreesmann, V. B. (2010) 'Oropharyngeal squamous cell carcinoma: A unique disease on the rise?', *Oral Oncology*. England: Elsevier Ltd, 46(11), pp. 780–785. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.08.011.
- Moody, C. A.** and Laimins, L. a (2010) 'Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.', *Nature reviews. Cancer*. Nature Publishing Group, 10(8), pp. 550–60. doi: 10.1038/nrc2886.
- Nagel, R.**, Martens-de Kemp, S. R., Buijze, M., Jacobs, G., Braakhuis, B. J. M. and Brakenhoff, R. H. (2013) 'Treatment response of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines.', *Oral oncology*. Elsevier Ltd, 49(6), pp. 560–6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.03.446.
- Nguyen, C. L.** and Münger, K. (2008) 'Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes.', *Virology*, 380(1), pp. 21–5. doi: 10.1016/j.virol.2008.07.017.
- Noya, F.** and Chien, W. (2001) 'INTERACTIONS-p21cip1 Degradation in Differentiated Keratinocytes Is Abrogated by Costabilization with Cyclin E Induced by Human Papillomavirus E7', *Journal of virology*. doi: 10.1128/JVI.75.13.6121.
- O'Sullivan, B.**, Huang, S. H., Perez-Ordóñez, B., Massey, C., Siu, L. L., Weinreb, I., Hope, A., Kim, J., Bayley, A. J., Cummings, B., Ringash, J., Dawson, L. A., Cho, B. C. J., Chen, E., Irish, J., Gilbert, R. W., Hui, A., Liu, F.-F., Zhao, H., Waldron, J. N. and Xu, W. (2012) 'Outcomes of HPV-related oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy alone using altered fractionation.', *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. Ireland: Elsevier Ireland Ltd, 103(1), pp. 49–56. doi: 10.1016/j.radonc.2012.02.009.
- Olthof, N. C.**, Huebbers, C. U., Kolligs, J., Henfling, M., Ramaekers, F. C. S., Cornet, I., Van Lent-Albrechts, J. A., Stegmann, A. P. A., Silling, S., Wieland, U., Carey, T. E., Walline, H. M., Gollin, S. M., Hoffmann, T. K., De Winter, J., Kremer, B., Klussmann, J. P. and Speel, E. J. M. (2015) 'Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines', *International Journal of Cancer*, 136(5), pp. E207–E218. doi: 10.1002/ijc.29112.
- Park, J. W.**, Nickel, K. P., Torres, A. D., Lee, D., Lambert, P. F. and Kimple, R. J. (2014) 'Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein causes a delay in repair of DNA damage.', *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd. doi: 10.1016/j.radonc.2014.08.026.

- Vande Pol, S. B.** and Klingelhutz, A. J. (2013) 'Papillomavirus E6 oncoproteins.', *Virology*. Elsevier, 445(1–2), pp. 115–37. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026.
- Preiß, J.**, Dornoff, W., Hagmann, F. G. and Schmieder, A. (2010) *Taschenbuch Onkologie : interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011*. 15th edn. Zuckschwerdt Verlag.
- Puck, T. T.** and Marcus, P. I. (1956) 'Action of X-Rays on Mammalian Cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 103(5), pp. 653–666. doi: 10.1084/jem.103.5.653.
- Quon, H.** and Forastiere, A. A. (2013) 'Controversies in treatment deintensification of human papillomavirus-associated oropharyngeal carcinomas: should we, how should we, and for whom?', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(5), pp. 520–2. doi: 10.1200/JCO.2012.46.7746.
- Rautava, J.** and Syrjänen, S. (2012) 'Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis.', *Head and neck pathology*. Springer US, 6 Suppl 1(1), pp. S3-15. doi: 10.1007/s12105-012-0367-2.
- Reuschenbach, M.**, Huebbers, C. U., Prigge, E. S., Bermejo, J. L., Kalteis, M. S., Preuss, S. F., Seuthe, I. M. C., Kolligs, J., Speel, E. J. M., Olthof, N., Kremer, B., Wagner, S., Klusmann, J. P., Vinokurova, S. and Von Knebel Doeberitz, M. (2015) 'Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers', *Cancer*, 121(12), pp. 1966–1976. doi: 10.1002/cncr.29315.
- Rieckmann, T.**, Tribius, S., Grob, T. J., Meyer, F., Busch, C.-J., Petersen, C., Dikomey, E. and Kriegs, M. (2013) 'HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity.', *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.radonc.2013.03.013.
- Rieger, A. M.**, Hall, B. E., Luong, L. T., Schang, L. M. and Barreda, D. R. (2010) 'Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death', *Journal of Immunological Methods*, 358(1–2), pp. 81–92. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2010.03.019>.
- Robert-Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.** (2015) *Krebs in Deutschland 2011/2012*. doi: 10.17886/rkipubl-2015-004.
- de Roda Husman, A. M.**, Walboomers, J. M., van den Brule, a J., Meijer, C. J. and Snijders, P. J. (1995) 'The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR.', *The Journal of general virology*, 76 (Pt 4), pp. 1057–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9049358>.

- Roman, A.** and Munger, K. (2013) 'The papillomavirus E7 proteins', *Virology*. Elsevier, 445(1–2), pp. 138–168. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013.
- Ruutu, M.**, Peitsaro, P., Johansson, B. and Syrjänen, S. (2002) 'Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33–positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration', *International Journal of Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 100(3), pp. 318–326. doi: 10.1002/ijc.10455.
- Sak, A.** and Stuschke, M. (2010) 'Use of γ H2AX and Other Biomarkers of Double-Strand Breaks During Radiotherapy', *Seminars in Radiation Oncology*, 20(4), pp. 223–231. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semradonc.2010.05.004>.
- Sanjosé, S.**, Díaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G. and Bruni, L. (2007) 'Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical HPV in women with normal cytology', *PubMed*, 7(7), pp. 453–459. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597569>.
- Schwarz, E.**, Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., Hausen, H. zur and zur Hausen, H. (1985) 'Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells', *Nature*, 314(6006), pp. 111–114. doi: 10.1038/314111a0.
- Seiwert, T. Y.**, Salama, J. K. and Vokes, E. E. (2007) 'The chemoradiation paradigm in head and neck cancer', *Nat Clin Prac Oncol*. Nature Publishing Group, 4(3), pp. 156–171. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncponc0750>.
- Sethi, S.**, Ali-Fehmi, R., Franceschi, S., Struijk, L., van Doorn, L.-J., Quint, W., Albashiti, B., Ibrahim, M. and Kato, I. (2012) 'Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: a cancer registry-based study.', *International journal of cancer*. *Journal international du cancer*, 131(5), pp. 1179–86. doi: 10.1002/ijc.26500.
- Sheu, J. J.-C.**, Hua, C.-H., Wan, L., Lin, Y.-J., Lai, M.-T., Tseng, H.-C., Jinawath, N., Tsai, M.-H., Chang, N.-W., Lin, C.-F., Lin, C.-C., Hsieh, L.-J., Wang, T.-L., Shih, I.-M. and Tsai, F.-J. (2009) 'Functional Genomic Analysis Identified Epidermal Growth Factor Receptor Activation as the Most Common Genetic Event in Oral Squamous Cell Carcinoma', *Cancer Research*, 69(6), p. 2568 LP-2576. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/6/2568.abstract>.
- Spanos, W. C.**, Nowicki, P., Lee, D. W., Hoover, A., Hostager, B., Gupta, A., Anderson, M. E. and Lee, J. H. (2009) 'Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer.', *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 135(11), pp. 1137–46. doi: 10.1001/archoto.2009.159.
- Steenbergen, R.** and Hermsen, M. (1995) 'Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line', *Cancer research*, 55, pp. 5465–5471. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/55/22/5465.short> (Accessed: 9 October 2014).

- Stein, A. P.**, Swick, A. D., Smith, M. A., Blitzer, G. C., Yang, R. Z., Saha, S., Harari, P. M., Lambert, P. F., Liu, C. Z. and Kimple, R. J. (2015) 'Xenograft assessment of predictive biomarkers for standard head and neck cancer therapies.', *Cancer medicine*. United States, 4(5), pp. 699–712. doi: 10.1002/cam4.387.
- Stiewe, T.** (2007) 'The p53 family in differentiation and tumorigenesis', *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group, 7(3), pp. 165–167. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2072>.
- Stransky, N.**, Egloff, A. M., Tward, A. D., Kostic, A. D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Kryukov, G. V, Lawrence, M. S., Sougnez, C., McKenna, A., Shefler, E., Ramos, A. H., Stojanov, P., Carter, S. L., Voet, D., Cortés, M. L., Auclair, D., Berger, M. F., Saksena, G., Guiducci, C., Onofrio, R. C., Parkin, M., Romkes, M., Weissfeld, J. L., Seethala, R. R., Wang, L., Rangel-Escareño, C., Fernandez-Lopez, J. C., Hidalgo-Miranda, A., Melendez-Zajgla, J., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S. B., Meyerson, M., Lander, E. S., Getz, G., Golub, T. R., Garraway, L. a and Grandis, J. R. (2011) 'The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma.', *Science (New York, N.Y.)*, 333(6046), pp. 1157–60. doi: 10.1126/science.1208130.
- Struijk, L.**, van der Meijden, E., Kazem, S., ter Schegget, J., de Gruijl, F. R., Steenbergen, R. D. M. and Feltkamp, M. C. W. (2008) 'Specific betapapillomaviruses associated with squamous cell carcinoma of the skin inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes', *Journal of General Virology*, 89(9), pp. 2303–2314. doi: 10.1099/vir.0.83317-0.
- Syrjänen, K.**, Syrjänen, S. and Pyrhönen, S. (1982) 'Human Papilloma Virus (HPV) Antigens in Lesions of Laryngeal Squamous Cell Carcinomas', *ORL*, 44(6), pp. 323–334. Available at: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000275612>.
- Tang, A. L.**, Hauff, S. J., Owen, J. H., Graham, M. P., Czerwinski, M. J., Park, J. J., Walline, H., Papagerakis, S., Stoerker, J., McHugh, J. B., Chepeha, D. B., Bradford, C. R., Carey, T. E. and Prince, M. E. (2012) 'UM-SCC-104: a new human papillomavirus-16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line.', *Head & neck*. United States, 34(10), pp. 1480–1491. doi: 10.1002/HED.
- Thomas, M.** and Banks, L. (1998) 'Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6.', *Oncogene*, 17(23), pp. 2943–2954. doi: 10.1038/sj.onc.1202223.
- Thomas, M.** and Banks, L. (1999) 'Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types.', *Journal of General Virology*, 80(6), pp. 1513–1517. Available at: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-80-6-1513>.

- Tinhofer, I.**, Jöhrens, K., Keilholz, U., Kaufmann, a., Lehmann, a., Weichert, W., Stenzinger, a., Stromberger, C., Klinghammer, K., Becker, E.-T., Dommerich, S., Stölzel, K., Hofmann, V. M., Hildebrandt, B., Moser, L., Ervens, J., Böttcher, a., Albers, a., Stabenow, R., Reinecke, a., Budach, V., Hoffmeister, B. and Raguse, J. D. (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', *European Journal of Cancer*, 51(4), pp. 514–521. doi: 10.1016/j.ejca.2014.12.018.
- Tungteakkhun, S. S.**, Filippova, M., Fodor, N. and Duerksen-Hughes, P. J. (2009) 'The Full-Length Isoform of Human Papillomavirus 16 E6 and Its Splice Variant E6* Bind to Different Sites on the Procaspase 8 Death Effector Domain', *Journal of Virology*, 84(3), pp. 1453–1463. doi: 10.1128/JVI.01331-09.
- Urban, D.**, Corry, J. and Rischin, D. (2014) 'What is the best treatment for patients with human papillomavirus-positive and -negative oropharyngeal cancer?', *Cancer*, 120(10), pp. 1462–70. doi: 10.1002/cncr.28595.
- De Villiers, E.-M. M.**, Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U. U. and Zur Hausen, H. (2004) 'Classification of papillomaviruses', *Virology*, 324(1), pp. 17–27. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
- Wald, A. I.**, Hoskins, E. E., Wells, S. I., Ferris, R. L. and Khan, S. A. (2011) 'Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus.', *Head & neck. United States*, 33(4), pp. 504–512. doi: 10.1002/hed.21475.
- Wallace, N. A.**, Robinson, K., Howie, H. L. and Galloway, D. A. (2012) 'HPV 5 and 8 E6 Abrogate ATR Activity Resulting in Increased Persistence of UVB Induced DNA Damage', *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 8(7), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.ppat.1002807.
- Wallace, N. A.** and Galloway, D. a (2014) 'Manipulation of cellular DNA damage repair machinery facilitates propagation of human papillomaviruses.', *Seminars in cancer biology*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.12.003.
- Wang, D.** and Lippard, S. J. (2005) 'Cellular processing of platinum anticancer drugs', *Nat Rev Drug Discov*, 4(4), pp. 307–320. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1691>.
- Watson, J. V. J.**, Chambers, S. H. S. and Smith, P. P. J. (1987) 'A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak', *Cytometry*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 8(1), pp. 1–8. doi: 10.1002/cyto.990080101.
- Weinberg, R.** (2013) *The Biology of Cancer*, Second Edition. 2nd edn. Taylor & Francis Group.
- Weinstein, I. B.** (2002) 'Addiction to Oncogenes — the Achilles Heal of Cancer', *Science*, 297(July), pp. 63–64. doi: 10.1126/science.1073096.

- Weinstein, I. B.** and Joe, A. K. (2006) 'Mechanisms of Disease: oncogene addiction[mdash]a rationale for molecular targeting in cancer therapy', *Nat Clin Prac Oncol*. Nature Publishing Group, 3(8), pp. 448–457. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncponc0558>.
- White, J. S.**, Weissfeld, J. L., Ragin, C. C. R., Rossie, K. M., Martin, C. L., Shuster, M., Ishwad, C. S., Law, J. C., Myers, E. N., Johnson, J. T. and Gollin, S. M. (2007) 'The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines.', *Oral oncology*, 43(7), pp. 701–12. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.09.001.
- Wittekindt, C.**, Wagner, S., Mayer, C. S. and Klussmann, J. P. (2012) 'Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer.', *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*, 11, p. Doc09. doi: 10.3205/cto000091.
- Wolff, K.-D.**, Follmann, M. and Nast, A. (2012) 'The diagnosis and treatment of oral cavity cancer.', *Deutsches Ärzteblatt international*, 109(48), pp. 829–35. doi: 10.3238/arztebl.2012.0829.
- Woodward, W. A.** and Bristow, R. G. (2009) 'Radiosensitivity of cancer-initiating cells and normal stem cells (or what the Heisenberg uncertainly principle has to do with biology).', *Seminars in radiation oncology*. United States, 19(2), pp. 87–95. doi: 10.1016/j.semradonc.2008.11.003.
- Zhang, Y.**, Fan, S., Meng, Q., Ma, Y., Katiyar, P., Schlegel, R. and Rosen, E. M. (2005) 'BRCA1 Interaction with Human Papillomavirus Oncoproteins', *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), pp. 33165–33177. doi: 10.1074/jbc.M505124200.
- Zhao, N.**, Ang, M.-K., Yin, X.-Y., Patel, M. R., Fritchie, K., Thorne, L., Muldrew, K. L., Hayward, M. C., Sun, W., Wilkerson, M. D., Chera, B. S., Hackman, T., Zanation, a M., Grilley-Olson, J. E., Couch, M. E., Shockley, W. W., Weissler, M. C., Shores, C. G., Funkhouser, W. K., Olshan, a F. and Hayes, D. N. (2012) 'Different cellular p16(INK4a) localisation may signal different survival outcomes in head and neck cancer.', *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 107(3), pp. 482–90. doi: 10.1038/bjc.2012.264.
- Ziemann, F.**, Arenz, A., Preising, S., Wittekindt, C., Klussmann, J. P., Engenhardt-Cabillic, R. and Wittig, A. (2015) 'Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation +/- Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis.', *American journal of cancer research*. United States, 5(3), pp. 1017–1031.

Zubillaga-Guerrero, M. I., Illades-Aguilar, B., Leyva-Vazquez, M. A., Flores-Alfaro, E., Castañeda-Saucedo, E., Muñoz-Valle, J. F. and Alarcón-Romero, L. C. (2013) 'The integration of HR-HPV increases the expression of cyclins A and E in cytologies with and without low-grade lesions', *Journal of Cytology / Indian Academy of Cytologists*. India: Medknow Publications & Media Pvt Ltd, 30(1), pp. 1–7. doi: 10.4103/0970-9371.107504.

6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf- /Halsregion (HNSCC) stellen eine sehr häufige Tumorerkrankung dar. Man unterscheidet bei HNSCC Tumoren hinsichtlich ihrer Ätiologie zwischen Humanen Papillomavirus (HPV) assoziierten Tumoren und durch Noxen wie Nikotin und Alkohol induzierten Karzinomen. Während die Inzidenz für letztere eher stagniert, zeigt sich für HPV-assoziierte Tumore eine starke Zunahme der Inzidenz besonders in der westlichen Welt. Klinische Studien haben gezeigt, dass Patienten mit HPV-positiven Tumoren ein besseres Ansprechen unabhängig vom verwendeten Therapieregime aufweisen. Dies spiegelt sich auch in einem Gesamtüberleben von > 80 % wieder. Im Gegensatz dazu beträgt das Gesamtüberleben HPV-negativer HNSCC weniger als 50 %. Bislang wird in der Therapie beider Tumorentitäten jedoch nicht unterschieden. In fortgeschrittenen Stadien werden HNSCC Tumore mit einer definitiven oder adjuvanten Cisplatin basierten Radiochemotherapie behandelt. Derzeit rekrutieren einige Studien, die eine Deeskalation der Behandlung HPV-assoziiierter Tumore prüfen. Die biologischen Hintergründe für das bessere therapeutische Ansprechen HPV-assoziiierter Tumore sind jedoch nicht abschließend geklärt.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, intrinsische Ursachen für das bessere Ansprechen auf eine Radiochemotherapie *in vitro* zu analysieren. Hierfür wurden das klonogene Zellüberleben, die Zellzyklusprogression, die Proliferation, die Zellviabilität, die Expression von viralen Onko- und humanen Tumorsuppressorproteinen, Zelltod- und DNA-Reparaturmechanismen in vier HPV-negativen und vier HPV-positiven HNSCC Zelllinien nach Bestrahlung und Cisplatininkubation untersucht.

In Übereinstimmung mit klinischen Daten von HPV-positiven HNSCC Tumoren, ließ sich auch bei HPV-positiven Zelllinien eine signifikant größere Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung oder Cisplatin feststellen. Zudem ließen sich HPV-positive Zelllinien durch eine simultane Cisplatininkubation deutlich stärker radiosensibilisieren als HPV-negative HNSCC Zelllinien. Nach alleiniger Bestrahlung fand sich in HPV-positiven im Vergleich zu HPV-negativen Zelllinien ein ausgeprägter und prolongierter Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus. Es fanden sich keine Unterschiede im Gehalt an residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumorzelllinien. Allerdings zeigte sich besonders nach Cisplatininkubation in HPV-positiven Zelllinien einer Zunahme der Apoptose. Während es nach Bestrahlung zu einem Anstieg der viralen Onkoproteine E6 und E7 kam, führte eine Cisplatininkubation und die Kombination dieser mit Bestrahlung zu einer signifikant geringeren Expression beider Proteine. Es konnte jedoch keine Änderung der Expression des Tumorsuppressorproteins p53 festgestellt werden.

Somit scheinen Störungen der Zellzyklusregulation gemeinsam mit Änderungen der Expression der viralen Onkoproteine grundlegend für die höhere Sensibilität HPV-positiver Tumorzelllinien sowohl gegenüber Bestrahlung und Cisplatin alleine, als auch gegenüber einer kombinierten Radiochemotherapie zu sein. Es zeigt sich, dass kombinierte Effekte der Strahlen- und Cisplatintherapie gerade für HPV-positive HNSCC relevant sein können und bei der Planung zukünftiger Deeskalationsprotokolle zu berücksichtigen sind.

7 Summary

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) are divided into two distinct subgroups. One group is caused by classical risk factors like nicotine and alcohol, the other group is related to an infection with human papillomavirus (HPV). While the incidence for the first group is almost stable the latter one shows a dramatic increase. Clinical trials have shown that HPV-associated HNSCC have a better treatment response, regardless of treatment protocol, and have a favorable prognosis compared to HPV-negative HNSCC. Together with data from next-generation sequencing studies this led to the acceptance that HPV-associated and HPV-negative HNSCC are two biologically distinct etiologies. However, this did not lead to an HPV-adopted stratification for individualized treatment regimes. Today, both HPV-positive and HPV-negative HNSCC patients receive the same therapy that usually consist of definitive or adjuvant simultaneous Cisplatin based radiochemotherapy especially in advanced stage disease. While in ongoing clinical trials a de-escalation of the therapy for HPV-positive HNSCC is studied, the biological mechanisms causing this better response rates are still not fully understood.

This work aims at studying differences in HPV-positive and HPV-negative HNSCC cell lines that contribute to the improved treatment response of HPV-associated HNSCC. Therefore, the response of a panel of four HPV-positive and four HPV-negative cell lines to ionizing radiation and/or Cisplatin incubation was analyzed by measuring proliferation, cell viability, clonogenic survival, cell-cycle progression, expression of onco- and tumor suppressor-proteins, cell death and DNA-damage repair.

In concordance with clinical data, HPV-positive cell lines were sensitive to both ionizing radiation and Cisplatin incubation when compared with HPV-negative cell lines. In addition, in HPV-positive cell lines the radiosensitizing effect of Cisplatin was significantly stronger than in HPV-negative ones. HPV-positive cell lines exhibited a greater and prolonged cell-cycle arrest in G2-phase after irradiation alone and tended to arrest in S-phase after Cisplatin incubation. However, this was not reflected by a higher number of residual DNA double-strand breaks compared to HPV-negative cell lines. Instead, an increase in apoptosis mainly after Cisplatin incubation was found especially in HPV-positive cell lines. In line with this a decreased expression of both viral oncoproteins E6 and E7 was seen when cells were incubated with Cisplatin or a combination of Cisplatin and ionizing radiation. In contrast, irradiation alone led to an increase of both proteins. For tumor suppressor protein p53 no change in expression was found in all cell lines, regardless of treatment and HPV-status.

These data indicate that cell-cycle deregulation together with down-regulation of E6 and E7 leading to increased apoptosis facilitates the higher sensibility of HPV-positive cell lines to combined radio-chemotherapy. Thus, combined effects of radiotherapy and Cisplatin seem to promote the improved response rates of HPV-associated HNSCC. Therefore, adapting the dosage of radiation and Cisplatin might be a more promising strategy than restricting treatment to a single modality.

8 Anhang

8.1 Anhang A

Tabelle A 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Firmenname des Geräts	Firma , Sitz
Blotkammer	PerfectBlue™ 'Semi-Dry'- Elektroblotter	Peqlab Technologies GmbH, Erlangen
Chemilumineszenz- Imager	ChemoCam Imager 3.2	Intas Science Imaging, Instruments GmbH Göttingen
Durchflusszytometer	BD LSR II Flow Cytometer	BD Bioscience, Erembodegem, Belgien
Feinwaage	Scout® PRO	Ohaus Corporation, Nänikon, Schweiz
Gelkammer	PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin ExWS	Peqlab Technologies GmbH, Erlangen
Heizblock	Digital Heatblock	VWR International GmbH, Darmstadt
Inkubatoren	HERACell INCO2 153	Heraeus Holding GmbH, Hanau Mettler GmbH & Co.KG, Schwabach
Magnetrührer	MIX 1 eco	2Mag, München
Mikroskop	Inverted microscope CKX41 Motorised research inverted system microscope IX81	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Netzteil	peqPower 250	Peqlab Technologies GmbH, Erlangen
Plattenreader	Mithras LB 940 Microplate Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Bestrahlungsgeräte	1. Precise Supernova 6 MV Photonen Linear-beschleuniger (Dosisleistung 4 Gy/min)	Elekta Oncology Systems Ltd., Crawley, West Sussex, UK

Bestrahlungsgeräte (Fortsetzung)	2. X-RAD 320iX (Dosisleistung 1,2 Gy / min)	Precision X-ray, Inc. North Branford/CT, USA
Schüttler	Kompaktschüttler KM10	Edmund Bühler, Hechingen
Sterilbank	HERA Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortexer	VortexGenie2™	Scientific Industries Bohemia, NY, USA
Zentrifugen	Heraeus Fresco 21 Centrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Tabelle A 2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Plastik- und Glaswaren.

Plastik-/Glasware	Größe	Firma, Sitz
Deckgläschen	15 mm Durchmesser	Menzel GmbH, Braunschweig
Einmalspritzen	2 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Kanülen	0,8 x 40 mm	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Multi Flex Flat Tips	10 µl, 200 µl	Sorenson™ BioScience, Inc. Salt Lake City/UT, USA
Multiwell Platten	12-well, 24-well, 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	100 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SuperFrost®Plus Objektträger	25 x 75 x 1 mm	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen
Zellkulturschalen	8 cm ² , 21 cm ² , 58 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	16 cm	Sarstedt, Nümbrecht

Die Pipettenspitzen und die Reaktionsgefäße (0,5 – 2 ml) wurden vor Verwendung im Autoklaven dampfsterilisiert. Bei den sonstigen in der Zellkultur verwendeten Plastik- und Glaswaren handelte es sich um sterile Verbrauchsmaterialien zum Einmalgebrauch.

Tabelle A 3: *Alphabetische Auflistung der verwendeten Lösungen und Reagenzien.*

Lösung / Reagenz	Firma, Sitz
Accutase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), Acrylamid- Bisacrylamid-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (reinst)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (vergällt)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Fötales Rinder Serum (FBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Gentamycin	PAA, GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA
Stabiles Glutamin	PAA, GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol/ 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octan (DABCO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,

	Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA, GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA
NP-40	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rinderalbumin (BSA)	PAA, GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA
RNaseA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Roswell-Park Memorial Institute (RPMI) 1640 - Zellkulturmedium	PAA, GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris-HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris hydroxymethyl-aminomethan (Tris)-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton-x 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin (1 x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Milchpulver	Fluka Analytical, Buchs, SG, Schweiz

Tabelle A 4: Alphabetische Auflistung der verwendeten Software und Internetseiten.

Software	Firmenname der Software	Firma, Sitz
Datenauswertung und -darstellung	GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Dokumentation	Microsoft Office 2011	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Literaturrecherche	pubmed	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Literaturverwaltung	Mendeley Desktop 1.11	Mendeley Ltd., London, Großbritannien

8.1 Anhang B

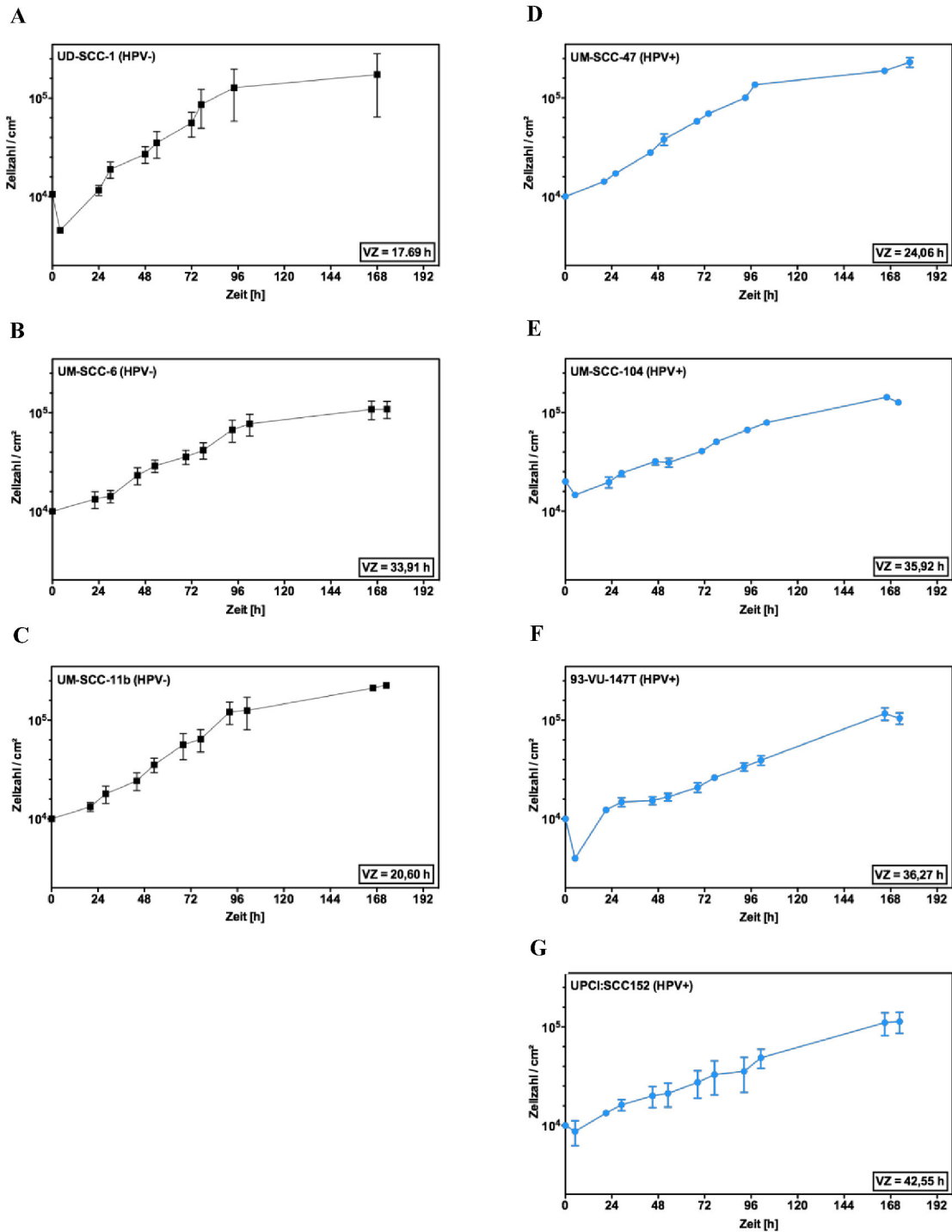


Abbildung A 1: Wachstumskurven aller verwendeten HPV- (A:UD-SCC-1,B:UM-SCC-6,C: UM-SCC-11b) und HPV+ (D: UM-SCC-47,E: UM-SCC-104,F: 3-VU147T,G: UPCI:SCC-152) Zelllinien über einen Zeitraum von 7 Tagen. Ein Mediumwechsel wurde nach 72 h durchgeführt. Die Verdopplungszeit (VZ) ist für jede Zelllinie angegeben.

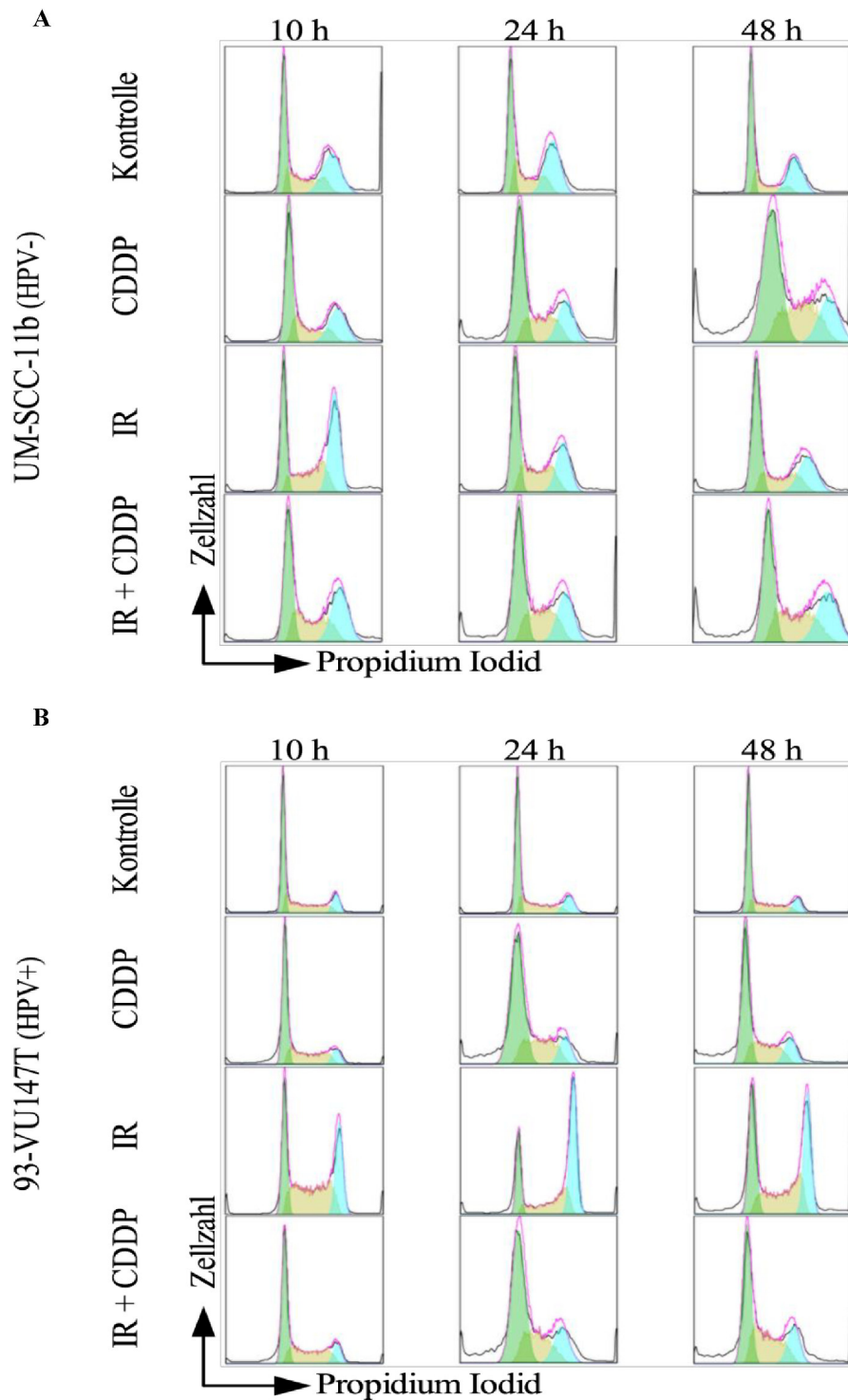


Abbildung A 2: Exemplarische Darstellung der Zellzyklusanalyse als Histogramm in einer HPV- (UM-SCC-11b, A) und einer HPV+ (93-VU147T, B) Zelllinie. Dargestellt sind jeweils die Kontrolle und die Behandlungen mit Bestrahlung (IR), Cisplatin (CDDP) und einer Kombination aus beiden (IR + CDDP) zu den Zeitpunkten 10, 24 und 48 h. Die einzelnen Zellzyklusphasen sind wie folgt markiert: G1 Phase = grün; S Phase = gelb; G2/M Phase = blau; subG1-Phase = weiß (vor G1 Phase).

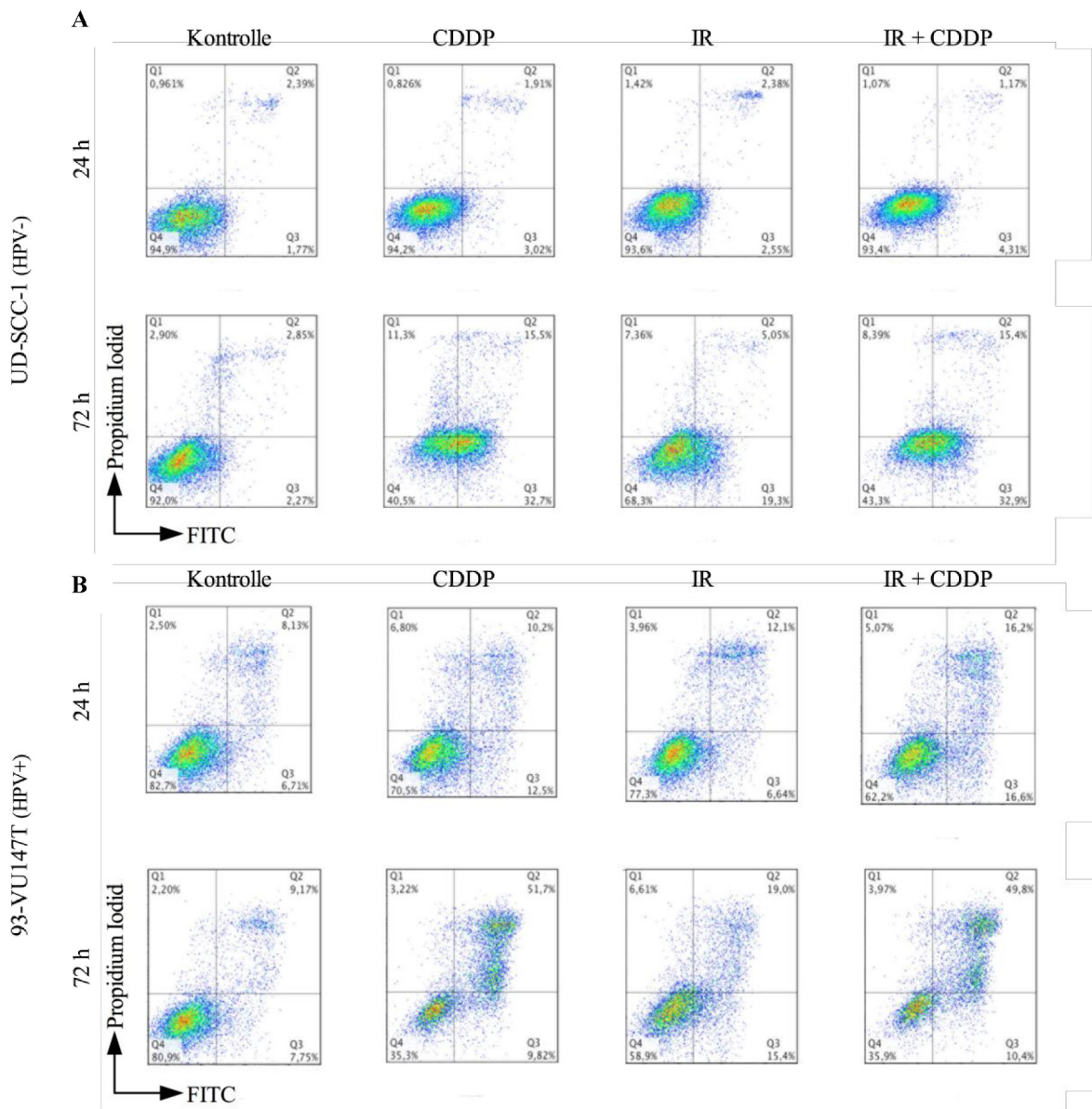


Abbildung A 3: Exemplarische Darstellung des Gatings der Annexin V-FITC und PI Färbung in einer HPV- (UD-SCC-1, A) und einer HPV+ (93-VU147T, B) Zelllinie: Kontrolle (links) und 24 h nach 10 µM Cisplatin (Mitte links) 6 Gy Bestrahlung (Mitte rechts), Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung (rechts). Dargestellt ist die gesamte Zellpopulation als Dotplot nach Ausschluss von Zelldebris. Durch setzen des Gates wurde die Zellpopulation in vier Quadranten eingeteilt. Q1 = PI positive; Q2 = Annexin V-FITC & PI positive (späte Apoptose); Q3 = Annexin V-FITC positiver (frühe Apoptose); Q4 = Annexin V-FITC & PI negative (lebende Zellen).

8.2 Curriculum Vitae

Die Seite 106 (Curriculum Vitae) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

8.3 Publikationen

Originalarbeiten

F. Ziemann, A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; Increased sensitivity of HPV-related head and neck cancer cell lines to x-irradiation ± Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis; Am J Cancer Res, Feb 2015 15;5(3):1017-3

A. Arenz, **F. Ziemann**, C. Mayer, A. Wittig, K. Dreffke, S. Preising, S. Wagner, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, C. Wittekindt; Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis; Strahlenther Onkol 2014; Sep;190(9):839-46; (DOI 10.1007/s00066-014-0605-5)

Kongressbeiträge

Frank Ziemann, Philip Terhorst, Stefanie Preising, Steve Seltzsaam, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Jens-Peter Klussmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig; CDK-Inhibition führt in HPV-negativen HNSCC durch Hemmung der homologen Rekombination zur Radiosensibilisierung. Strahlenther Onkol. 2016 Jun;192 Suppl 1:1-161. doi: 10.1007/s00066-016-0974-z. (Vortrag bei der 22. Jahrestagung der DEGRO, Mannheim 2016)

Steve Seltzsaam, **Frank Ziemann**, Stefanie Preising, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Jens-Peter Klussmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig; Führt Bortezomib in HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zu einer Strahlensensibilisierung? (Poster bei der 22. Jahrestagung der DEGRO, Mannheim 2016)

Viola Balzer, Andrea Arenz, Stefanie Preising, **Frank Ziemann**, Jens-Peter Klussmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig; Deutliche Strahlensensibilisierung von HNSCC-Zelllinien durch den dualen PI3K/mTOR/Akt Inhibitor NVP-BEZ235 verursacht durch Hemmung der Doppelstrangbruchreparatur. (Poster bei der 22. Jahrestagung der DEGRO, Mannheim 2016)

Frank Ziemann, Philip Terhorst, Stefanie Preising, Steve Seltzsaam, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Jens-Peter Klussmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig; Targeting CDKs sensitizes HPV-negative HNSCC cell lines to radiation by inhibition of homologous recombination repair. (Poster beim 25. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie“, Dresden 2016)

Andrea Arenz, Viola Balzer, Stefanie Preising, **Frank Ziemann**, Jens-Peter Klussmann, 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. (Poster beim 25. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie“, Dresden 2016)

F. Ziemann, A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; Bestrahlung ± Cisplatin verändern die Expression der Onkoproteine E6 und E7 und steigern die Apoptoserate HPV+ HNSCC Zellen – Gründe für eine erhöhte Therapiesensibilität; (Poster beim 24. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie“, Hamburg 2015)

F. Ziemann, A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; HPV positive HNSCC cell lines show an enhanced sensitivity to radio- and chemotherapy compared to HPV negative cells due to down-regulation of the oncogenes E6 and E7 and enhanced apoptosis; DGHO 2014 (Poster bei der Jahrestagung der DGHO, Hamburg, 2014)

F. Ziemann, A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; HPV positive HNSCC Zellen zeigen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Bestrahlung ± Cisplatin durch eine verminderte Expression der Onkoproteine E6 und E7 und gesteigerte Apoptose. Strahlenther Onkol 2014; [Suppl 1]: 190:1–16; DOI 10.1007/s00066-014-0677-2; (Vortrag bei der 20. Jahrestagung der DEGRO 2014, Düsseldorf)

F. Ziemann, A. Arenz, J. Dahm-Daphi, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; HPV positive HNSCC Zellen zeigen eine erhöhte zelluläre Strahlensensitivität und einen verstärkten Zellzyklusarrest aber keine erhöhte Cis-Platin-Sensitivität gegenüber HPV negativen Zellen. Strahlenther Onkol 2012; V03-5; S1 188:3- 178; DOI 10.1007/s00066-012-0109-0 (Vortrag bei der 18. Jahrestagung der DEGRO 2012, Wiesbaden)

8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg, denen ich an dieser Stelle herzlich danke.

Vorklinischer Studienabschnitt:

Basler, Bauer, Bette, Braun, Brehm, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Grundmann, Koolman, Lill, Löffler, Luers, Milani, Mueller, Neumüller, Oliver, Preisig-Müller, Röhm, Schütz, Seitz, Steiniger, Stiewe, Suske, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Bien, Bohlander, Burchert, Czubayko, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Gress, Grimm, Grosse, Grzeschik, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jaques, Kann, Kill, Kircher, Klose, Kohler, Köhler, Kolb-Niemann, König, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Mossdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Plant, Renz, Rierra-Knorrenschild, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schofer, Seifert, Sekundo, Sesterhenn, Sommer, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wittig, Wulf, Zemlin,

8.5 Danksagung

Durchhaltevermögen ist nicht allein Ausschlaggebend für das Erreichen unserer Ziele. Es sind die Menschen, auf die wir auf unserem Weg treffen und mit denen wir wachsen. Diese Menschen sind die Quintessenz für ein erfolgreiches Ankommen.

Den Menschen, die mich auf dieser Reise begleitet haben und mich bis zum Ziel unterstützt haben möchte ich hier danken.

Zunächst danke ich Frau Prof. Dr. A. Wittig für die Möglichkeit, dieses spannende Thema unter ihrer Anleitung zu bearbeiten. Für ihre Hilfe beim Erstellen aller Publikationen und für die gute wissenschaftliche Betreuung, sowie die stetige Förderung, die mir ermöglichte, meine Arbeiten auf nationalen Kongressen zu präsentieren und hierdurch immer wieder neue Impulse zu bekommen, möchte ich Frau Prof. Wittig in besonderem Maße danken.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic danken, dass sie mir als Direktorin der Klinik für Strahlentherapie ermöglicht hat, die Arbeiten in ihrem Labor durchzuführen und mich ebenfalls während der Anfertigung der Arbeit und auch in meiner späteren Tätigkeit in ihrem Labor unterstützt hat.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. A. Arenz für die wissenschaftliche Betreuung im Labor der Klinik für Strahlentherapie.

Zudem möchte ich allen Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. J. P. Klussmann aus unserem Kooperationslabor der Klinik für Hals-Nasen und Ohrenheilkunde der Justus-Liebig Universität in Gießen für die Zusammenarbeit, im Besonderen für die Beschaffung der Zelllinien danken. Namentlich seien hier Frau Dr. C. Mayer und Frau M. Roth erwähnt, die beide sehr produktiv mit mir zusammen gearbeitet haben.

Weiterhin möchte den Mitarbeitern des Labors für Strahlenbiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Dahm-Daphi meinen Dank aussprechen. Im Besonderen gilt mein Dank hier Frau Dr. K. Dreffke und Frau Dr. S. Köcher. Beide haben mir bei der Auswertung der Daten und der kritischen Analyse dieser immer gute Ratschläge gegeben.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. E. Dikomey Gastprofessor in der Klinik für Strahlentherapie in Marburg. Er hat mich im Rahmen meiner wissenschaftlichen Tätigkeit auch über diese Arbeit hinaus stets zum kritischen Denken angeregt und mir so tiefere Einblicke in die Strahlenbiologie ermöglicht. Zudem habe ich viele Möglichkeiten der Darstellung und Auswertung von ihm lernen können.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie in Marburg und im speziellen der Abteilung für medizinische Physik unter Leitung von Prof. Dr. K. Zink für die Dosimetrie zu den Bestrahlungsexperimenten und die gemeinsame Durchführung der Bestrahlungen innerhalb der Klinik für Strahlentherapie.

Ebenso möchte ich der Arbeitsgruppe iLung unter Leitung von Prof. Dr. B. Schmeck dafür danken, dass es mir ermöglicht wurde Geräte der Arbeitsgruppe für meine Analysen mit zu verwenden.

Schließlich gilt ein sehr großer Dank Frau S. Preising aus dem Labor von Frau Prof. Engenhardt-Cabillic. Von ihr konnte ich eine Menge praktischer Fertigkeiten lernen und sehr gut mit ihr zusammen arbeiten.

Zu großer Dankbarkeit bin ich meinen Eltern und meinem Bruder verpflichtet, die mich immer unterstützt haben und mir meine Ausbildung und mein Studium ermöglicht haben.

Außerdem möchte ich meiner Freundin Maria A. Solovey danken, die mich in der doch manchmal langwierigen Zeit der Promotion unterstützt hat und mit der ich die Texte und Abbildungen auch Daheim kritisch diskutieren konnte.

Abschließend danke ich allen anderen, die mich während meiner Zeit im Labor der Klinik für Strahlentherapie begleitet haben und die hier nicht persönlich genannt werden. Die Zeit war insgesamt sehr lehrreich und produktiv und hat mich in meinem Forschungsdrang bestärkt.

8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*In vitro Charakterisierung zellulärer Ursachen für das unterschiedliche Ansprechen HPV-assoziiertes und Noxen-induzierter Plattenepithelkarzinome der Kopf- Halsregion nach kombinierter Radiochemotherapie*“ in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. A. Wittig mit Unterstützung durch Frau Dr. A. Arenz 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.

Die Nachfolgenden Publikationen und Kongressbeiträge sind aus Daten der vorliegenden Dissertation entstanden.

Publikationen:

F. Ziemann, A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; Increased sensitivity of HPV-related head and neck cancer cell lines to x-irradiation ± Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis; Am J Cancer Res, Feb 2015 15;5(3):1017-3

A. Arenz, **F. Ziemann**, C. Mayer, A. Wittig, K. Dreffke, S. Preising, S. Wagner, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, C. Wittekindt; Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis; Strahlenther Onkol 2014; Sep;190(9):839-46; (DOI 10.1007/s00066-014-0605-5)

Kongressbeiträge:

F. Ziemann, A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; Bestrahlung ± Cisplatin verändern die Expression der Onkoproteine E6 und E7 und steigern die Apoptoserate HPV+ HNSCC Zellen – Gründe für eine erhöhte Therapiesensibilität. (Poster beim 24. Symposium Experimentelle Strahlentherapie, Hamburg 2015)

F. Ziemann, A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; HPV positive HNSCC cell lines show an enhanced sensitivity to radio- and chemotherapy compared to HPV negative cells due to down-regulation of the oncogenes E6 and E7 and enhanced apoptosis. DGHO 2014; (Posterpräsentation bei der Jahrestagung der DGHO, Hamburg, 2014)

F. Ziemann, A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J.P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; HPV positive HNSCC Zellen zeigen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Bestrahlung ± Cisplatin durch eine verminderte Expression der Onkoproteine E6 und E7 und gesteigerte Apoptose. Strahlenther Onkol 2014; [Suppl 1]: 190:1–16; DOI 10.1007/s00066-014-0677-2 (Vortrag bei der 20. Jahrestagung der DEGRO 2014, Düsseldorf)

F. Ziemann, A. Arenz, J. Dahm-Daphi, R. Engenhardt-Cabillic, A. Wittig; HPV positive HNSCC Zellen zeigen eine erhöhte zelluläre Strahlensensitivität und einen verstärkten Zellzyklusarrest aber keine erhöhte Cis-Platin-Sensitivität gegenüber HPV negativen Zellen. Strahlenther Onkol 2012; V03-5; S1 188:3- 178; DOI 10.1007/s00066-012-0109-0 (Vortrag bei der 18. Jahrestagung der DEGRO 2012, Wiesbaden)

Ort, Datum, Unterschrift

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen, die Angebote der Philipps-Universität zur Plagiatserkennung (Plagiatsoftware zu beziehen über das Hochschulrechenzentrum) sind mir bekannt.

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer