

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

**Bedeutung des Tumorstammzellfaktors CD44v6
für die Wirkung von Photonen und ^{12}C -Ionen
bei Kopf-Hals-Tumorzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Maximilian Basil Al-Bazaz
aus Dortmund

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
02.11.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Frau Prof. Dr. Hilfiker-Kleiner
Referent:	Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. A. Teymoortash

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Tabellen im Anhang	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	10
1.1 Kopf-Hals Tumoren	10
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	10
1.1.2 Therapie des HNSCC	11
1.2 Strahlenbiologische und molekularbiologische Grundlagen	12
1.2.1 DNA-Schadensreparatur	13
1.2.2 Zellzyklusregulation	14
1.2.3 ¹² C-Ionenbestrahlung	16
1.3 Stammzellen und Tumorstammzellen	18
1.3.1 Charakteristika von Tumorstammzellen	18
1.3.2 Tumorstammzellmarker CD44v6	18
1.3.3 Prognose	21
1.4 Hintergründe und Fragestellung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 HNSCC Zelllinien UPCISCC040 und UPCISCC131	24
2.1.1 Kultivierung der Zellen	25
2.1.2 Zellverdopplung	25
2.2 Knockdown von CD44v6	25
2.3 Stabile Transfektion von CD44v3-10	26
2.4 Western Blot	27
2.5 Koloniebildungstest	30
2.5.1 Photonenbestrahlung	31
2.5.2 ¹² C-Ionenbestrahlung	31
2.6 Zellzyklusanalyse	32
2.7 Zellzyklussynchronisation	33
2.8 Behandlung mit Olaparib	35
2.9 DNA-Doppelstrangbrüche	35
3 Ergebnisse	37

3.1 Einfluss von CD44v6 auf das Zellwachstum.....	37
3.2 Etablierung der Zelllinien für die weiteren Versuche.....	39
3.2.1 Zelllinie mit reduzierter Expression von CD44v6	39
3.2.2 Zelllinie mit Überexpression von CD44v3-10.....	40
3.3 Einfluss von CD44v6 auf die Zellzyklusregulation nach Bestrahlung	41
3.4 Einfluss eines KD von CD44v6 auf die Strahlenempfindlichkeit	43
3.5 Einfluss einer CD44v3-10-Überexpression auf die Strahlenempfindlichkeit	44
3.6 Einfluss des KD von CD44v6 in Abhängigkeit vom Zellzyklus.....	45
3.7 Wirkung von Olaparib in Kombination mit CD44v6 KD.....	48
3.8 Einfluss von CD44v6 auf Zellüberleben nach ¹² C-Ionenbestrahlung.....	50
4 Diskussion	52
4.1 Einfluss von CD44v6 und CD44v3-10 auf die Proliferation	52
4.2 Bedeutung von CD44v6 auf die Zellzyklusregulation nach Bestrahlung	53
4.3 Bedeutung von CD44v6 für die Strahlenempfindlichkeit.....	54
4.4 Einfluss von CD44v6 auf die DSB-Reparatur	56
4.5 CD44v6 als Biomarker	56
4.6 Fazit	57
5 Zusammenfassung.....	58
6 Summary	59
7 Literaturverzeichnis	60
8 Anhang	71
8.1 Alphabetische Auflistungen der Chemikalien und Reagenzien, Materialien, Geräte und Software.....	71
8.2 Ergänzende Abbildungen und Informationen.....	75
8.3 Sonstiges	78
8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	79
8.5 Danksagungen.....	80
8.6 Curriculum Vitae	81
8.7 Ehrenwörtliche Erklärung.....	81

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Tiefendosisprofil für 18 MeV Photonen und ¹² C-Ionen.....	17
Abb. 2: Gen- und Proteinstruktur von CD44.....	19
Abb. 3: Bedeutung von CD44v3-10 für die Prognose des HNSCC.....	23
Abb. 4: Zellzyklusanalyse	33
Abb. 5: Zellzyklussynchronisation von UPCI:SCC040 Zellen durch doppelten Thymidinblock.	34
Abb. 6: Einfluss von CD44v6 auf das Zellwachstum.....	38
Abb. 7: Reduktion von CD44v6.....	39
Abb. 8: Überexpression von CD44v6.....	41
Abb. 9: Wirkung von CD44v6 auf die Zellzyklusregulation nach Bestrahlung. .	42
Abb. 10: Wirkung unterdrückter CD44v6 Expression auf die Strahlenempfindlichkeit.....	44
Abb. 11: Wirkung einer CD44v6 Überexpression auf die Strahlenempfindlichkeit.....	45
Abb. 12: Wirkung des CD44v6 KD auf die Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit vom Zellzyklus.....	47
Abb. 13: Wirkung von Olaparib in Kombination mit KD von CD44v6.....	49
Abb. 14: Einfluss von CD44v6 auf das Zellüberleben nach ¹² C- Ionenbestrahlung.....	51
Abb. 15: Knockdown von CD44v6 in UPCI:SCC040-Zellen.....	75
Abb. 16: Überexpression von CD44v6 in UPCI:SCC131-Zellen.....	75
Abb. 17: Häufigkeitsverteilung der γ H2AX/53BP1 Foci in unbestrahlten Zellen.	76
Abb. 18: Plasmidkarte von CD44v3-10.....	76

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Charakteristika der verwendeten HNSCC Zelllinien.	24
Tab. 2: Transfektionsmedium für KD	26
Tab. 3: Zusammensetzung des Lysepuffers	28
Tab. 4: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.....	28
Tab. 5: Zusammensetzung der Western Blot Reagenzien	30
Tab. 6: Primäre und sekundäre Antikörper	30
Tab. 7: Zellzahlen für Kolonietest.....	31
Tab. 8: Färbepuffer für die Durchflusszytometrie.....	32
Tab. 9: Reagenzien für den Nachweis der γ H2AX/53BP1 Foci.....	36
Tab. 10: Einfluss von CD44v6 auf die Zellverdopplung	39
Tab. 11: Strahlensensibilisierung durch Olaparib	50

Tabellen im Anhang

Tab. A1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	71
Tab. A2: Auflistung der verwendeten Materialien	72
Tab. A3: Auflistung der verwendeten Geräte	73
Tab. A4: Auflistung der verwendeten Software.....	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

12C	¹² C-Kohlenstoffionen (Carbonions)
AB	Antibiotika
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
B-NHEJ	backup Nicht-Homologe Endverknüpfung
BSA	Bovines Serum Albumin
C-NHEJ	klassische Nicht-Homologe Endverknüpfung
Cdc25c	cell division cycle protein 25c
CDK	Cycline dependent kinase
Chk1 / 2	Checkpoint-Kinasen
CIC / CSC	Cancer initiating Cell / Cancer Stem Cell
D50	Dosis, bei der die SF 50% beträgt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA Damage Response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
DVF	Dosisverstärkungsfaktor
E2F1	Retinoblastoma-Associated Protein 1
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Erdbeschleunigung
GADD45A	Growth arrest and DNA damage-inducible, alpha
GFP	Green Fluorescent Protein
Gy	Gray
H2AX	Histon H2AX
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humane Pappilomaviren
HR	Homologe Rekombination
IMRT	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
KD	Knockdown
LET	Linearer Energietransfer
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MRN	Proteinkomplex aus Mre11, Rad50 and Nbs1
NHEJ	Nicht-Homologe Endverknüpfung
P/S	Penicillin/Streptomycin
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung
PD-1 / PD-L1	Programmed cell death protein / ligand
PE	Plattierungseffizienz
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PIC	Proteaseinhibitoren Cocktail 5 Mamm/Cell
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastom-Protein
RBE	relative biological effectiveness
ROS	Reaktive Sauerstoff (oxygen) Spezies
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Überlebensfraktion
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SOBP	Spread Out Bragg Peak
SSB	Einzelstrangbruch (single strand break)
ssDNA	Einzelsträngige (single-stranded) Desoxyribonucleinsäure
T N M	Primärtumor Lymphknoten Metastasen
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Trypsin/EDTA	Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure
VM	Vollmedium
Vs	versus

1 EINLEITUNG

1.1 Kopf-Hals Tumoren

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, welche histologisch zu circa 90% den Plattenepithelkarzinomen zuzuordnen sind (auch Head and neck squamous cell carcinoma genannt, HNSCC), zählen zu den sechst häufigsten Krebserkrankungen weltweit (Kreimer et al., 2005; Bray et al., 2018). Diese Tumoren entstehen aus dem Epithel des oberen Aerodigestivtrakts, vor allem in der Mundhöhle, dem Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und dem Larynx (Vigneswaran und Williams, 2014). Symptome dieser Tumorerkrankungen sind eher unspezifisch. Je nach Lokalisation kann es zu Schluckbeschwerden, Heiserkeit, Foetor ex ore, Dysphagie, Dyspnoe, behinderter Nasenatmung, eingeschränkter Zungenbeweglichkeit, kloßige Sprache bis hin zu Hirnnervenausfällen kommen (Lenarz und Boenninghaus, 2012; Reiß, 2021). Die Beschwerdesymptomatik zeigt sich oftmals erst im späteren Krankheitsverlauf, weswegen die Tumoren häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden (Lenarz und Boenninghaus, 2012).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Laut dem Bericht „Krebs in Deutschland für 2017/2018“ des Zentrums für Krebsregisterdaten beim Robert-Koch-Institut erkrankten im Jahr 2018 rund 4.490 Frauen und 9.820 Männer an Kopf-Hals Tumoren und rund 1.442 Frauen und 3.970 Männer verstarben an den Folgen der Krebserkrankung. Für Frauen zeigte sich zwischen 2003 und 2013 ein leicht positiver Trend von 1,3% an Neuerkrankungen, wobei diese in den letzten Jahren nun annähernd konstant verliefen. Die Zahl der Neuerkrankungen bei Männern war seit Jahren leicht rückläufig. Der Altersgipfel von durchschnittlich 64 Jahren bei Männern und 66 Jahren bei Frauen wurde für das Jahr 2018 beschrieben (Barnes et al., 2016, 2021).

HNSCC lassen sich der Entstehung nach in zwei große Gruppen einteilen. Ein großer Prozentsatz der Tumoren ist mit langjährigem Alkohol und Tabakkonsum assoziiert. Vor allem die Kombination aus beidem stellt einen wesentlichen Risikofaktor dar. Charakteristisch befinden sich diese Tumoren in der Mundhöhle, dem Hypopharynx und dem Larynx. Dem gegenüberzustellen ist eine zweite Gruppe der virus-induzierten Tumoren. Hierbei ist die chronische Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV) ein wesentlicher Risikofaktor (Agaimy und Weichert, 2016). Die sogenannten HPV-positiven HNSCC befinden sich besonders häufig im Bereich der Mundhöhle und des Oropharynx (Wittekindt et al., 2012). Sie machen in Deutschland ca. 30-50% aller Oropharynxkarzinome aus (Tinhofer et al., 2015; Reuschenbach et al., 2016).

Die Inzidenz der noxeninduzierten HPV-negativen HNSCC ist wegen des rückläufigen Tabakkonsums gesunken, allerdings gibt es einen positiven Trend von HPV-positiven HNSCC (Sturgis und Cinciripini, 2007). Diese charakterisieren sich vor allem durch ein jüngeres Erkrankungsalter und negativer Tabakanamnese, allerdings einer deutlich besseren Heilungsrate (Ang et al., 2010; Linge et al., 2016).

Nicht nur in der Prognose unterscheiden sich HPV-negative und -positive HNSCC, sondern auch in dem molekularen Mechanismus der Karzinogenese. Bei HPV-negativen HNSCC kommt es durch Noxen (Alkohol und Tabak) zu einer langjährigen Akkumulation von DNA-Schäden. Diese führt zur Metaplasien, aus der sich ein Karzinom entwickelt (Hecht, 2003; Jou und Hess, 2017). Besonders häufig erreichen HNSCC Zellen ihr Replikationspotential durch Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen, wodurch dessen Tumorsuppressorfunktion aufgehoben wird (The Cancer Genome Atlas Network, 2015). In einer Subgruppe von HNSCC Zellen kann es zu vielfältigen Änderungen im Rezeptorsignalweg des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) kommen. Somit haben diese Zellen verstärkte Wachstumsstimuli auch unabhängig von Wachstumsfaktoren (Leemans et al., 2011). Dies kann unter anderem therapeutisch mit EGFR-Inhibitoren wie Cetuximab genutzt werden (Mendelsohn und Baselga, 2003).

Bei den HPV-positiven HNSCC spielen die viralen Onkoproteine E6 und E7 eine Rolle bei der Karzinogenese. Diese führen zu einer Unterdrückung der p53 Proteinexpression und inaktivieren die Funktion von pRb (Wittekindt et al., 2012). Es kommt zu einem Kontrollverlust der Zellzyklusregulation, weil wegen Fehlen des aktiven p53 sowie des inaktivierten pRb Zellteilungen mit DNA Schäden nicht verhindert werden und eine unkontrollierte Progression im Zellzyklus ermöglicht wird (siehe Kapitel 1.2.2) (Heinrich et al., 2014).

1.1.2 Therapie des HNSCC

Das multimodale Therapiekonzept des HNSCC beinhaltet die operative Sanierung, die Radio(chemo)therapie und die Immuntherapie (Reiß, 2021). Sie ist insbesondere abhängig vom Tumorstadium und dessen Lokalisation, sowie Ausmaß der lymphogenen Metastasierung. Die Therapieentscheidung ist generell individuell auf den Patienten maßgeschneidert und auch stark abhängig von Faktoren wie Komorbiditäten. In frühen Stadien steht die alleinige operative Sanierung oder die Strahlentherapie, bei fortgeschrittenen Tumorstadien eine primäre oder adjuvante Radio(chemo)therapie im Vordergrund. Im Falle einer Fernmetastasierung oder einer Zweitlinientherapie ist eine Systemtherapie aus klassischer Chemotherapie und Antikörpertherapie mit Cetuximab indiziert. Des Weiteren kommen hierbei die Operation und Strahlentherapie für eine lokoregionale Tumorkontrolle infrage (Stöver und Feyer, 2018; Reiß, 2021).

Zusätzlich zu der operativen Entfernung des Primärtumors wird eine Entfernung der lokoregionären Lymphknoten in Form einer Neck Dissection, welche in verschiedenen Ausführungen erfolgen kann, angestrebt. Hierbei werden die befallenden Lymphknoten des Halses entfernt oder es erfolgt eine elektive Neck Dissection zum Ausschluss okkulten Lymphknotenmetastasen (Wolff et al., 2012).

Die Strahlentherapie ist eine äußerst wichtige Säule der Tumorthherapie. Die gesamte Dosis, die im Tumorgebiet appliziert wird, beträgt in der Regel 70 Gy. Sie wird in eine Reihe von Einzeldosen unterteilt, die entweder konventionell fraktioniert (1,8–2,0 Gy täglich, 5 Tage / Woche) oder hyperfraktioniert (1,1–1,2 Gy zweimal täglich) appliziert werden (Wolff et al., 2012; Stöver und Feyer, 2018).

Bestrahlung mit gleichzeitiger Gabe eines Chemotherapeutikums wie 5-FU, Cisplatin, Carboplatin oder Mitomycin C führt zu einem Überlebensvorteil gegenüber alleiniger Strahlentherapie. Dies ist das Standardverfahren bei HNSCC (Budach et al., 2006; Stöver und Feyer, 2018). Besteht eine Kontraindikation für eine platinhaltige Chemotherapie, kann auf den EGFR-Inhibitor Cetuximab in Kombination mit Strahlentherapie ausgewichen werden (Bonner et al., 2006).

Für HNSCC kann insbesondere bei schnell-proliferierenden Tumoren eine Verbesserung des Gesamtüberlebens erreicht werden, wenn bei alleiniger Strahlentherapie eine Hyperfraktionierung mit täglich zwei Bestrahlungen durchgeführt wird (Bourhis et al., 2006; Budach et al., 2006). Durch weitere Fortschritte in der strahlentherapeutischen Behandlung wie der intensitätsmodulierten, bildgeführten Strahlentherapie (IMRT) ist es möglich, die Strahlendosis sehr präzise in den Tumor zu applizieren, wodurch die umliegenden Risikoorgane geschont und Nebenwirkungen, wie die strahlenbedingte Xerostomie reduziert werden (Chao et al., 2001).

1.2 Strahlenbiologische und molekularbiologische Grundlagen

Ein Tumor entsteht insbesondere durch Fehler in den zellulären Mechanismen, die das Wachstum, die Proliferation und den Tod von Zellen als Reaktion auf extrazelluläre oder intrazelluläre Signale steuern. Anhaltende Proliferation, replikative Unsterblichkeit und Resistenz gegen Zelltod sind Folge dieser deregulierten Mechanismen (Hanahan und Weinberg, 2011).

Ziel der Strahlentherapie ist es, Tumorzellen abzutöten beziehungsweise in ihrem Wachstum irreversibel zu stoppen. Dies geschieht durch das Auslösen eines permanenten Zellzyklusarrests (Seneszenz), durch Initiierung von Apoptose oder Nekrose, aber vor allem durch den Verlust der Teilungsfähigkeit (mitotische Katastrophe) (Orth et al., 2014).

Auslöser für diese Ereignisse sind jeweils strahleninduzierte Schädigungen der DNA.

Diese Schäden entstehen aus Ionisationsprozessen. Hierbei können die Atome der DNA entweder direkt ionisiert werden oder dies indirekt über den Angriff von Radikalen erfolgen. Vor allem die Ionisation von Wasser und die dabei entstehenden Radikale tragen zur indirekten DNA-Schädigung bei (Dikomey et al., 2016). Die Oxygenierung der Zelle spielt dabei eine große Rolle in der Radikalbildung (v.a. ROS, Reaktive Sauerstoffspezies), welche zur Induktion von DNA Schäden führen (Münter und Weber, 2017; Wozny et al., 2017). Bestrahlt man eine Tumorzelle mit 1 Gy Photonen kommt es zu etwa 1.000 Einzelstrang- (SSB) und 30 Doppelstrangbrüchen (DSB), wobei vor allem die DSB für die Zellabtötung von Bedeutung sind (Dikomey et al., 2016).

1.2.1 DNA-Schadensreparatur

Die Sensitivität einer Tumorzelle gegenüber ionisierender Strahlung wird ganz wesentlich durch die Reparaturkapazität der Zelle bestimmt (Dikomey et al., 2016). Zellen haben einen komplexen Signaltransduktionsweg, um DNA-Schäden zu erkennen und darauf zu reagieren. Dies wird auch DNA-Schadensantwort (DDR, DNA Damage Response) genannt. Wird ein DSB nicht oder nur fehlerhaft repariert, kommt es zu einer fehlerhaften Chromosomenverteilung während der nächsten Mitosen. Die Chromosomenaberrationen führen letztendlich zu einer letalen mitotischen Katastrophe. Dieser Mechanismus ist für die Strahlensensibilität von Tumorzellen am bedeutendsten. Tumorzellen haben eine schlechtere DDR als normale Zellen (Dikomey et al., 2016). Die zellulären Mechanismen, die während der DDR initiiert werden, schützen normalerweise die DNA in den Zellen vor Schäden durch Umwelteinflüsse oder vor spontan während des DNA-Metabolismus erzeugten Schäden (Ciccia und Elledge, 2010).

Erkannt wird der DNA-Schaden durch ATM (ataxia telangiectasia mutated), sowie ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related), DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) und durch Mitglieder der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-Familie (PARP) (Harper und Elledge, 2007). Diese Proteine sind Teil einer frühen Reaktion auf den DNA-Schaden. SSBs werden von PARP1 erkannt, welches an die Schäden bindet und dadurch die Reparatur startet (Sato und Lindahl, 1992; Ray Chaudhuri und Nussenzweig, 2017). Bei einem DSB wird durch die Aktivierung von ATM und DNA-PK das Histon H2AX phosphoryliert, wodurch γ -H2AX gebildet wird (Scully et al., 2019). Die Phosphorylierung dieses Proteins eignet sich daher auch zum Nachweis von DSB (Chan et al., 2002; Celeste et al., 2003; Scully et al., 2019). Für die Reparatur von DSB sind vor allem die Nicht-Homologe Endverknüpfung (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR) entscheidend (Chapman et al., 2012). Die NHEJ wird in allen Phasen des Zellzyklus durchgeführt und ist ein fehleranfälliger Prozess. Es gibt zwei unterschiedliche NHEJ-Mechanismen: das DNA-PK-abhängige, klassischen NHEJ (C-NHEJ) und das Poly

(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-1-abhängige Backup-NHEJ (B-NHEJ / alternative Endjoining). Im C-NHEJ lagert sich Ku70 / Ku80 an das gebrochene DSB-Ende. Danach wird die DNA-Proteinkinase (DNA-PK) rekrutiert. C-NHEJ kann während des gesamten Zellzyklus auftreten, ist jedoch in G0 / G1 und G2 dominant (Mahaney et al., 2009; Karanam et al., 2012). Wenn der C-NHEJ-Mechanismus beeinträchtigt ist, wird der PARP-1 abhängige B-NHEJ-Mechanismus aktiviert. PARP-1 bindet an den Bruch und bewirkt das Schließen und Auffüllen des Bruchs. Hierbei können, wie auch in dem C-NHEJ, Basen in der DNA-Sequenz verloren gehen, wodurch Mutationen entstehen können (Mansour et al., 2010; Ceccaldi et al., 2016).

Die HR repariert DSB fehlerfrei. Vor allem in der Mitte der S-Phase, wenn der DNA-Replikationsgrad am höchsten ist, kommt die HR am häufigsten zum Einsatz. Die HR erfordert eine intakte homologe Sequenz, welche sich auf einem Schwesterchromatid befindet (Karanam et al., 2012).

Die Wahl des DSB-Reparaturwegs hängt unter anderem von der Struktur der DSB-Enden ab. Stumpfe DSB-Enden binden den Ku70 / Ku80 Komplex. Ist der Ku70 / Ku80 Komplex gebunden, wird je nach Zellzyklusphase das C-NHEJ angewandt oder der Ku70 / Ku80 Komplex dissoziiert von den DNA-Enden und es lagert sich Rad51 an, welches dann zusammen mit Proteinen wie BRCA1 / 2 die HR ablaufen lässt. Damit sich Rad51 anlagern kann, muss allerdings erst ein Abschnitt der DNA reseziert werden (end resection), weil sich Rad51 an ssDNA anlagert (Scully et al., 2019). Sobald eine Endresektion stattgefunden hat, wird der C-NHEJ-Mechanismus verhindert und vor allem HR aktiviert. Kann HR nicht aktiviert werden, z.B., weil sich die Zelle nicht in der S/G2 Phase befindet, bindet PARP1 und die Reparatur wird durch das B-NHEJ geleistet. Damit teilen sich HR und B-NHEJ einen gemeinsamen initialen Resektionsmechanismus und konkurrieren um die Reparatur der DSB. Liegt ein Defekt in der HR vor, werden in den Zellen DSB vermehrt durch das PARP1-abhängige B-NHEJ repariert. In HR-defizienten Zellen kann dann durch Hemmung von PARP1 mittels eines spezifischen Inhibitors eine gezielte Strahlensensibilisierung erreicht werden (Farmer et al., 2005; Zhang und Jasin, 2011; Ceccaldi et al., 2016).

1.2.2 Zellzyklusregulation

Der Zellzyklus ist über eine Reihe von Cdks (Cycline dependent kinase) und Zyklinen reguliert, die unter anderem von p53 und DNA-Schäden beeinflusst werden. Zyklone sind die Aktivatoren der Cdks. Ihre Konzentration verändert sich je nach Zellzyklusphase. Cdk-Inhibitoren (CKI) bieten die Möglichkeit, in diese Regulation einzugreifen.

In der G1-Phase bereitet sich die Zelle insbesondere auf die DNA-Replikation vor. In der S-Phase wird die DNA der Zelle verdoppelt und in der G2-Phase werden vor allem

Proteine exprimiert, die für die Zellteilung, der Mitose, gebraucht werden (Heinrich et al., 2014).

Es gibt zwei wesentliche strahleninduzierte Kontrollpunkte, den G1/S und den G2/M-Kontrollpunkt, in der die Zelle ihren Zellzyklus anhalten kann. Dadurch kann der Zelle nach DNA-Schädigung eine längere Reparaturphase gewährt werden (Heinrich et al., 2014).

DNA-Schäden führen über den Proteinkomplex MRN (Mre11, Rad50, Nibrin) zur Aktivierung der ATM oder ATR-Kinase-Aktivität. Dies führt neben der Initialisierung der DSB Reparatur auch zur Phosphorylierung von p53 und den Checkpoint-Kinasen Chk2 beziehungsweise Chk1 (Heinrich et al., 2014; Dikomey et al., 2016). Phosphoriliertes p53 wird nicht mehr von Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog) proteolytisch abgebaut und kann dann als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen induzieren, die einen Zellzyklusarrest oder eine Apoptose auslösen. Vor allem die Induktion von p21 kann dann einen Zellzyklusarrest bewirken. Bei einer sehr hohen Zahl an DNA-Schäden kann über p53 in bestimmten Zellen auch eine Apoptose ausgelöst werden (Heinrich et al., 2014).

In der G1-Phase bildet sich der Cdk4,6/Cyclin D Komplex. Dieser Komplex bewirkt eine Hyperphosphorylierung von pRB, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F1 freigesetzt wird und die Zellen in die Lage versetzt werden, in die S-Phase einzutreten. Liegen in der Zelle DNA-Schäden vor, so verhindert p21 durch Inaktivierung des Cdk4,6/Cyclin D Komplexes die Hyperphosphorylierung des pRB. Dieser sogenannte G1/S Kontrollpunkt bewirkt dann einen Arrest der Zelle in der G1-Phase, der transient, aber auch permanent sein kann (Heinrich et al., 2014).

In der G2-Phase bindet Cyclin B mit Cdk1. Dieser Komplex wird so lang phosphoryliert und dadurch inaktiviert, bis die Zelle zur Mitose bereit ist. Sobald die Zelle bereit ist, dephosphoryliert Cdc25c (cell division cycle protein 25c) den Cyclin B/Cdk1-Komplex und stimuliert die Zelle zum Eintritt in die Mitose (Bernhard et al., 1995; Heinrich et al., 2014). Kommt es aufgrund eines DNA-Schadens zu einer Stabilisierung von p53, wird neben p21 auch GADD45A (Growth arrest und DNA damage-inducible, alpha) exprimiert. Dieses Protein kann den Cyclin B/Cdk1-Komplex inhibieren und ist somit an der Regulation des G2/M Kontrollpunktes beteiligt (Wang et al., 1999; Zhan et al., 1999). Außerdem hemmen die Checkpoint-Kinasen (Chk1 und 2), welche durch ATM und ATR bei DNA-Schäden aktiviert werden, die Cdc25c-Phosphatase. Der Cyclin B/Cdk1-Komplex bleibt inaktiviert. Dies führt zu einem G2/M-Arrest (Heinrich et al., 2014). Da bei über 50% der menschlichen Tumoren p53 mutiert ist, ist der G2/M-Arrest im Wesentlichen über ATR / Chk1 vermittelt (Dikomey et al., 2016).

Durch die verschiedenen Reparatur- und Zellzyklusregulationsmechanismen haben

Zellen eine unterschiedliche Strahlensensibilität in den Phasen des Zellzyklus. Vor allem in der späten S Phase und der frühen G1 Phase ist eine Tumorzelle resistenter gegenüber Bestrahlung (Münter und Weber, 2017).

1.2.3 ^{12}C -Ionenbestrahlung

In der Strahlentherapie werden nicht nur Photonen zur Bestrahlung von Tumoren eingesetzt, sondern auch zunehmend sogenannte Partikelstrahlen wie Protonen und Kohlenstoffionen (^{12}C -Ionen). Hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit unterscheiden sich diese beiden Strahlenqualitäten z.T. deutlich. Bei gleicher physikalischer Dosis (Gy) kann durch eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen eine wesentlich größere relative biologische Wirksamkeit (engl.: relative biological effectiveness, RBE) erreicht werden (Fokas et al., 2009; Krieger, 2009). *In-vitro*-Experimente haben gezeigt, dass dies sowohl auf eine höhere Anzahl an pro Gy erzeugten DSB zurückzuführen ist, wie auch auf eine verminderte Reparatur dieser Brüche (Kraft, 1990; Suzuki et al., 2000; Fokas et al., 2009).

Für die Charakterisierung von ionisierenden Strahlen und da insbesondere von Partikelstrahlen wird der Lineare Energietransfer (LET) genutzt. Dieser Parameter beschreibt, welche Energie auf dem Weg durch das Gewebe abgegeben wird. Er ist definiert als die Energieabgabe in Kiloelektronenvolt pro Teilchenspurlänge in μm (Zirke und Tobias, 1953). Photonen haben einen niedrigen LET von etwa $1 \text{ keV} / \mu\text{m}$. Partikelstrahlung wie ^{12}C -Ionen zeichnet sich durch einen hohen LET von $100\text{--}150 \text{ keV} / \mu\text{m}$ aus (Dikomey et al., 2016; Münter und Weber, 2017). Niedrigenergetische (low-LET) Strahlung hat eine geringere Ionisationsdichte, welche zu indirekten Ionisationen der DNA, hauptsächlich über die Radiolyse des Wassers, und damit der Schädigung der DNA führt. Hochenergetische (high-LET) Strahlung hat eine deutlich höhere Ionisationsdichte als low-LET und es kommt zu mehr direkter Strahlenwirkung. Die dadurch entstehenden DNA Schäden sind von besonders komplexer Natur, was ihre Reparatur erschwert und unter Umständen alternative Reparaturwege beansprucht und häufiger zu Chromosomenaberrationen führt (Hada und Sutherland, 2006; Asaithamby et al., 2008; Durante et al., 2013). Der LET hängt ganz wesentlich auch von der Energie der Strahlung ab. Photonen entwickeln aufgrund der niedrigeren Energien eine starke Wechselwirkung mit dem Gewebe. Bei der Ionisation der Atome werden Elektronen freigesetzt, denen soviel Energie übertragen wird, dass sie weitere Atome ionisieren können (sekundäre Elektronen). Aufgrund des Beitrags der sekundären Elektronen wird erst kurz nach dem Eindringen der Photonen in das Gewebe ein Dosismaximum erreicht (Weber und Kraft, 2009). Mit zunehmender Eindringtiefe nimmt dann die abgegebene Dosis nahezu exponentiell ab (Mohamad et al., 2017).

Ein anderes, sogenanntes Tiefendosisprofil (Abb. 1) liegt dagegen bei einer ^{12}C -Ionenbestrahlung vor. Bei den sehr hohen Anfangsenergien der ^{12}C -Ionen, wie sie heute in der Therapie genutzt werden, finden nur wenige Ionisationen statt und die Ionen geben nur sehr wenig Energie ab. Diese Abgabe nimmt aber langsam zu, je mehr die Ionen an Energie verlieren und erreicht ihr Maximum im sogenannten Bragg Peak, wenn das Ion seine letzte Energie abgibt. Nach dem Bragg Peak ist ein drastischer Dosisabfall zu beobachten. Die initiale Energie des Ions bestimmt damit die Eindringtiefe der Partikelstrahlen (Mohamad et al., 2017).

Aufgrund dieses besonderen Tiefendosisprofils von ^{12}C -Ionen können damit proximal des Tumors liegende Gewebe sehr geschont und distal gelegene Risikoorgane können komplett von einer Bestrahlung ausgespart werden (Kraft, 1990; Mohamad et al., 2017).

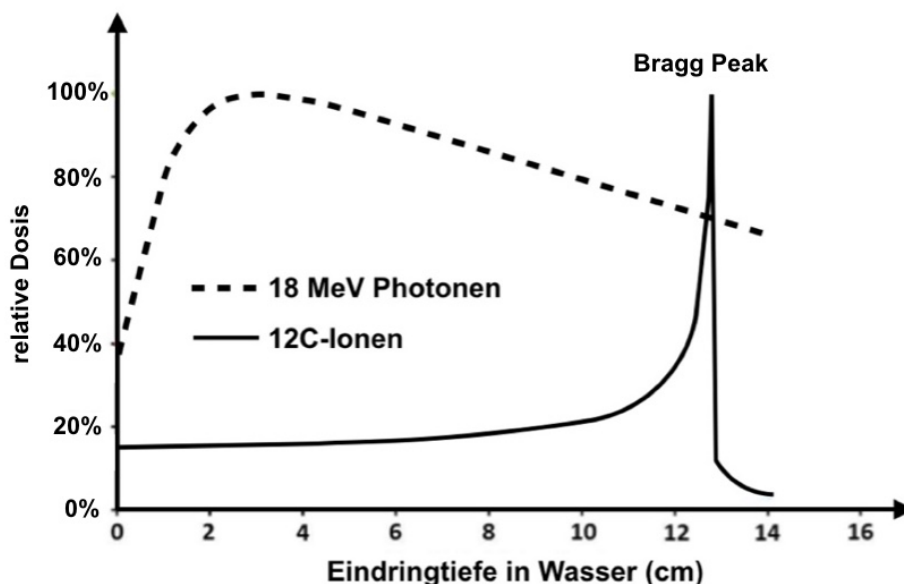


Abb. 1: Tiefendosisprofil für 18 MeV Photonen und ^{12}C -Ionen. Die jeweils abgegebene Dosis bei Auftragung gegen die Eindringtiefe in Wasser. Modifiziert nach Mohamad et al., 2017.

Zusammenfassend liefert ^{12}C -Ionen Strahlung eine hohe physikalische Dosis, kombiniert mit einer hohen biologischen Effizienz, an ein Tumervolumen, während das umgebende gesunde Gewebe maximal geschont wird (Kraft, 1990). Diese Eigenschaften sind insbesondere für die Behandlung von HNSCC von großer Bedeutung. In unmittelbarer Nähe dieser Tumoren befinden sich eine Reihe von Risikoorganen. Mithilfe der Partikelstrahlen ist es möglich, diese Tumoren ausreichend hoch zu bestrahlen, ohne dass diese Organe zu stark geschädigt werden (Chao et al., 2001; Perri et al., 2015).

1.3 Stammzellen und Tumorstammzellen

Tumorerkrankungen treten vor allem in Geweben auf, die Stammzellen oder sich daraus entwickelte Zellen enthalten. Diese spezifischen Zellen sind dafür verantwortlich, in den entsprechenden Organen Verluste auszugleichen, wenn andere Zellen aufgrund von Alterung oder interner oder externer Beschädigung absterben (Hagen et al., 1997, 2002; Schut und Snyderwine, 1999; Goldman und Shields, 2003; Coates et al., 2005; Clarke, 2019). Die Zahl der Stammzellen ist jedoch immer sehr gering selbst in Organen mit replikationskompetenten Zellen, die in der Regel zudem nur eine sehr begrenzte Lebensdauer haben (Coates et al., 2005; Clarke, 2019).

1.3.1 Charakteristika von Tumorstammzellen

Tumoren sind sehr heterogen und bestehen aus unterschiedlichen Zellen. Eine Subpopulation sind die sogenannten Tumorstammzellen (CSC, cancer stem cells oder CIC, cancer initiating cells) (Ponta et al., 2003; Clarke et al., 2006; Zöller, 2011; Clarke, 2019). Diese Zellen sind in der Lage sich selbst zu erneuern, zu differenzieren und andere Tumorzellen zu beeinflussen. Tumorkontrolle und Therapieerfolg hängen im Wesentlichen von der Inaktivierung aller CSCs ab (Dikomey et al., 2016). Tumorstammzellen zeichnen sich vor allem durch eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit aus und sind in der Lage, die gesamte Heterogenität eines Tumors abzubilden (Kopper und Hajdú, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Injektion einer einzigen CSC ausreicht, um ein Tumorwachstum zu induzieren (Lapidot et al., 1994).

1.3.2 Tumorstammzellmarker CD44v6

Tumorstammzellen weisen an ihren Oberflächen z.T. besondere Strukturen auf, anhand derer sie erkannt werden können. CSCs von HNSCC zeigen eine besondere Expression von CD44 (Prince et al., 2007).

Der 1983 erstmals in blutbildenden Zellen beschriebene Hyaluronan (HA)-Rezeptor CD44 wird in vielen Zellen in einer Vielzahl von Isoformen exprimiert (Gallatin et al., 1983). Seine Isoformen ergeben sich aus mehreren Exons (Abb. 2A), von denen einige Exons konstant in allen bekannten Isoformen (S) vertreten sind und andere nur in Varianten (V) vorkommen. Sie werden nach Transkription durch alternatives Spleißen ausgewählt und durch posttranslationale Prozesse wie Sulfonierung und Glycosylierung weiter modifiziert. Durch die Kombination der variablen Exons V1 bis V10 ergeben sich verschiedene Isoformen, die in unterschiedlichen Geweben zu finden sind. Klassischerweise kommt die Standard Isoform CD44s ohne variable Exons in den meisten Geweben vor. CD44v6 und CD44v3-10 (welche ebenfalls das variable Exon V6 enthält) sind Isoformen, die vor allem mit Keratinozyten assoziiert sind (Milstone et al.,

1994; Tuhkanen et al., 1999; Zhou et al., 1999; Mack und Gires, 2008).

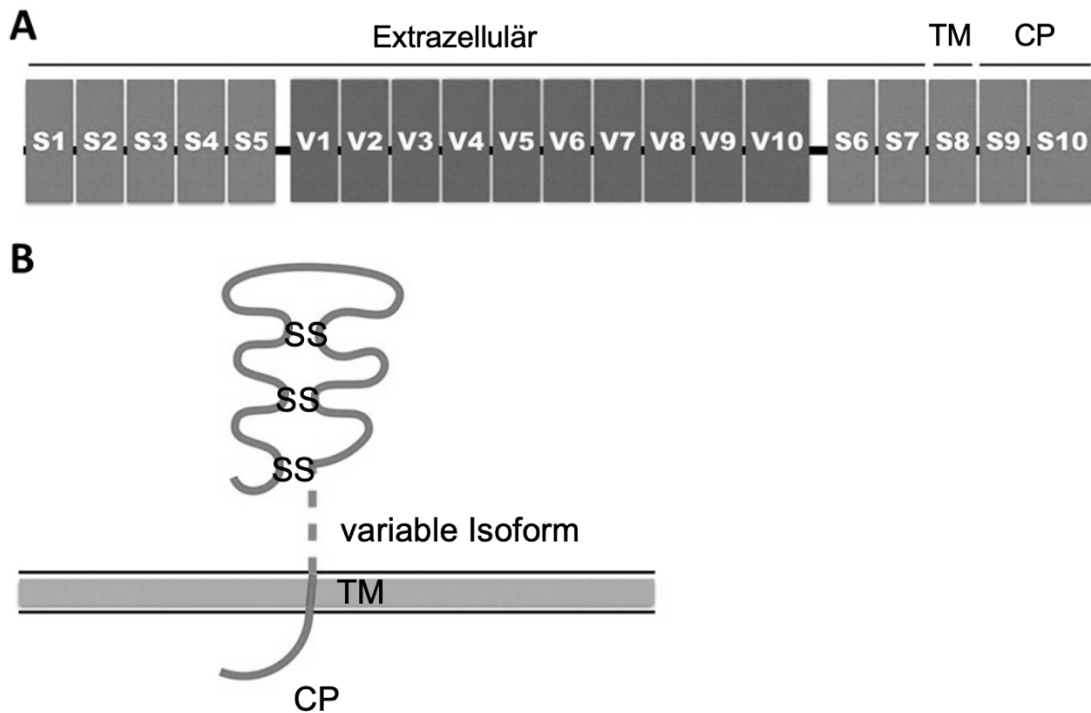


Abb. 2: Gen- und Proteinstruktur von CD44.

A) CD44 Genstruktur; TM = Transmembrandomäne, CP = zytoplasmische Domäne; Die zytoplasmatische Domäne kann durch die Exons 9 oder 10 codiert werden B) CD44 Proteinstruktur; TM = transmembrane Region, CP = zytoplasmatische Domäne, SS = Disulfidbrücken (Modifiziert nach *Ponta et al., 2003; Zöller, 2011*)

CD44 kann mit seiner extrazellulären Domäne aus den Exons S1-5 extrazelluläre Moleküle wie HA binden, ist aber generell mit einer großen Anzahl von Molekülen der Extrazellulärmatrix assoziiert. Hierüber wird die Bindung in die Extrazellulärmatrix gefördert und intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt (*Ponta et al., 2003; Zöller, 2011*). Abb. 2B zeigt die Proteinstruktur von CD44. Strukturell zeigt sich eine Amino-terminale Domäne extrazellulär, welche sich durch drei Disulfidbrücken (SS) kennzeichnet. Darunter liegt die Stammregion, in welcher die variablen Exons (V) liegen, gefolgt von der transmembranen Region und der zytoplasmatischen Domäne (*Ponta et al., 2003*). CD44 hat innerhalb der Zelle regulatorische Funktionen. Die zytoplasmische Domäne ist entscheidend für die intrazelluläre Signalübertragung. Zytoplasmatische Partnermoleküle sind die Zytoskelettproteine Ankyrin sowie Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Proteine). Diese Proteine sind unter anderem an der Regulation der Zellmigration und der Zellform beteiligt, also einer Art Aktivierung von Stammzellregulationsgenen (*Lokeshwar, 1994*).

Je nach Isoform können verschiedene extrazelluläre Proteine gebunden werden, welche dann bestimmte Signaltransduktionen innerhalb der Zelle auslösen. Wenn Hyaluronan

an CD44 der extrazellulären Domäne bindet, kommt es zu Wechselwirkungen der zytoplasmatischen Domäne mit Rezeptortyrosinkinasen (RTK), welche intrazellulär anti-apoptotische Pfade aktivieren (Lamontagne und Grandbois, 2008; Fehon et al., 2010; Zöller, 2011). Des Weiteren ist CD44 an der Modifizierung der Gewebematrix beteiligt, um die Migration metastasierter Tumorzellen und Tumorprogression zu unterstützen (Kuhn und Tuan, 2010).

Die Variante CD44v6 unterstützt vor allem durch Transkription der Hyaluronan (HA)-Synthase 3 (HAS3) die Sekretion von hochmolekularem HA, mit dem Wachstumsfaktoren abgefangen werden. Außerdem fungiert CD44v6 als Co-Rezeptor für c-Met (Zöller, 2011). Der Rezeptor c-Met, eine RTK, ist oftmals im HNSCC überexprimiert und über verschiedene zelluläre Mechanismen an Proliferation, Motilität und Invasion beteiligt, weil Downstream-MAPK- und β -Catenin-Aktivierung zur Aktivierung und Kernlokalisierung mehrerer EMT-Transkriptionsfaktoren beiträgt. EMT (Epitheliale-mesenchymale Transition) ist ein zentraler Schritt in der Metastasierung (Kalluri und Weinberg, 2009; Bhave et al., 2011; Wang et al., 2018). CD44v6 initiiert die c-MET-Aktivierung durch HGF (Hepatocyte Growth Factor)-Bindung, wobei CD44v6 als Plattform für HGF fungiert und auch das Downstream Signalling an der zytoplasmatischen Domäne von CD44 aktiviert wird (Orian-Rousseau et al., 2007; Zöller, 2011).

Der Tumorstammzellmarker CD44v6 zeigt eine große Relevanz beim Plattenepithelkarzinom (Heider et al., 2004; Mack und Gires, 2008; Spiegelberg und Nilvebrant, 2017). Er ist ein signifikanter Marker für die Progression des HNSCC, sowie für eine schlechte Prognose nach Radio(chemo)therapie (Sagawa et al., 2016; Patel et al., 2022). Die Expression von CD44 scheint dabei sogar bedeutender zu sein als die Ausprägung der Hypoxie (Linge et al., 2019). Die Bedeutung des CD44 bezüglich einer negativen Prognose zeigt sich auch für andere Entitäten wie dem Pankreaskarzinom (Matzke-Ogi et al., 2016; Peitzsch et al., 2019).

CD44v6 scheint außerdem ein prädiktiver Faktor für das Metastasierungsrisiko in zervikale Lymphknoten zu sein (Börjesson et al., 2004; Okuyama et al., 2019). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass Peptidinhibitoren von CD44v6 das Tumorwachstum sowie die Metastasierung von Pankreaskarzinomen blockieren (Matzke-Ogi et al., 2016).

1.3.3 Prognose

Trotz großer Fortschritte in der Therapie hat das HNSCC immer noch eine sehr schlechte Prognose mit einem 5-Jahres-Überleben von 50 bis 60%. Hierbei hängt die Prognose maßgeblich vom Tumorstadium, Lokalisation, HPV-Status und Lymphknotenbefall ab. Beträgt im Stadium I das 5-Jahres-Überleben noch 75-90%, so ergibt sich für das Stadium IV ein 5-Jahres-Überleben von nur 10-30% (Das et al., 2015; Stöver und Feyer, 2018). Es zeigt sich, dass HPV-positive HNSCC eine deutlich bessere Prognose aufweisen als HPV-negative HNSCC. Patienten mit HPV-positiven Oropharynxkarzinom hatten ein 10-Jahres-Überleben von 87% wohingegen das Überleben bei HPV-negativem HNSCC nur 56% betrug (Ang et al., 2010; Du et al., 2019).

Zur Unterscheidung von HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren mit oropharyngealer Lokalisation wird insbesondere die Überexpression von p16 genutzt (O'Sullivan et al., 2016). Bedingt durch das virale HPV-Protein E7 erfolgt eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F, welcher unter anderem die Transkription von p16 fördert und so die Fehlregulation hervorruft (Wittekindt et al., 2012). Allerdings kommt eine Überexpression von p16 auch in HPV-negativen HNSCC vor, sodass die zusätzliche Analyse des HPV-Status (genomisch oder auf RNA Ebene) zu einer präziseren Prognose führen kann. Mithilfe dieser Marker konnte gezeigt werden, dass das 5-Jahres-Überleben der HPV-positiv / p16 positiv-Untergruppe am höchsten ist. Für die HPV-negativ / p16 positive-Untergruppe werden mittlere Werte beobachtet und für die HPV-positiv / p16 negativ-Untergruppe und HPV-negativ / p16 negativ-Untergruppe von HNSCC das kürzeste 5-Jahres-Überleben (Coordes et al., 2016; Linge et al., 2018).

Die wesentlichen Ursachen für die schlechte Prognose beim fortgeschrittenen HNSCC sind die Metastasierung und das häufig auftretende Rezidiv (Price und Cohen, 2012; Specenier und Vermorken, 2018). Die metastatische Verbreitung von HNSCC erfolgt zunächst in die Lymphknoten (Leemans et al., 2011). Bei Diagnosestellung eines HNSCC liegt zu 50-60% bereits ein Lymphknotenbefall vor. Fernmetastasen sind primär selten vorhanden (Ozdek et al., 2000; Stöver und Feyer, 2018).

Vor allem die fortgeschrittenen HPV-negativen HNSCC stellen wegen ihrer schlechten Prognose eine große Herausforderung in der Therapie dar. Umso wichtiger ist es, molekularbasierte Biomarker für Diagnose, Prognose und Therapieoptimierung zu finden, um eine Verbesserung der Überlebensraten und der Lebensqualität von HNSCC-Patienten zu erreichen (Arantes et al., 2018).

1.4 Hintergründe und Fragestellung

Die Radio(chemo)therapie ist die Standardtherapie beim lokal fortgeschrittenen HNSCC. Trotz eines sehr intensiven Therapieregimes mit hohen strahlentherapeutischen Dosen, gelingt es in vielen Fällen nicht, das Tumorwachstum zu kontrollieren. Ursache hierfür ist in der Regel eine Strahlenresistenz der Tumorzellen.

Diese Resistenz kann auch durch Stammzellen vermittelt werden. In Vorarbeiten aus dem Labor wurde festgestellt, dass die basale Expression von Varianten des Tumorstammzellmarkers CD44 mit einer hohen Strahlenresistenz verbunden ist (Abb. 3). Für diese Analyse wurde die sehr umfassende Datenbank TCGA (The Cancer Genome Atlas) genutzt. Aus dieser Datenbank wurden für die HNSCC-Kohorte RNA Sequenzierdaten entnommen und mit den entsprechenden Überlebensdaten der Patienten verglichen. Die RNA-Expressionswerte für CD44v3-10 wurden dichotomisiert, mit einer Trennung beim zweifachen Median. Es folgte die Kapla-Meyer-Analyse für die Patientengruppen mit hoher (n=8) und niedriger (n=69) Expression von CD44v3-10. Das Exon V6 ist in der Isoform CD44v3-10, welches eine sehr häufige Isoform ist, enthalten. Somit kann bei einer Überexpression von V3-10 auch von einer Überexpression von V6 gesprochen werden (Ponta et al., 2003). Es zeigte sich, dass bei den mit adjuvanter Radio(chemo)therapie behandelten Patienten, die eine Überexpression des Tumorstammzellrezeptors CD44v3-10 vorwiesen, eine sehr geringe Überlebensrate beobachtet wurde (Abb. 3). Diese Patienten zeigten in der Kaplan-Meyer-Analyse ein wesentlich schlechteres medianes Überleben mit nur 14,5 Monaten im Vergleich zu den Patienten mit niedriger CD44v3-10 Expression, welche im Median 77,3 Monate überlebten ($P < 0.0036$; HR = 3,64) (The Cancer Genome Atlas Network, 2015; Schötz et al., in Prep.).

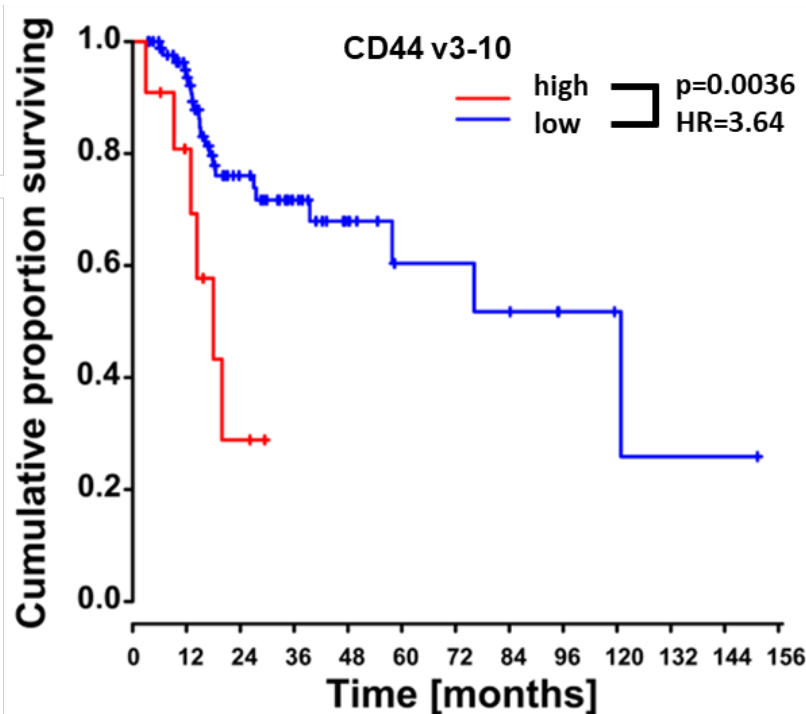


Abb. 3: Bedeutung von CD44v3-10 für die Prognose des HNSCC.

Daten von 77 Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC wurden dem 'The Cancer Genome Atlas Network 2015' entnommen. Patientengruppen mit hoher (n=8) und niedriger (n=69) Expression von CD44v3-10 (Unveröffentlichte Ergebnisse Labor für Strahlentherapie und Radioonkologie Marburg, Schötz et al., in Prep.)

Mehrere Arbeiten deuten bereits an, dass die Expression von CD44 oder einer seiner Isoformen eine Strahlenresistenz bewirken kann (Heider et al., 2004; Sagawa et al., 2016; Spiegelberg und Nilvebrant, 2017; Linge et al., 2019). Allerdings fehlen bisher konkrete Hinweise, welche Mechanismen hieran beteiligt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es aufzuklären, welchen Einfluss der Rezeptor für die Wirkung von Strahlung auf HNSCC-Zellen hat.

Anhand modellierter HNSCC-Zellen sollten folgende konkrete Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Wie wirkt sich eine Über- bzw. Unterexpression von CD44v6 auf die Zellproliferation aus?
2. Welche Wirkung hat CD44v6 auf die Zellzyklusregulation und die DSB-Reparatur nach Bestrahlung?
3. Welche Wirkung hat CD44v6 auf die Empfindlichkeit bei Bestrahlung mit Photonen bzw. ^{12}C -Ionen?
4. Wie wirkt sich CD44v6 auf die durch den PARP1-Inhibitor verursachte Strahlensensibilisierung aus?
5. Eignet sich CD44v6 als ein Entscheidungsmarker bei der Wahl zwischen einer Bestrahlung mit Photonen bzw. ^{12}C -Ionen?

2 MATERIAL UND METHODEN

Im Anhang (siehe Kap. 8.1) befinden sich alphabetische Auflistungen der verwendeten Materialien, Chemikalien und Reagenzien, Geräten und Software.

2.1 HNSCC Zelllinien UPCISCC040 und UPCISCC131

Die Zelllinie UPCI:SCC040 aus dem University of Pittsburgh Medical Center entstammt einem chirurgisch resezierten moderat differenzierten Plattenepithelkarzinom der Zunge eines 50-jährigen männlichen Patienten mit Alkoholabusus (Tab. 1). Der Patient hatte ein Stadium 4 Tumor, mit T2 N2, und ist an den Folgen der Tumorerkrankung verstorben. p53 wurde als Wildtyp angegeben, wird aber aufgrund einer Mutation im Promotor nicht exprimiert (White et al., 2007; Martin et al., 2008). UPCI:SCC040 wurde ausgewählt, weil diese Zelllinie eine hohe Expression von CD44v6, sowie Gesamt-CD44 und c-Met hat. Die Zelllinie UPCI:SCC131 ist ebenfalls aus dem University of Pittsburgh Medical Center und entstammt einem chirurgisch reseziertem gut differenzierten Plattenepithelkarzinom des Mundbodens eines 73-jährigen Patienten mit dem Tumorstaging T1 N0, Stadium unbekannt. Dieser Patient hatte einen Nikotin und Alkoholabusus in der Vorgeschichte. p53 wurde als Wildtyp angegeben (White et al., 2007). Die Linie UPCI:SCC131 zeichnet sich durch eine niedrige Expression von CD44v6 bei gleichzeitig hoher Expression von Gesamt-CD44 und c-Met aus.

Tab. 1: Charakteristika der verwendeten HNSCC Zelllinien.

Daten der HNSCC-Linien UPCI:SCC040 und UPCI:SCC131 (Telmer et al., 2003; White et al., 2007).

Charakteristika	Zelllinien	
	UPCI:SCC040	UPCI:SCC131
Tumor	Orales Plattenepithelkarzinom	Orales Plattenepithelkarzinom
Ursprung	Neuer Primärtumor	Neuer Primärtumor
Lokalisation	Zunge	Mundboden
Alter und Geschlecht	50 Jahre / männlich	73 Jahre / männlich
TNM	T2N2Mx	T1N0Mx
Grade	2	1
Stage	4	Unbekannt
Alkohol	Ja	Ja
Nikotin	Nein	Ja
HPV-Status	Negativ	Negativ
TP53 Status	Wildtyp, nicht exprimiert	Wildtyp
CD44v6 Expression	Hoch	Niedrig

Beide Zelllinien sind HPV-negativ und wurden durch eine short-Tandem-Repeat Analyse im Helmholtz Center München unter Verwendung des GenePrint 10-Kits (Promega, Mannheim, Deutschland) und der GeneMapper 5.0-Software authentifiziert. Die

resultierenden Daten wurden mit Expasy- und DSMZ-Datenbanken verglichen (Dirks et al., 2010). Alle Zellen wurden routinemäßig auf Mykoplasmenkontamination getestet. Die Zellen wurden vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) käuflich erworben.

2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX mit 10% fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (im folgenden Text als Vollmedium (VM) bezeichnet) bei 7,5% CO₂ gesättigter Atmosphäre und 37°C gehalten. Passagiert wurden die Zelllinien in T75 Flaschen (75 cm²) mit 10 ml VM. Bei einer Konfluenz von 80 – 90% wurden die Zellkulturen 1:10 in frischem Vollmedium verdünnt und mit ca. 5.000 Zellen / cm² ausgesät. Insgesamt sind die Zellen maximal 15 Passagen lang kultiviert worden. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerkammer bestimmt.

2.1.2 Zellverdopplung

Zur Überprüfung der Zellproliferation wurden auf einer 24-Well Platte jeweils 15.000 Zellen in 400 µl VM pro Well (1,9 cm²) ausgesät. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in der Neubauerkammer gezählt. Die Verdopplungszeit wurde aus dem exponentiellen Anstieg der Wachstumskurve bestimmt.

2.2 Knockdown von CD44v6

Die Depletion von CD44v6 in der Zelllinie UPC1:SSC040 mit hoher CD44v6 Expression wurde mittels spezifischer siRNA (small interfering ribonucleic acid) erreicht (KD = knockdown; im Nachfolgenden CD44v6 KD genannt). Dieser Knockdown inhibiert alle Transkriptvarianten, welche das V6 Exon enthalten, also auch die Isoform CD44v3-10. Um CD44v6 zu depletieren wurde eine von Invitrogen synthetisierte siRNA, welche speziell gegen das Exon V6 gerichtet war, verwendet (Sequenz siehe Anhang 8.2). Diese siRNA mit 25 Nukleotiden ist nicht codierend. Sie bindet an die komplementäre mRNA (Messenger Ribonukleinsäure) und bewirkt, dass diese mRNA nicht codiert und abgebaut wird. Somit greift die siRNA regulatorisch in die Genexpression einer Zelle ein (Carthew und Sontheimer, 2009; Siomi und Siomi, 2009). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einer unspezifisch bindenden siRNA (im Folgenden mit Kontrolle KD bezeichnet) behandelt. Damit sollen die allein durch die Transfektion verursachten Effekte bestimmt werden.

Die siRNA gelangt mittels Transfektion in die Zelle. Dafür wurde Lipofectamin 2000

(Invitrogen Life Technologies) verwendet. Lipofectamin enthält Lipiduntereinheiten, die Liposomen bilden, welche die siRNA einschließen und so in die Zelle transportieren (Cardarelli et al., 2016). Einen Tag vor der Transfektion wurden 150.000 Zellen pro Well (9.6 cm²) in eine 6 Well Platte in 2 ml Antibiotika-freiem (AB-freiem) VM ausgesät. Nach 16 Stunden Adhärenz wurden die Zellen mit 2 ml OptiMEM (Reduced Serum Media) gewaschen und 0,5 ml OptiMEM in jedes Well vorgelegt. Das Transfektionsmedium bestand aus den in Tab. 2 aufgeführten Reagenzien. In ein steriles Röhrchen (Reaktionsgefäß 1) wurden 50 pmol siRNA gegeben und mit 250 µl OptiMEM verdünnt. Es wurden 2 µl Lipofectamin 2000 mit 250 µl OptiMEM in einem weiteren sterilen Röhrchen (Reaktionsgefäß 2) verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt von Reaktionsgefäß 2 in Reaktionsgefäß 1 pipettiert, gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der gemischte Inhalt (500 µl) wurde auf das Well mit dem 0,5 ml vorgelegten OptiMEM gegeben und für 4 Stunden inkubiert. Abschließend konnte das Transfektionsmedium entfernt und 2 ml AB-freies VM hinzugegeben werden.

Tab. 2: *Transfektionsmedium für KD*

Transfektionsmedium	Ansatz
für 1 Well einer 6 Well Platte (9,6 cm ²)	50 nM siRNA 2 µl Lipofectamin 500 µl OptiMEM

Nach weiteren 24 Stunden konnten die Versuche mit den transfizierten Zellen UPCI:SCC040 CD44v6 KD und UPCI:SCC040 Kontrolle KD durchgeführt werden, da man nun einen effektiven KD hatte. Die erfolgreiche Transfektion wurde jeweils mittels Western Blot verifiziert.

2.3 Stabile Transfektion von CD44v3-10

Die Zelllinie UPCI:SCC131 zeichnet sich durch eine sehr geringe Expression des CD44v6 aus. Diese Linie eignet sich damit ideal dafür, den Einfluss einer Überexpression dieses Proteins zu untersuchen. Für diese Versuche wurde die cDNA von CD44v3-10, welche auch das variable Exon V6 beinhaltet, stabil in diese Zellen transfiziert. Der Vektor enthielt neben der cDNA für CD44v3-10 über einen Linker auch die cDNA von GFP (Green Fluorescent Protein). Der vorgeschaltete Promoter pCMV3 sorgte für eine konstitutive Überexpression beider Gene, sodass GFP auch ein indirekter Nachweis für eine CD44v3-10 Expression war. Auf dem Plasmid befand sich außerdem ein Gen, welches eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin mithilfe eines unabhängigen Promotors exprimiert. Auf diese Weise konnten positiv transfizierte Zellen

(UPCI:SCC131.CD44v3-10.GFP) selektiert werden (Plasmidkarte im Anhang Kap. 8.2). Zur Kontrolle wurde eine Linie etabliert, die ebenfalls eine Hygromycin-Resistenz hat und die cDNA von GFP enthält, nicht aber die von CD44v3-10 (UPCI:SCC131.GFP). Die Plasmide pCMV3-CD44-C-GFPspark und für die Kontrolle pCMV3-GFPspark wurden mittels Elektroporation in jeweils einen E. coli Stamm gebracht und über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurde die DNA nach Protokoll des Herstellers (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi von Macherey-Nagel) extrahiert und die DNA-Konzentration am Nanodrop bestimmt. Damit die Plasmid DNA in die zelluläre DNA eingebaut wird, musste sie linearisiert werden. Dafür wurde das Restriktionsenzym SapI / R0569S verwendet. Für den Enzym-Verdau wurden 20 U des Enzyms SapI mit 20 µg DNA und 10 µl 10x CutSmart-Puffer in einem Gesamtvolumen von 100 µl gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die linearisierte DNA nach Protokoll des Herstellers (Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System von Promega) aufgereinigt. Für die eigentliche Transfektion wurde die Zelllinie UPCI:SCC131 mit 10.000 Zellen pro Well (0,32 cm²) auf je zwei 96 Well Platten in 0,2 ml AB-freiem VM ausgesät. Nach Adhärenz von 16 Stunden wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 95 µl OptiMEM pro Well überschichtet. Von der linearisierten Plasmid DNA wurden 10 µg in ein steriles Reaktionsgefäß 1 gegeben. In einem sterilen Reaktionsgefäß 2 wurden 900 µl OptiMEM mit 30 µl FuGENE6 (Promega; #E2691) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung aus Reaktionsgefäß 2 tröpfchenweise in Reaktionsgefäß 1 gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In jedes Well der 96 Well Platte wurden dann 5 µl des Transfektionsmediums für 24 bis 48 Stunden gegeben. Danach wechselte man zu 200 µl Selektionsmedium in welchem 100 µg/ml Hygromycin hinzugegeben wurde (Hygromycin B Gold invivoGen; CAS number: 31282-04-9). Erfolgreich transfizierten Zellen entwickelten bei dieser Konzentration eine Hygromycin-Resistenz, wohingegen nicht transfizierte abgetötet wurden. Nach circa 2 Wochen wurden hochgewachsene Klone expandiert und mittels Durchflußzytometer auf GFP Fluoreszenz untersucht. Erfolgreich transfizierte Zellen wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Expression des Rezeptors CD44v6 wurde dabei mittels Western Blot bestimmt.

2.4 Western Blot

Die Expression von CD44v6 in den Zellen wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert. Die 6-Well-Platten mit den Zellen wurden auf Eis gelagert, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden in 50 bis 70 µl eiskaltem Lysepuffer (Tab. 3)

pro Well (9.6 cm²) abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und 24 Stunden beziehungsweise bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tab. 3: Zusammensetzung des Lysepuffers

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

Für die Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde N'-N'-Methylenbisacrylamid verwendet (siehe Tab. 4). Durch die jeweilige Konzentration des Acrylamids wird der Grad der Quervernetzung bestimmt und damit, inwieweit sich große oder kleine Proteine auftrennen. Ein Gel bestand aus einem Sammelgel, in dem sich die Proteine am unteren Rand gesammelt haben und einem Trenngel, welches für die Trennung nach Proteingröße verantwortlich war. In das Sammelgel wurde ein Gelkamm (0.75 mm) eingelegt, welcher die Geltaschen gebildet hatte. Nach dem Gießen musste ein Gel für eine vollständige Polymerisation bei 4°C für mindestens 24 Stunden gelagert werden. Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 20 µl des Proteinlysates und 5 µl 4X Ladepuffer für 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein Gel aufgetragen.

Tab. 4: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele

Komponenten	Ansatz		
	5ml Sammelgel (5%)	10ml Trenngel (10%)	10ml Trenngel (12%)
H₂O	3,05 ml	4,1 ml	3,4 ml
Acrylamid Rotiphorese®	0,65 ml	3,3 ml	4,0 ml
30 Gel (Acrylamid:Bisacrylamid 5:1)			
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 (Natriumdodecylsulfat)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)	25 µl	75 µl	75 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	5 µl	7,5 µl	7,5 µl

Das Gel wurde in eine Kammer mit 1x Laufpuffer (Tab. 5) gelegt und auf eine Spannung von 80-120 V eingestellt. Zur Kontrolle der Proteingrößen wurden die äußeren Geltaschen mit 5 µl eines Molekulargewichtsstandards als Marker beladen (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10-170 kDa, # 26616, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA).

Für den Membrantransfer wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (#1704150; Bio-Rad) mit dem Programm Mixed-MW (molecular weight) verwendet. Erst wurden die Reservoir Stacks in Transferpuffer (Tab. 5) eingelegt. Die PVDF-Membranen (Polyvinylidenfluorid, 0,2 mm Porengröße) wurden für 2 min in Methanol aktiviert und dann in Transferpuffer eingelegt. Danach wurde ein ‚Blotting Sandwich‘ in den Trans-Blot® Turbo™ gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Membran immer feucht ist. Für die Komponenten galt folgende Reihenfolge: Anode - Bottom ion reservoir stack – Membran – Gel – Top ion Reservoir Stack -Kathode.

Der Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgte mithilfe zweier spezifischer Antikörper. Der erste (primäre) Antikörper bindet an das gewünschte Zielprotein an, während der zweite (sekundäre) Antikörper mittels einer chemischen Reaktion für die Visualisierung verantwortlich war. Die Membran wurde zunächst für 1 Stunde in 5 % Milch in TBST (Tris-buffered saline with Tween20) geblockt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen für jeweils 5 min mit TBST (Tab. 5), bevor der Primärantikörper (Tab. 6) auf die Membran gegeben und dann bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert wurde. Am nächsten Morgen erfolgte ein dreimaliges Waschen mit TBST für 5 min, um die nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper (Tab. 6) wurde hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur 1,5 h auf einem Schüttler. Anschließend wurde erneut dreimalig mit TBST für 5 min gewaschen.

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Reagenz nach Haas (Haas, 2005) verwendet (Tab. 5). Das darin enthaltene Luminol wurde durch die Horseradish Peroxidase (HRP) des Sekundärantikörpers oxidiert. Dabei entstand eine Chemolumineszenz, die mittels des Intas Chemocam Imagers detektiert wurde. Das frisch angesetzte ECL (5 ml Solution A + 3 µl H₂O₂ + 500 µl Solution B) wurde lichtgeschützt transportiert und kurz vor Detektion direkt auf die Membran gegeben und mit einer Klarsichtfolie abgedeckt. Damit konnte eine gleichmäßige Verteilung des ECL Reagenz auf der Membran gewährleistet werden.

Zur Auswertung wurden jeweils 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 100 ms aufgenommen. Neben dem Zielprotein (CD44v6) wurde zur Kontrolle auch das Referenzprotein GAPDH erfasst. Die quantitative Auswertung der Western Blots erfolgte mit ImageJ (open-source) Software. Für die jeweiligen Banden wurde die relative Intensität ermittelt und gegen das Referenzprotein normalisiert. Jede Auswertung bestand aus mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Tab. 5: Zusammensetzung der Western Blot Reagenzien

Western Blot Reagenzien	Ansatz
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
Transferpuffer	Trans Blot Turbo RTA Transfer Kit Cat. #1704272, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, Kalifornien, USA
TBS (pH 7,4)	12,1 g Tris Base 43,8 g NaCl Auffüllen auf 500 ml mit Milli-Q H ₂ O
TBST	100 ml 10x TBS (pH 7,4) 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
ECL Solution B	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure 10 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)

Tab. 6: Primäre und sekundäre Antikörper

Protein	primärer Antikörper	Verdünnung (5 % BSA in TBST)	sekundärer Antikörper	Verdünnung (TBST)
CD44v6	Mouse anti-human CD44v6 Biorad MCA1730	1:1000	Goat anti-Mouse HRP #AP308P, Merck Millipore	1:5000
GAPDH	Rabbit anti-GAPD #2118, Cell Signaling	1:3000	Goat anti-Rabbit IgG HRP - #AP132P, Merck Millipore	1:5000

2.5 Koloniebildungstest

Die Überlebensrate der Zellen wurde mithilfe des Koloniebildungstests bestimmt, wie er erstmals von Puck beschrieben wurde (Puck, 1956). Dafür wurden die Zellen nach dem jeweiligen Versuch noch für circa 5 bis 7 Zellteilungen (10 bis 14 Tage) inkubiert. Zum Zählen wurden die Kolonien mit einer Lösung aus 10 % Formaldehyd und 0,1 % Kristallviolett für 10 bis 30 min fixiert und gefärbt. Mithilfe eines Mikroskops wurde dann die Anzahl der Kolonien bestimmt, die aus mehr als 50 Zellen bestanden. Die für unbestrahlte Zellen bestimmte Zahl der Kolonien diente zur Ermittlung der Plattierungseffizienz (PE). Sie ergibt sich aus der Anzahl der Kolonien bei Normierung auf die Zahl der ausgesäten Zellen.

Je nach Zelllinie und Dosis wurden unterschiedliche Zellzahlen (Tab. 7) auf 6 Well Platten (9.6 cm²/Well) ausgesät. Die Überlebensfraktion (survival fraction; SF) der bestrahlten Zellen wurde jeweils auf die PE der unbestrahlten Zellen normiert.

Die auf diese Weise bestimmten Überlebenskurven der Zellen wurden mithilfe der linear-quadratischen Gleichung $SF(D) = \exp -(aD+\beta D^2)$ ausgewertet. D ist dabei die Strahlendosis in Gy und $SF(D)$ die entsprechende Überlebensfraktion.

Die Anpassung der Gleichung an die Daten erfolgte mit GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software), wobei mittels zweiseitigem *t*-Test auf die Signifikanz eines Unterschiedes zwischen zwei Gruppen getestet wurde. Als Signifikanzniveau wurde ein *p*-Wert < 0,05 gewählt.

Tab. 7: Zellzahlen für Kolonietest

asynchron wachsende Kultur			
Zelllinie	UPCI:SCC131 .GFP Kontrolle	UPCI:SCC131 .CD44v3-10.GFP	
Photonen Dosis (Gy)	0	200 - 600	50 - 300
	1	300 - 1.000	100 - 500
	2	500 - 3.000	250 - 800
	4	2.500 - 8.000	1.000 - 4.000
	6	5.000 - 30.000	1.000 - 12.000
	8	20.000 - 80.000	2.000 - 40.000
	10	50.000 - 100.000	40.000 - 60.000

nach Thymidin-Block			
Zelllinie	0h (G1/S-Phase) UPCI:SCC040	4h (S/G2-Phase) UPCI:SCC040	
Photonen Dosis (Gy)	0	50 - 250	100 - 250
	1	100 - 300	100 - 300
	2	100 - 500	100 - 500
	4	400 - 2.000	150 - 700
	6	1.500 - 6.000	200 - 1.500
	8	5.000 - 20.000	300 - 3.000
	10	15.000 - 80.000	2.000 - 15.000

asynchron wachsende Kultur		
Zelllinie	UPCI:SCC040	
¹²C-Ionen Dosis (Gy)	0	200 - 400
	1	300 - 500
	2	800 - 1.500
	3	1.500 - 2.500
	4	4.000 - 6.000

2.5.1 Photonenbestrahlung

Die Photonenbestrahlung wurde mit der Röntgenbestrahlungsanlage (X-RAD 320iX; 320 kV; 8 mA) der Core Facility im Labor für Strahlenbiologie und Strahlentherapie durchgeführt. Es wurde ein Thoräusfilter (0,5 mm Kupfer + 0,5 mm Aluminium) verwendet und mit einer Dosisrate von 1,2 Gy/min bestrahlt. Die zu bestrahlenden Proben wurden auf einer 3 cm dicken Polymethylmethacrylat-Platte als Rückstreukörper gelagert. Vor Beginn der Experimente wurde eine Kontrolldosimetrie durchgeführt.

2.5.2 ¹²C-Ionenbestrahlung

Die Bestrahlung mit ¹²C-Ionen wurde am Marburger Ionenstrahl-Therapiezentrum (MIT) durchgeführt. Dabei wurde mit Energien von 114,5-129,5 MeV/n ¹²C-Ionen, in einem 10 mm Spread Out Bragg Peak (SOBP) bestrahlt. Die zu bestrahlenden Zellkulturgefäße wurden in Kammern aus PMMA-Material gestellt. Für die Bestrahlung wurde die

Bestrahlungskammer um 90° gekippt, sodass der Ionenstrahl horizontal auf die Zellen traf.

2.6 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusverteilung der Zellen wurde mithilfe eines Durchflusszytometers bestimmt. Dafür wurden die Zellen mit 1 ml Accutase aus dem Well gelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Unter leichtem Vortexen wurden dann 2.330 µl eiskaltes Ethanol 99% (-20°C) zugegeben und die Proben bei - 20°C gelagert. Für die Propidiumiodid (PI) Färbung wurden die Proben in der Zentrifuge 5 min bei 300G zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes wurde mit 3 ml PBS gewaschen, in ein FACS-Reaktionsgefäß transferiert und nochmals 5 min bei 300G zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt. Danach wurden 300-500 µl Färbepuffer (Tab. 8) hinzugegeben und bei 4°C für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Das PI interkaliert mit der DNA der Zellen. Die Menge des gebundenen PI korreliert damit mit dem DNA-Gehalt der Zelle.

Tab. 8: Färbepuffer für die Durchflusszytometrie

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

Für die Detektion wurde PI mithilfe eines Laser über die Wellenlänge von 488 nm angeregt und die ausgelöste UV-Emission im PerCP-Fluoreszenzkanal (Peridinin-chlorophyll-Protein Kanal) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software FlowJo 7.5. Durch speziell gewählte Filtereinstellungen konnten Zelldebris und Dubletten ausgeschlossen werden (Abb. 4). Nach dem mathematischen Modell von Watson et al. (Watson et al., 1987) konnte ermittelt werden, wieviel Prozent der Zellen sich in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen befanden (Abb. 4C). Die weitere Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

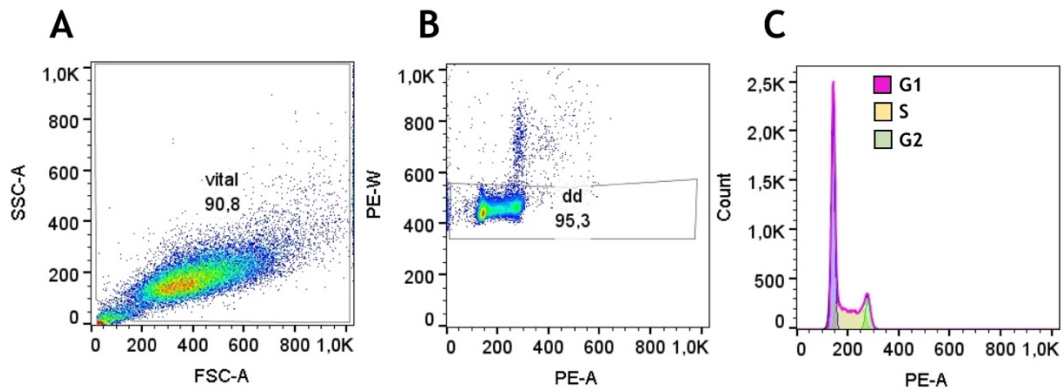


Abb. 4: Zellzyklusanalyse

Beispielhafte Zellzyklusanalyse. A) Ausschluss des Zelldebris durch Festlegung von entsprechenden Schwellen (vital). B) Ausschluss der Dubletten (dd). C) Bestimmung der Zellzyklus-anteile in der G1, S und G2-Phase durch spezielle Algorithmen (Watson et al., 1987).

2.7 Zellzyklussynchronisation

Eine Synchronisation der Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen wurde mithilfe eines Thymidinblocks erreicht. Bei Gabe einer erhöhten Menge an Thymidin werden die Zellen in der G1-Phase unmittelbar vor dem Eintreten der Zellzyklusprogression arretiert (Zhou et al., 2009).

Hierfür wurden die Zellen UPCI:SCC040 in 6 Well Platten (9.6 cm²/Well) ausgesät und für 18 Stunden mit 2 mM Thymidin-haltigem Medium (MTB) inkubiert (T1). Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 2 ml PBS und ein Wechsel auf normales VM (Release; R1). Nach 8 Stunden, 10 Stunden oder 12 Stunden erfolgte die erneute Inkubation mit MTB für weitere 17 Stunden (T2). Es folgte ein zweimaliges Waschen mit 2 ml PBS und ein Wechsel auf normales VM. Anschließend wurde 0 bis 12 Stunden danach die Zellzyklusverteilung mittels des Durchflusszytometers bestimmt.

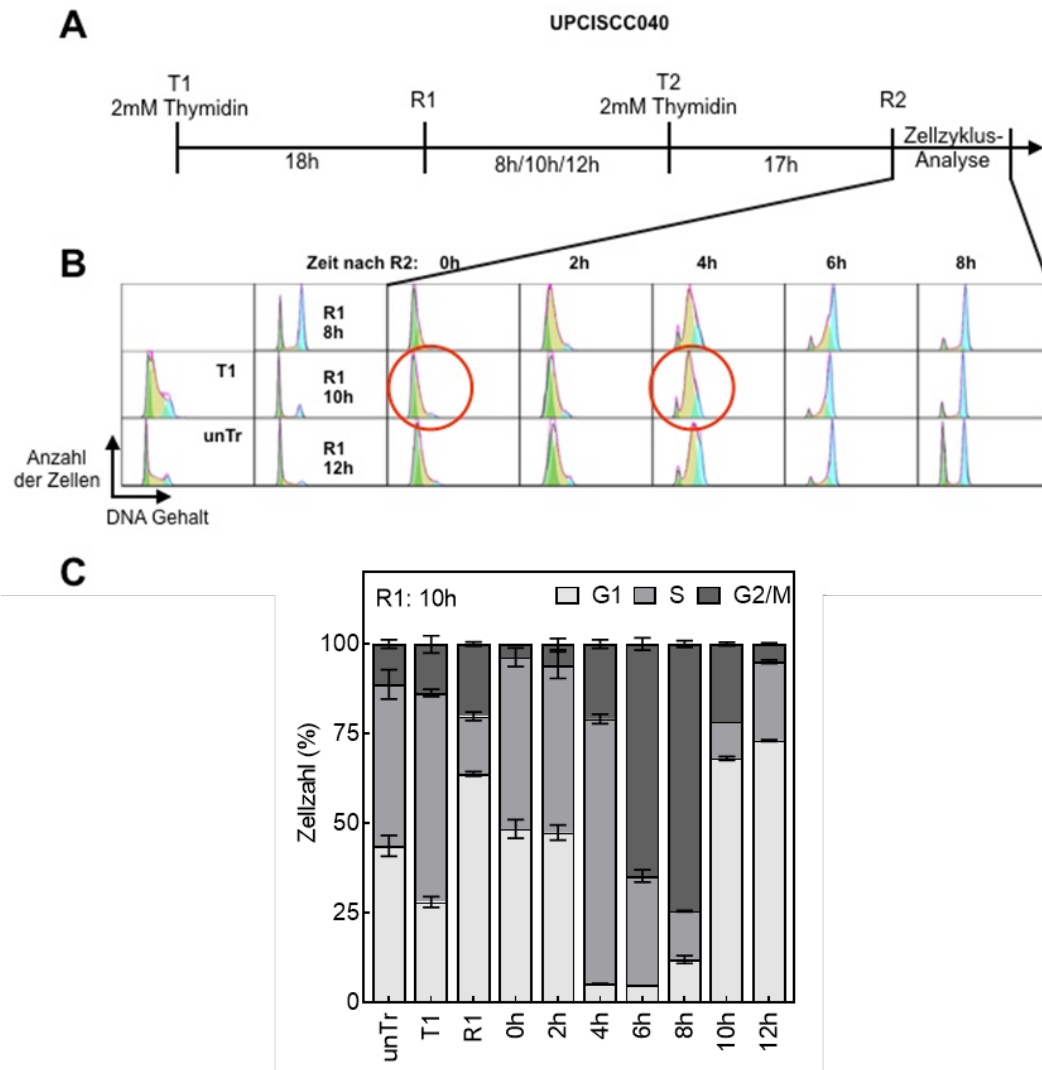


Abb. 5: Zellzyklussynchronisation von UPCI:SCC040 Zellen durch doppelten Thymidinblock.

A) Versuchsschema (T1 = Start des ersten Thymidinblocks. R1 = erster Release; T2 = Start des zweiten Thymidinblocks, R2 = zweiter Release bzw. Start Experiment; unTr = unbehandelt). B) Zellzyklusverteilungen nach doppeltem Thymidinblock; R1 nach 8, 10 oder 12 Stunden. C) Anteile der Zellzyklusphasen nach doppeltem Thymidinblock; R1 nach 10 Stunden.

Die Vorexperimente zeigten, dass sich die Zellen am besten mit einem zwischenzeitigen Release (R1) von 10 Stunden synchronisieren ließen (Abb. 5). Mit diesem Release können zum Zeitpunkt 0h etwa 50% der Zellen in der G1-Phase angereichert werden. Mit weiteren 40% in der S- und 10% in der G2M-Phase. Bei einer Inkubation für 4h konnten dagegen mit einem Anteil von 75% viele Zellen in der S-Phase angereicht werden mit nur noch 5% in der G1- und 20% in der G2-Phase. Diese beiden Zeitpunkte wurden daher für weitere Versuche ausgewählt, um das Verhalten der UPCI:SCC040 in bestimmten Zellzyklusphasen zu bestimmen.

2.8 Behandlung mit Olaparib

Um den Einfluss des PARP1-Inhibitors zu untersuchen, wurde Olaparib verwendet. Die Zellen wurden für den Koloniebildungstest ausgesät und nach 4 Stunden Olaparib (1 $\mu\text{M}/\text{ml}$) hinzugegeben. Nach weiteren zwei Stunden erfolgte die Photonenbestrahlung. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO (1 $\mu\text{M}/\text{ml}$) inkubiert, da Olaparib in DMSO gelöst war. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch normales VM ausgetauscht.

2.9 DNA-Doppelstrangbrüche

Der Nachweis der DSB erfolgte durch die Ko-Färbung der $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ -Foci. Dies gilt als idealer Marker von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) (Chan et al., 2002; Celeste et al., 2003). Dafür wurden die Zellen in 12 Well Platten mit 70.000 Zellen/Well (3,5 cm^2) in 1 ml AB-freiem Medium auf Deckgläschen ausgesät. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert. Dafür mussten die Zellen zuvor mit 1 ml PBS für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen werden. Die Fixierlösung bestehend aus 1 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) wurde hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgten auf dem Schüttler zwei weitere Waschschriffe mit PBS, wonach das Well mit 2 ml PBS aufgefüllt, die Platten mit Parafilm umwickelt und bei 4°C gelagert wurden.

Es folgte eine Permeabilisierung, damit die jeweiligen Antikörper ins Innere der Zelle gelangten. Pro Well wurde 1 ml PBS mit 0,2% Triton X-100 (Permeabilisierungslösung) hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Permeabilisierungslösung wurde entfernt und die Zellen mit 1 ml 1% BSA in PBS pro Well für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde der Waschpuffer entfernt und mit 1 ml 3% BSA in PBS pro Well (Blockierlösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren.

Für die Detektion der Foci wurden 60 μl Antikörperlösung (Tab. 9) pro Deckgläschen angesetzt. Diese wurden in 1% BSA in PBS wie folgt verdünnt: Anti- γH2AX (monoclonal-mouse) 1:500; Anti-53BP1 (polyclonal-rabbit) 1:500. Die Deckgläschen wurden mit der Seite, auf der sich die Zellen befinden, auf Parafilm gelegt und für eine Stunde im Dunkeln mit 60 μl primärer Antikörperlösung inkubiert. Danach erfolgte viermaliges Waschen mit 100 μl Waschpuffer. Die nächsten Schritte mussten unter Abdunkelung durchgeführt werden. Die sekundären Antikörper wurden in 1% BSA in PBS wie folgt verdünnt: AlexaFluor488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) 1:1000; AlexaFluorPlus647 goat anti-mouse IgG (H+L) 1:1000. Nach kurzem Vortexen wurden 60 μl der sekundären Antikörperlösung auf die Deckgläschen gegeben und für eine Stunde im Dunkeln

inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 100 µl Waschpuffer wurden die Deckgläschen auf einen 8 µl Tropfen mit Prolong Gold mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) umgekehrt auf die Objektträger gelegt und für 24 Stunden bei 4°C getrocknet.

Die Analyse der Proben erfolgte mithilfe des Weitfeldmikroskops DM5500 von Leica (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einem Immersionsobjektiv mit 63-facher Vergrößerung. Dafür wurden die Zellen fotografiert und die Fluoreszenzfärbung des γ H2AX und des 53BP1 Signals mit der am Mikroskop integrierten Leica-Software LAS-AF dekonvuliert und mittels der Software *ImageJ* ausgewertet. Nur wenn ein DSB eine Kolokalisation beider FOCI aufwies, wurde in die Analyse einbezogen. Für jede Probe wurden mindestens 100 Zellkerne ausgewertet. Die Anzahl der FOCI wurde auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Tab. 9: Reagenzien für den Nachweis der γ H2AX/53BP1 Foci

Zusammensetzung der Reagenzien und Auflistung der Antikörper für die Darstellung der DSB durch Ko-Färbung der γ H2AX/53BP1 Foci

Reagenzien	Ansatz
Fixierlösung	4 % Paraformaldehyde in 1xPBS
Permeabilisierungslösung	0,2% Triton X-100 in 1xPBS
Blockierlösung	3% BSA in 1xPBS
Waschpuffer	1% BSA in 1xPBS 0,1% Tween 20 (Stock 10%)
Primäre Antikörperlösung	Anti- γ H2AX clone JBW301 (monoclonal-mouse) 1:500 Anti-53BP1 NB 100-305 (polyclonal-rabbit) 1:500 In 1% BSA in 1xPBS
Sekundäre Antikörperlösung	AlexaFluor488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) 1:1000 AlexaFluorPlus647 goat anti-mouse IgG (H+L) 1:1000 In 1% BSA in 1xPBS

3 ERGEBNISSE

Folgendes sind die Ergebnisse, welchen Effekt der Tumorstammzellrezeptor CD44 und da insbesondere die Isoform CD44v3-10, welche das Exon V6 enthält, auf die Wirkung einer Bestrahlung mit Photonen bzw. ^{12}C -Ionen bei HPV-negativen HNSCC-Zellen hat.

3.1 Einfluss von CD44v6 auf das Zellwachstum

Es war zuerst zu untersuchen, wie sich die verminderte bzw. erhöhte Expression von CD44v6 auf die Proliferation der HNSCC-Zellen auswirkt.

Wie in Abb. 6 zu erkennen ist, hat der Tumorstammzellfaktor einen klaren Einfluss auf die Proliferation der HNSCC-Zellen. Bei den UPCI:SCC040-Zellen bewirkt eine Depletion von CD44v6 eine deutliche Verlangsamung der Proliferation (Abb. 6A). Aus dem exponentiellen Anstieg der Wachstumskurven kann für die Kontrolle eine Verdopplungszeit von 26 Stunden berechnet werden, während sich bei Depletion von CD44v6 ein Wert von 32 Stunden ergibt (Tab. 10). Vier Tagen nach Aussaat der gleichen Anzahl an Zellen enthielt die unbehandelte Kultur nahezu doppelt so viele Zellen wie nach KD von CD44v6 (Abb. 6A; 26×10^3 vs. 14×10^3).

Eine entsprechende Beobachtung wurde auch für die Linie UPCI:SCC131 gemacht. Hier bewirkte eine verstärkte Expression von CD44v3-10, welche auch die Isoform V6 enthält, eine deutliche Zunahme in der Proliferation (Abb. 6B). Die Verdopplungszeit in den UPCI:SCC131-Zellen nimmt bei erhöhter Expression von CD44v3-10 von 59 auf 38 Stunden ab (Tab. 10). Hier lagen vier Tage nach der Aussaat in der überexprimierenden Kultur etwa viermal so viele Zellen vor als in den Kontrollzellen (Abb. 6B; 27×10^3 vs. 8×10^3).

Es wurde außerdem beobachtet, dass die parentale Linie UPCI:SCC131 sich mit einer Verdopplungszeit von 41 Stunden wesentlich schneller teilt als die GFP Kontrolle.

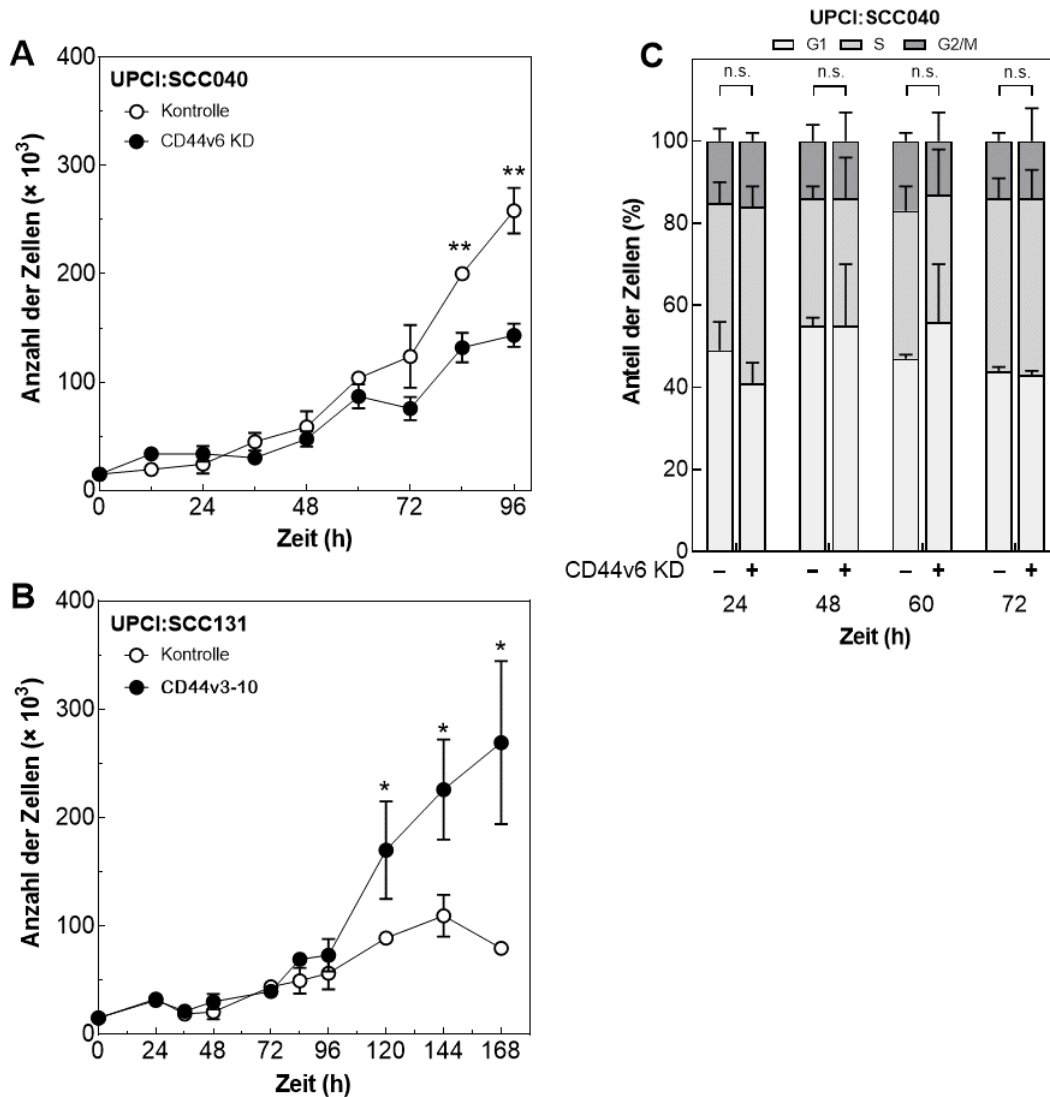


Abb. 6: Einfluss von CD44v6 auf das Zellwachstum.

Zellwachstum von HNSCC-Zellen nach Knockdown von CD44v6 bzw. verstärkter Expression von CD44v3-10. A) Wachstumskinetik von UPCI:SCC040-Zellen mit normaler bzw. unterdrückter Expression von CD44v6. B) Wachstumskinetik von UPCI:SCC131-Zellen mit geringer bzw. erhöhter Expression von CD44v3-10. C) Zellzyklusverteilung von UPCI:SCC040 mit normaler und unterdrückter Expression von CD44v6. Vergleich mittels t-Test; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Die Zellzyklusanalyse (Abb. 6 C) am Durchflusszytometer zeigte, dass die veränderte Expression der Isoformen keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklusphasen hat. Damit wurde deutlich, dass die Isoformen des Stammzellfaktors CD44 nicht zur Verlängerung oder Verkürzung einer bestimmten Zellzyklusphase führen, sondern sich auf alle Phasen in gleicher Weise auswirken.

Tab. 10: Einfluss von CD44v6 auf die Zellverdopplung

Zellwachstum von HNSCC-Zellen nach KD von CD44v6 bzw. verstärkter Expression von CD44v3-10. Aus dem exponentiellen Teil der Wachskurven in Abb. 6 wurde mittels linearer Regression die jeweilige Verdopplungszeit der Zellen bestimmt.

		Verdopplungszeit in Stunden	Zeit in Tagen, bis aus einer Zelle eine Kolonie geworden ist (> 50 Zellen)
UPCI:SCC040	Parental	22	6
	KD Kontrolle	26	6
	CD44v6KD	32	8
UPCI:SCC131	Parental	41	10
	GFP Kontrolle	59	13
	CD44v3-10.GFP	38	9

* Verdopplungszeit DZ der Zellen ergibt sich aus der Steigung k der exponentiellen Wachstumskurve nach $DZ = \ln 2/k$.

3.2 Etablierung der Zelllinien für die weiteren Versuche

3.2.1 Zelllinie mit reduzierter Expression von CD44v6

Um den Einfluss einer verminderten CD44v6 Expression zu untersuchen, wurde die Zelllinie UPCI:SCC040 verwendet, welche eine hohe basale CD44v6 Expression zeigte. Die Zellen wurden mit spezieller siRNA behandelt, um die Expression von CD44v6 zu unterdrücken. Der Western Blot zeigt eine signifikante Reduktion der CD44v6 Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 7). Diese Depletion war über 48 Stunden stabil und die CD44v6 Konzentration stieg erst nach 72 Stunden wieder an.

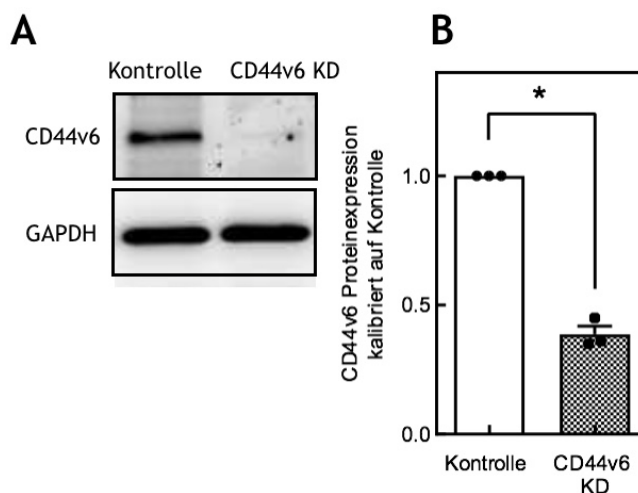


Abb. 7: Reduktion von CD44v6. Unterdrückung der CD44v6-Expression in UPCI:SCC040-Zellen durch siRNA (KD). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit unspezifisch bindender siRNA behandelt (Kontrolle). A) Westernblot. B) Quantitative Auswertung der Proteinexpression (24h). Vergleich mittels t-Test; *, $P < 0,05$.

3.2.2 Zelllinie mit Überexpression von CD44v3-10

Um den Einfluss einer erhöhten CD44v6 Expression zu untersuchen, wurde die Linie UPCI:SCC131 ausgewählt, da sie durch eine niedrige Expression von CD44v6 gekennzeichnet ist. Mittels stabiler Transfektion konnte der Rezeptor CD44v3-10 in Form einer cDNA in dieser Linie überexprimiert werden. Für die Experimente wurden Transfektanten ausgewählt, welche im Western Blot eine hohe CD44v6 Antikörperfärbung (Original Western Blot siehe Abbildung 16) und in der durchflusszytometrischen Analyse eine hohen GFP Fluoreszenz nachweisen konnten. Die Kontrollen wurden auf hohe GFP Fluoreszenz selektiert. Mittels Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass die Überexpression im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie zu einer signifikant erhöhten CD44v6 Expression führte (Abb. 8). Da die cDNA des GFP über eine interne Linkersequenz an das 3'-terminale Ende der cDNA von CD44v3-10 getagged ist, erscheint die Bande für CD44v6 etwas höher (Abb. 8A) und zwar verschoben um das Molekulargewicht von GFP, welches 26,39 kDA beträgt. Im Durchflusszytometer konnte sowohl für die Überexpression als auch für die Kontrolle eine hohe GFP Fluoreszenz bestätigt werden (Abb. 8C).

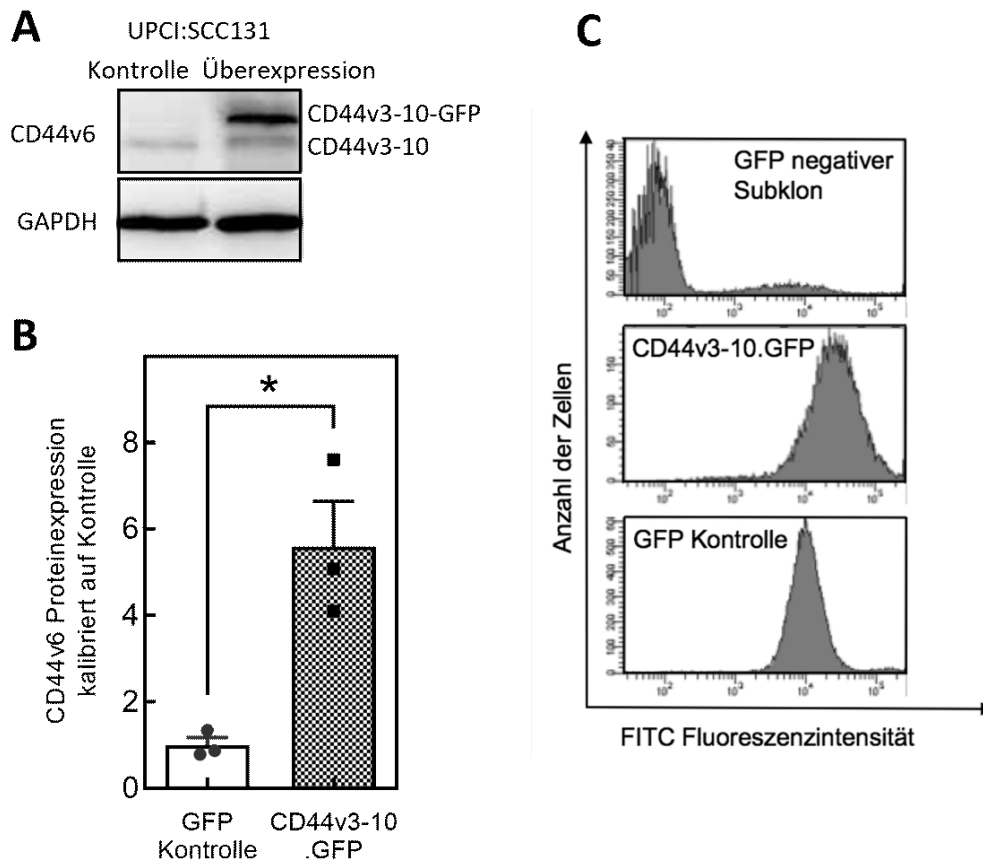


Abb. 8: Überexpression von CD44v6.

Verstärkung der CD44v6-Expression in UPCI:SCC131-Zellen durch stabile Transfektion mit einer cDNA, die den Rezeptor CD44v3-10 sowie das variable Exon v6 enthält. In die Kontrollzellen wurde ein Vektor transfiziert, der das Gen für GFP enthält. A) Westernblot der ausgewählten Linie mit erhöhter CD44v3-10 Expression. B) Quantitative Auswertung der Proteinexpression. C) Nachweis der GFP-Expression in GFP-negativen und positiven Zellen. Mittels Durchflußzytometrie, FITC = Fluoresceinisothiocyanat. Vergleich mittels t-Test; *, P<0,05.

3.3 Einfluss von CD44v6 auf die Zellzyklusregulation nach Bestrahlung

Es sollte überprüft werden, wie sich die veränderte Expression von CD44v6 auf die Zellzyklusregulation nach Photonenbestrahlung auswirkt. Dafür wurde die Zelllinie UPCI:SCC040 mit normaler bzw. verminderter Expression von CD44v6 mit 4 Gy Photonen bestrahlt und anschließend eine Zellzyklusanalyse zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Abb. 9A zeigt die so bestimmten Anteile der Zellzyklusphasen für den Zeitraum 0 bis 72 Stunden nach Bestrahlung. In den ersten 8 Stunden nach Bestrahlung nahm unabhängig vom CD44v6-Level der Anteil der G2/M-Phase von 15% auf 30% zu. Bei längerer Inkubation nimmt dieser Anteil weiter zu, wobei für die Zellen mit verminderter CD44v6-Expression (CD44v6 KD) ein deutlich stärkerer Anstieg beobachtet wurde als für die Kontrollzellen (KD Kontrolle). Ein Maximum wurde nach 24 Stunden erreicht mit einem Anteil 45% in den Kontrollen und 70% in den Zellen mit

reduziertem CD44v6. Dieser G2/M-Arrest blieb ab 24 Stunden für CD44v6 KD stärker und hielt länger an als in den Kontrollen. Dieser Befund machte deutlich, dass durch den KD von CD44v6 der strahleninduzierte G2-Arrest verstärkt wurde. Eine Zunahme im G2-Arrest wird generell beobachtet, wenn in den Zellen eine defekte HR vorliegt. Damit sind diese Ergebnisse ein weiterer Hinweis darauf, dass CD44v6 an der HR beteiligt ist und damit ein Knockdown diesen Reparaturweg beeinträchtigt.

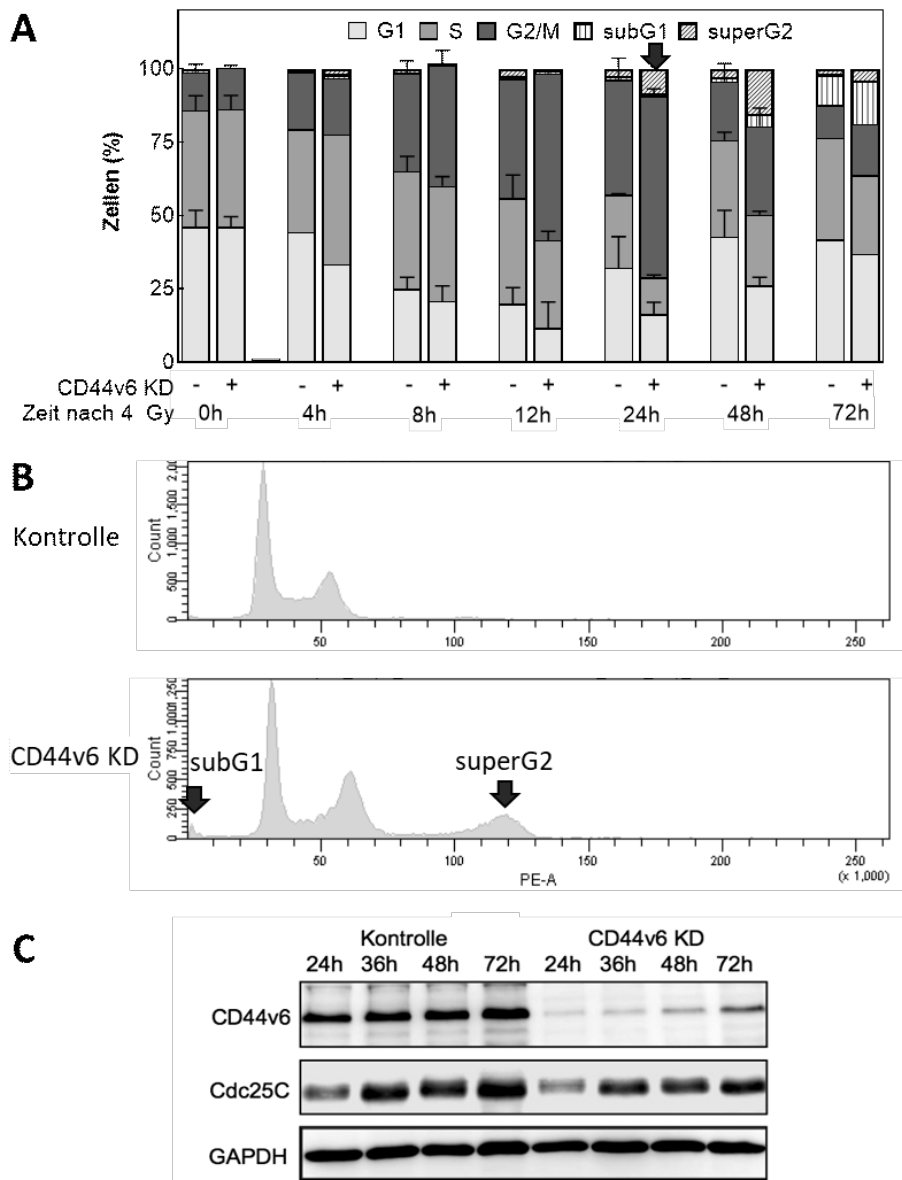


Abb. 9: Wirkung von CD44v6 auf die Zellzyklusregulation nach Bestrahlung. UPCI:SCC040-Zellen mit normalem (Kontrolle) bzw. reduziertem CD44v6 (CD44v6 KD) wurden mit 4 Gy Photonen bestrahlt und nach Inkubation bis zu 72 Stunden die Zellzyklusverteilung mittels Durchflußzytometrie bestimmt. A) Anteile der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase, sowie sub-G1 und super-G2. B) DNA-Histogramm 48 Stunden nach Bestrahlung mit einem super-G2 Peak (Pfeil) in den Zellen mit reduziertem CD44v6. C) Western Blot mit CD44v6 sowie Cdc25C nach Photonenbestrahlung mit 4 Gy.

Des Weiteren wurde nach dem KD von CD44v6 in den DNA-Histogrammen ein signifikanter superG2 Peak festgestellt (Abb. 9B). Dieser zeigte sich insbesondere 48 Stunden nach Bestrahlung. Dies bedeutet, dass beim KD von CD44v6 sich einige Zellen nicht teilen, sodass Zellen mit vierfachem Chromosomensatz entstehen. In den Kontrollen wurden solche Ereignisse nicht registriert.

Die Erstellung des DNA-Histogramms erlaubte auch den Nachweis des subG1-Anteils, welcher durch die sich apoptotisch auflösenden Zellen bestimmt wird (Abb. 9B). Dieser Anteil ist erst nach 72 Stunden detektierbar und unterschied sich nicht wesentlich zwischen CD44v6 KD und den Kontrollen. Dies zeigt, dass der Knockdown von CD44v6 keine Auswirkung auf die strahleninduzierte Apoptose hat.

Es wurde ebenfalls überprüft, ob durch den Knockdown von CD44v6 die Expression der Phosphatase Cdc25C, die ein Schlüsselenzym für den Übergang in die Mitose ist, verändert wurde. Im Western Blot zeigte sich diesbezüglich aber kein auffällender Unterschied (Abb. 9C). Dies machte deutlich, dass die nach dem Knockdown von CD44v6 veränderte Zellzyklusdysregulation nicht durch eine verminderte Expression der Cdc25C Phosphatase bedingt war.

3.4 Einfluss eines KD von CD44v6 auf die Strahlenempfindlichkeit

Abbildung 10 zeigt den Einfluss einer Bestrahlung mit Photonen auf UPCI:SCC040-Zellen mit normaler und reduzierter Expression von CD44v6. Für diesen Versuch wurden die Zellen mit Dosen bis zu 10 Gy bestrahlt und die Überlebensrate mittels des Kolonietests bestimmt.

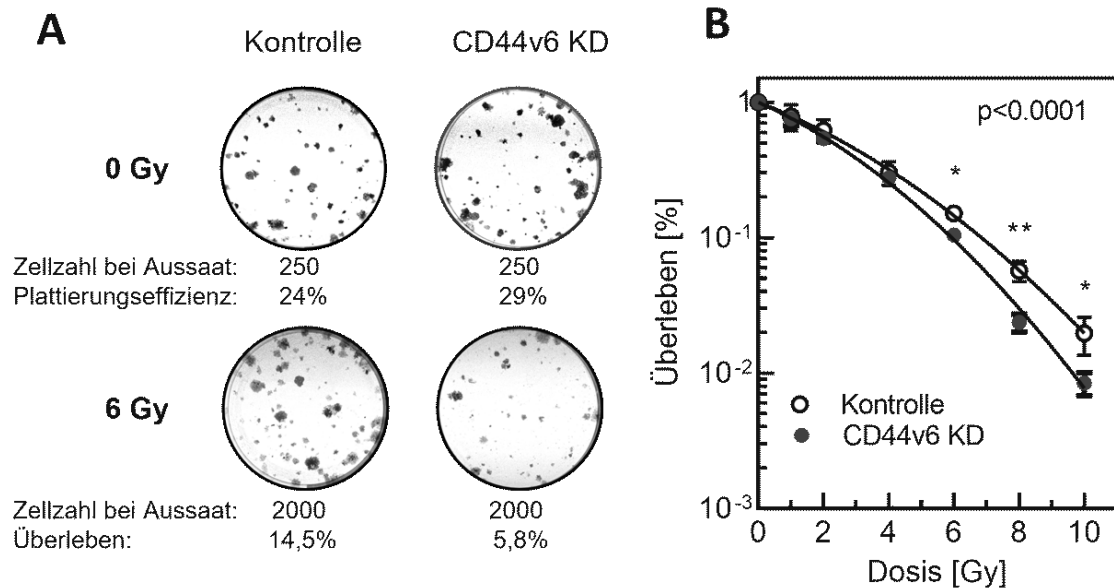


Abb. 10: Wirkung unterdrückter CD44v6 Expression auf die Strahlenempfindlichkeit. In UPCI:SCC040-Zellen wurde CD44v6 mittels siRNA unterdrückt (CD44v6 KD) bzw. zur Kontrolle mit unspezifisch bindender siRNA behandelt (Kontrolle). A) Nachweis der Überlebensrate mittels Kolonietest. B) Überlebensrate der Zellen mit normaler und verminderter CD44v6 Expression. Vergleich mittels t-Test; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Es ist vor allem für hohe Dosen zu erkennen, dass eine Reduktion von CD44v6 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Photonenbestrahlung führt. Um die Überlebensrate auf 10 % zu reduzieren, wurde in den Kontrollen noch eine Dosis von $D_{10} = 6,85$ Gy benötigt, wohingegen bei reduziertem CD44v6 dafür die Dosis von 5,95 Gy reicht. Dies ergab für D_{10} einen Dosisverstärkungsfaktor von 1,15.

3.5 Einfluss einer CD44v3-10-Überexpression auf die Strahlenempfindlichkeit

Der Einfluss einer Überexpression von CD44v3-10 auf die Strahlenempfindlichkeit wurde für die Linie UPCI:SCC131 untersucht. Die beiden Linien mit niedriger bzw. erhöhter Expression von CD44v3-10 wurden mit Dosen bis zu 10 Gy bestrahlt und die Überlebensrate mittels Kolonietest bestimmt (Abb. 11). Es zeigte sich, dass die erhöhte Expression von CD44v3-10 mit einer deutlichen Strahlenresistenz einhergeht. Um das Zellüberleben auf 10% zu reduzieren, war bei den Zellen mit niedriger Expression eine Dosis von $D_{10} = 3,9$ Gy erforderlich, wohingegen bei den Zellen mit überhöhter Expression die entsprechende Dosis bei 5,64 Gy lag. Die Strahlensensibilität nahm um den Faktor 0,69 ab. Damit wurde der wichtige Befund gemacht, dass nicht nur eine Erniedrigung der CD44v6 Expression zu einer Strahlensensibilisierung führt, sondern umgekehrt auch eine Erhöhung der CD44v6 Expression zu einer Strahlenresistenz beiträgt.

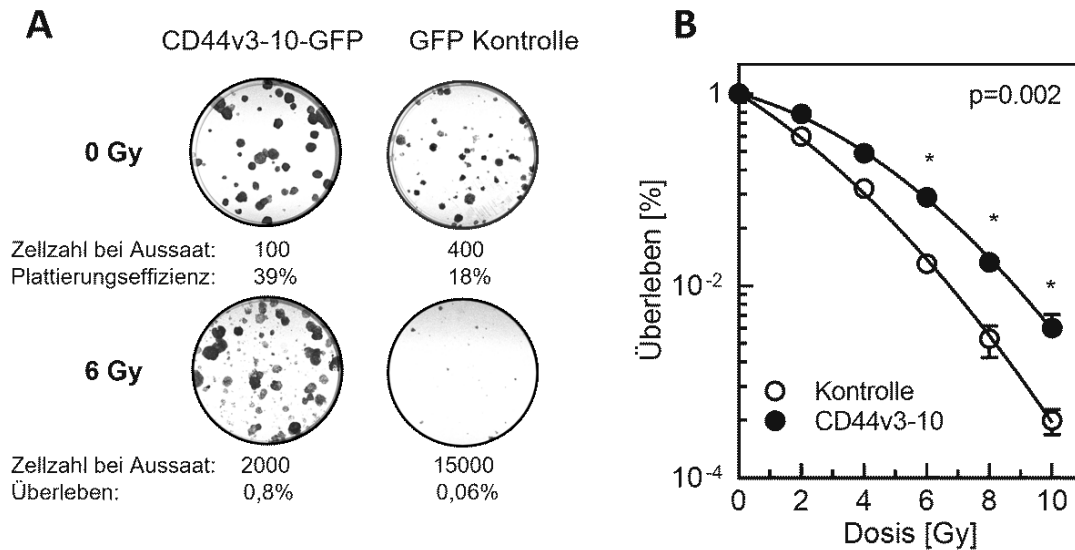


Abb. 11: Wirkung einer CD44v6 Überexpression auf die Strahlenempfindlichkeit.

In UPCI:SCC131-Zellen wurde durch stabile Transfektion mit cDNA eine erhöhte Expression von CD44v3-10 bewirkt, welche mit der Expression von GFP gekoppelt ist (CD44v3-10.GFP). Zur Kontrolle erfolgte eine Transfektion mit GFP allein (GFP Kontrolle). A) Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit mittels Kolonietest. B) Überlebensraten der Zellen nach Photonenbestrahlung mit Dosen bis zu 10 Gy. Vergleich mittels t-Test; *, $P < 0,05$.

3.6 Einfluss des KD von CD44v6 in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Es wurde ebenfalls untersucht, wie die durch den Knockdown von CD44v6 verursachte Strahlensensibilisierung vom Zellzyklus abhängt. Die dafür erforderliche Synchronisation der UPCI:SCC040-Zellen erfolgte mittels eines doppeltem Thymidinblocks (Abb. 12A). Unmittelbar nach dem zweiten Thymidinblock (0 Stunden) befanden sich nahezu 95% der Zellen in der G1-Phase, während nach einem Release von 4 Stunden sich mit ca. 80% die meisten Zellen in der S-Phase befanden (Abb. 12B). Diese Akkumulation ist unabhängig davon, ob CD44v6 durch Knockdown ausgeschaltet wurde.

Wurden die Zellen in der G1-Phase bestrahlt, so hatte der Knockdown von CD44v6 keinen signifikanten Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit (Abb. 12C). Dagegen wurde eine klare Strahlensensibilisierung beobachtet, wenn die Zellen in der S-Phase bestrahlt wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen insgesamt deutlich resistenter waren als bei der Bestrahlung in der G1-Phase, dieser Anstieg aber durch den Knockdown von CD44v6 etwas reduziert wurde. Diese Unterschiede wurden in Abb. 12D noch einmal für die beiden Strahlendosen von 2 und 4 Gy explizit dargestellt. Insbesondere für die Photonenbestrahlung mit 4 Gy ist gut zu erkennen, dass die UPCI:SCC040-Zellen in der S-Phase resistenter waren als in der G1-Phase. Diese Resistenz der S-Phasezellen

konnte durch ein Knockdown von CD44v6 signifikant ($P=0.003$) vermindert werden, während für die G1-Phasezellen keine signifikante Sensibilisierung vorlag ($P=0.440$). Das Überleben der Zellen wird bei Bestrahlung in der G1-Phase vor allem durch die DSB-Reparatur mittels des Nicht-homologen Endjoinings (NHEJ) bestimmt, während bei Bestrahlung in der S-Phase auch die Homologe Rekombination (HR) von Bedeutung ist. Da nach Knockdown von CD44v6 nur für die S-Phasezellen eine Sensibilisierung beobachtet wurde, deuten die Ergebnisse damit an, dass der Stammzellfaktor offensichtlich für die HR von Bedeutung sein muss.

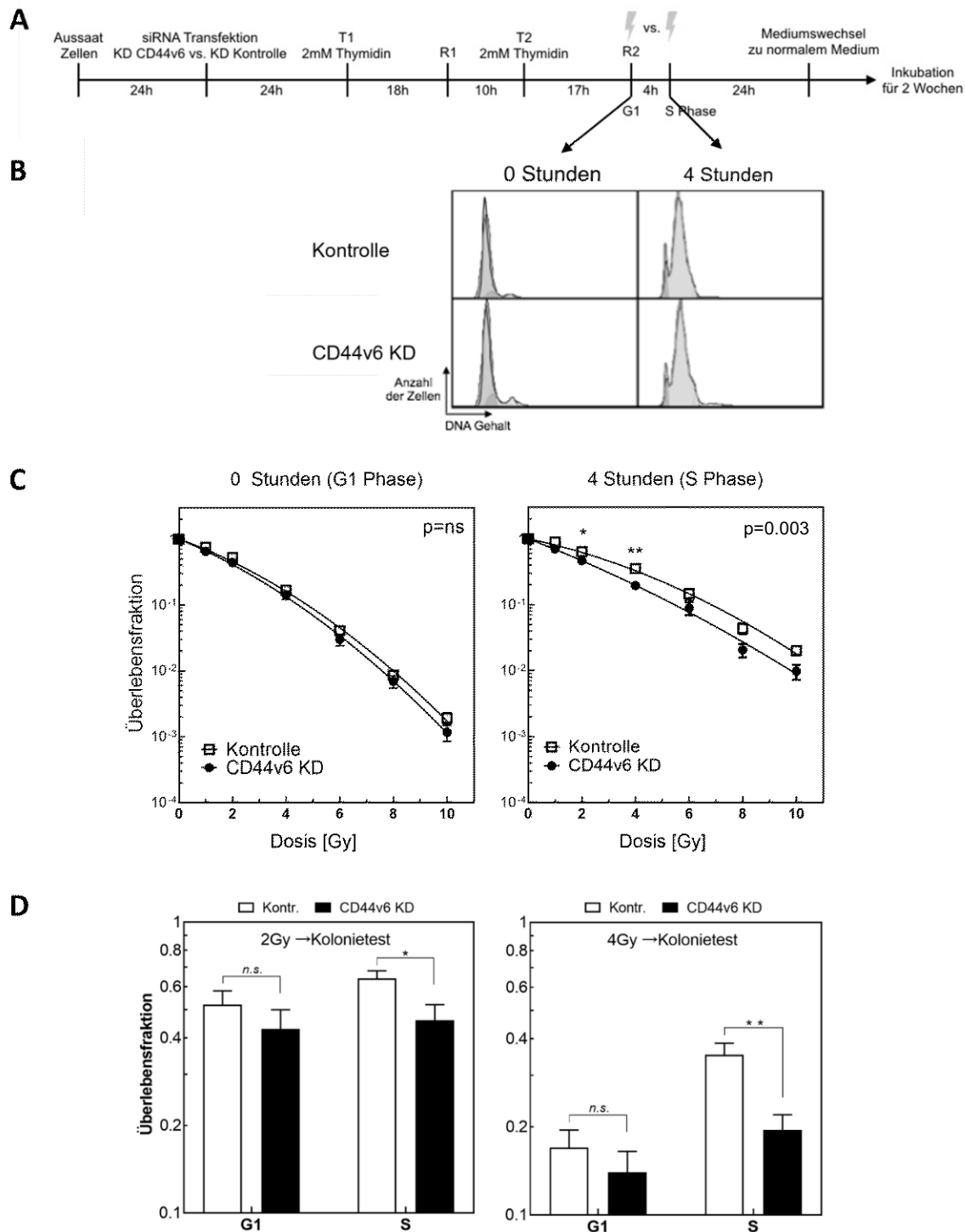


Abb. 12: Wirkung des CD44v6 KD auf die Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit vom Zellzyklus.

In UPCI:SCC040-Zellen wurde nach Knockdown von CD44v6 die Strahlenempfindlichkeit für eine G1- bzw. S-Phasekultur bestimmt. Synchronisation der Zellen mittels doppeltem Thymidinblock. A) Versuchsschema mit doppeltem Thymidinblock (T1 und T2) sowie doppeltem Release (R1 und R2). B) Zellzyklusverteilung der G1- bzw. der S-Phasezellen 0 bzw. 4 Stunden nach dem 2. Release. C) Überlebensrate der G1- (0 Stunden) bzw. der S-Phasekultur (4 Stunden) für CD44v6 KD und KD Kontrolle. D) Überlebensfraktion nach 2 und 4 Gy (SF2; SF4) in den G1- und S-Phasezellen. Vergleich mittels t-Test; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

3.7 Wirkung von Olaparib in Kombination mit CD44v6 KD

Es wurde für die Zelllinie UPCI:SCC040 untersucht, wie sie ein Knockdown von CD44v6 auswirkte, wenn die Zellen zusätzlich mit dem PARP-Inhibitor Olaparib behandelt wurden. PARP ist vor allem an der SSB-Reparatur beteiligt. Bei Hemmung dieser Reparatur durch Olaparib kollidieren vermehrt nicht-reparierte SSB mit der Replikationsgabel, woraus DSB entstehen, die allein durch die HR repariert werden können. Durch Olaparib kann daher bei unterdrückter HR eine besondere Strahlensensibilisierung erreicht werden (Dikomey et al., 2016; Ray Chaudhuri und Nussenzweig, 2017; Turk und Wisinski, 2018).

Für die Versuche wurde in den UPCI:SCC040-Zellen CD44v6 mittels siRNA ausgeschaltet (CD44v6 KD) und diese Zellen für 2 Stunden mit und ohne Olaparib (1µM/ml) behandelt, bevor sie mit Photonen bestrahlt wurden. Die Wirkung auf die Überlebensrate wurde mittels Kolonietest bestimmt (Abb. 13A). In Kontrollzellen mit aktivem CD44v6 bewirkt Olaparib eine deutliche Strahlensensibilisierung (Abb. 13B). Aus den Dosen, mit denen die Überlebensrate jeweils auf 10% reduziert wurde, konnte ein Verstärkungsfaktor von $DVF=1,44$ berechnet werden (Tab. 11).

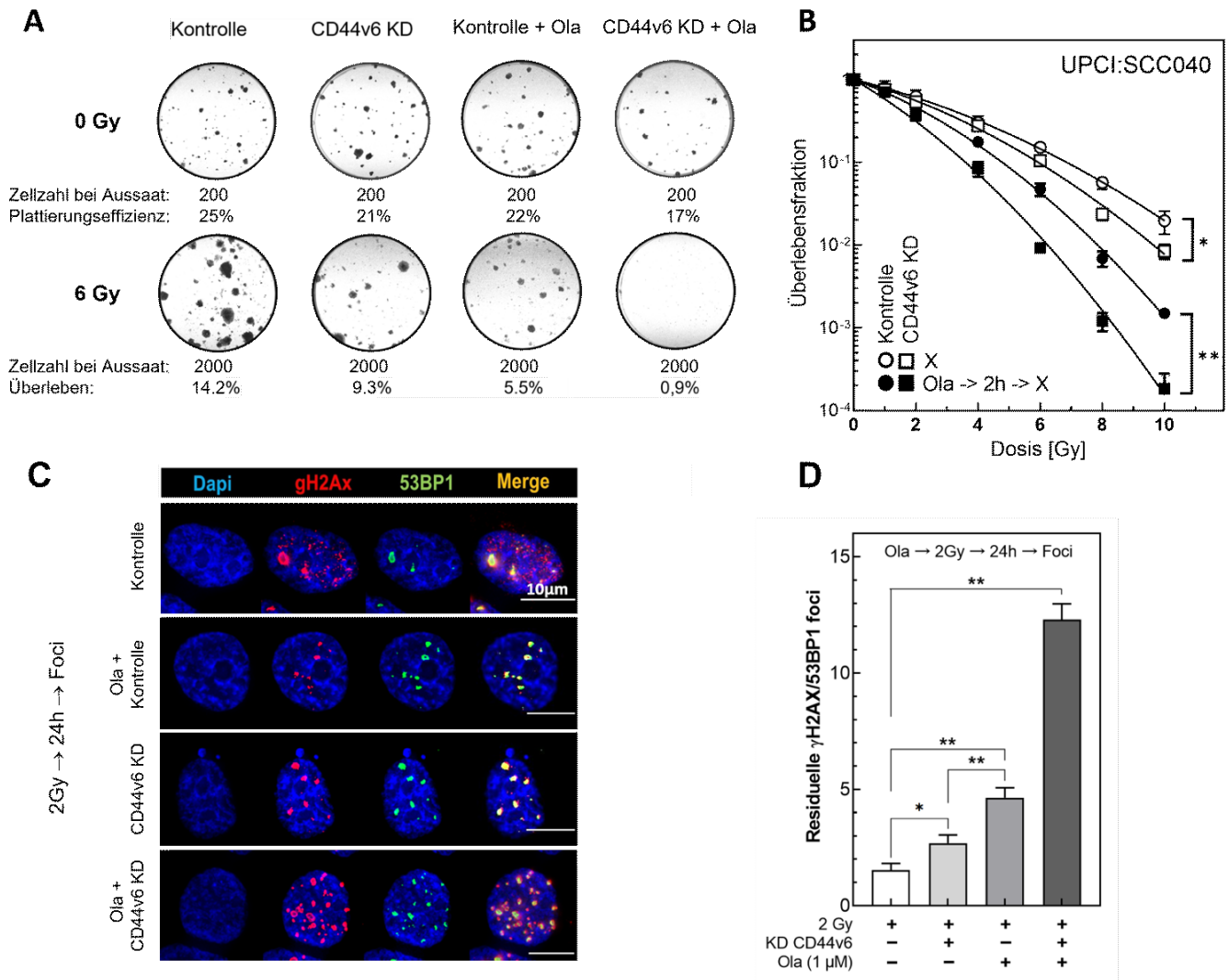


Abb. 13: Wirkung von Olaparib in Kombination mit KD von CD44v6.

UPCI:SCC040-Zellen mit und ohne CD44v6 KD wurden mit Olaparib (1 µM/ml) für 2 Stunden behandelt und dann mit Photonen bestrahlt. A) Nachweis der Überlebensrate mittels Kolonietest. B) Überlebensrate der Zelllinie mit und ohne CD44v6 bei zusätzlicher Vorbehandlung mit Olaparib. C) Nachweis der DSB durch Ko-Färbung der γ H2AX/53BP1-Foci. D) Anzahl residueller Foci 24 Stunden nach 2 Gy Photonenbestrahlung nach Abzug des Hintergrunds. Paarweise Vergleiche mittels t-Test: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Wie zuvor bereits beschrieben (Abb. 10), bewirkte ein KD von CD44v6 allein eine Strahlensensibilisierung mit dem DVF=1,15 (Tab. 11). Wurden diese Zellen zusätzlich mit Olaparib behandelt, so ergab sich eine weitere deutliche Steigerung der Strahlenempfindlichkeit mit insgesamt einem DVF=1,91 (Tab. 11). Es wurde berechnet, welcher Effekt in den Zellen mit CD44v6 KD allein auf Olaparib zurückzuführen ist, so ergab sich eine Verstärkung von DVF=1,65 (Tab. 11). Damit zeigte sich, dass durch Olaparib eine deutlich größere Verstärkung erreicht werden konnte, wenn in den Zellen ein Knockdown von CD44v6 vorlag. Dieser Unterschied deutete ebenfalls an, dass durch

den Knockdown von CD44v6 eine Unterdrückung der HR bewirkt wurde und daher die Strahlensensibilisierung in diesen Zellen so stark ausfiel.

Tab. 11: Strahlensensibilisierung durch Olaparib

CD44v6	Kontrolle		Knockdown	
	Ohne	Mit	Ohne	Mit
Olaparib (1µM)				
D ₁₀ (Gy)	6,85	4,77	5,94	3,59
DVF*	1	1,44	1,15	1,91
DVF**			1	1,65

* Dosisverstärkungsfaktor, DVF; Quotient aus D₁₀ der Kontrolle ohne Gabe von Olaparib sowie der entsprechenden D₁₀;

** Dosisverstärkungsfaktor, DVF; Quotient aus D₁₀ bei Knockdown von CD44v6 sowie der entsprechenden D₁₀:

Für die hier beschriebenen Kombinationen sollte ebenfalls untersucht werden, inwieweit sich die Zunahme in der Strahlenempfindlichkeit, wie sie nach KD von CD44v6 sowie zusätzlicher Behandlung mit Olaparib beobachtet wurde, auf eine Hemmung in der DSB-Reparatur zurückführen lässt. Dafür wurde jeweils die Zahl der residuellen DSB mittels der Ko-Färbung von γ H2AX/53BP1-Foci 24 Stunden nach Bestrahlung gemessen (Abb. 13C). Nach Abzug des Untergrunds lagen in den mit 2 Gy bestrahlten UPCI:SCC040-Zellen 1,5±0,3 residuelle DSB vor. In Zellen mit einem KD von CD44v6 stieg diese Zahl auf 2,7±0,4 DSB (P=0,011) (Abb. 13D). Eine Behandlung der Zellen mit Olaparib (1 µM) zwei Stunden vor der Bestrahlung bewirkte eine Zunahme auf 4,6±0,4 DSB (P<0,001). Wurde für die UPCI:SCC040-Zellen aber nicht nur ein KD von CD44v6 durchgeführt sondern erfolgte zusätzlich eine Behandlung mit Olaparib, stieg diese Zahl sogar auf 12,3±0,7 DSB. Dies ist sowohl im Vergleich zu den Kontrollen ein hoch signifikanter (P<0,0001) Anstieg sowie auch im Vergleich zum alleinigen KD von CD44v6 (P<0,001). Damit machen diese Daten zum einen deutlich, dass die Zunahme der Strahlenempfindlichkeit, wie sie nach einem Knockdown von CD44v6 beobachtet wurde (Abb. 10), auf eine erhöhte Zahl an residuellen DSB und damit auf eine leicht unterdrückte DSB-Reparatur zurückgeführt werden kann. Dieser Effekt war besonders deutlich, wenn die UPCI:SCC040-Zellen, in denen ein CD44v6 KD vorlag, zusätzlich mit Olaparib behandelt wurden. Hier ergab sich einerseits eine deutliche Steigerung in der Strahlenempfindlichkeit sowie andererseits eine deutliche Zunahme in den residuellen DSB.

3.8 Einfluss von CD44v6 auf Zellüberleben nach ¹²C-Ionenbestrahlung

Es wurde ebenfalls untersucht, wie sich ein Knockdown von CD44v6 auf die Wirkung einer Bestrahlung mit ¹²C-Ionen auswirkte. UPCI:SCC040-Zellen, in denen CD44v6 mittels siRNA ausgeschaltet war, wurden mit ¹²C-Ionen mit Dosen bis zu 4 Gy bestrahlt

und das Zellüberleben mittels Kolonietest bestimmt (Abb. 14 A). Im Vergleich zu der Bestrahlung mit Photonen zeigte sich eine deutliche Steigerung der Strahlenempfindlichkeit (Abb. 14B). Der relative biologische Effekt der ^{12}C -Ionen betrug für das Überleben von 10% bei den Kontrollen $\text{RBE}_{10}=3,0$. Für die Zellen mit einem CD44v6 KD ergab sich ein $\text{RBE}_{10}=2,9$.

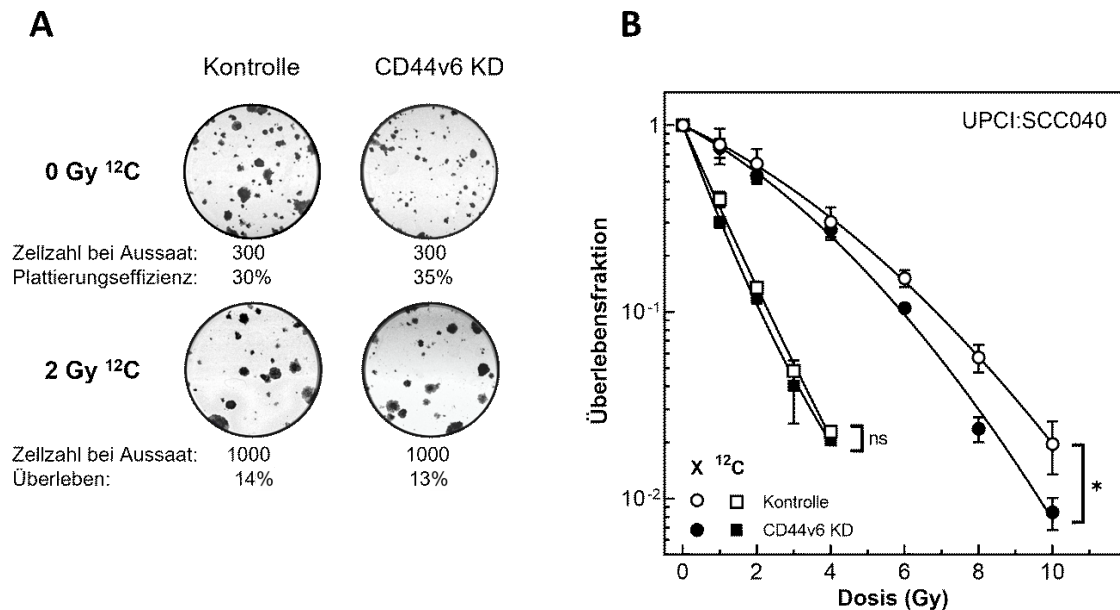


Abb. 14: Einfluss von CD44v6 auf das Zellüberleben nach ^{12}C -Ionenbestrahlung. In UPCI:SCC040-Zellen wurde CD44v6 mittels siRNA unterdrückt bzw. in Kontrollzellen mittels unspezifische bindender siRNA behandelt. ^{12}C -Ionenbestrahlung mit Energien von 114,5-129,5 MeV/n in einem 10 mm Spread Out Bragg Peak (SOBP). A) Koloniebildungstest. B) Überlebensfraktion nach Bestrahlung; Daten für Photonenbestrahlung aus Abb. 9. Vergleich mittels t-Test; *, $P < 0,05$.

Die Daten aus Abbildung 14 zeigen damit, dass bei einem Knockdown von CD44v6 die Zunahme der Strahlenwirkung bei ^{12}C -Ionen etwas geringer war als in den Kontrollzellen mit aktivem CD44v6. Dementsprechend wurde auch beobachtet, dass nach ^{12}C -Ionenbestrahlung im Gegensatz zu der Photonenbestrahlung kein erkennbarer Unterschied im Zellüberleben festzustellen war. Während somit CD44v6 bei Photonenbestrahlung einen eindeutigen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit hat und ein Knockdown eine Sensibilisierung bewirkte, war dies für eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen nicht festzustellen.

4 DISKUSSION

Klinische Daten zeigen, dass bei Patienten mit einem HNSCC eine hohe Expression von CD44v6 mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Heider et al., 2004; Sagawa et al., 2016; Spiegelberg und Nilvebrant, 2017; Linge et al., 2019; Patel et al., 2022). Dies wird auch durch Daten des TCGA (The Cancer Genome Atlas) belegt. Hier zeigt die Analyse, dass HNSCC Patienten mit einer hohen CD44v3-10 Rezeptorexpression, in welchem die Variante v6 enthalten ist, eine deutlich schlechtere Prognose bezüglich des Überlebens haben (The Cancer Genome Atlas Network, 2015; Schötz et al., in Prep.). Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, diesen negativen Einfluss des Rezeptors CD44v6 für HNSCC im Zelllinienmodell funktionell aufzuklären.

Wie in der Methodik bereits erwähnt, gehe ich nochmals kurz auf die methodische Herangehensweise dieser Arbeit ein.

Die Untersuchungen wurden anhand zweier HNSCC-Zelllinien durchgeführt, die sich entweder durch eine hohe (UPCI:SCC040) oder durch eine niedrige (UPCI:SCC131) CD44v6 Expression auszeichneten. In der Linie mit hoher Expression wurde CD44v6 mittels siRNA unterdrückt (CD44v6 KD), um dies mit dem Verhalten der unbehandelten Zellen zu vergleichen. In der Linie mit niedrigem CD44v6 wurde dagegen die cDNA, die CD44v3-10 enthält und auch das variable Exon V6 beinhaltet, stabil in diese Zellen transfiziert, womit eine Überexpression erreicht wurde. Diese beiden Zelllinien bieten damit den Vorteil, die molekularbiologischen Wirkungen von CD44v6 innerhalb eines klar definierten Systems aufzuklären und damit die Grundlage für weiterführende *in vivo* Experimente zu bilden.

4.1 Einfluss von CD44v6 und CD44v3-10 auf die Proliferation

Die Proliferation von Tumorzellen ist ein maßgeblicher prognostischer Faktor bei der Bewertung von Tumoren. Klinisch wird hierfür Ki67 verwendet, um teilungsaktive Zellen immunhistologisch zu erkennen (Scholzen und Gerdes, 2000). In HNSCC geht eine hohe Ki67 Expression, gemessen in histologischen Präparaten, mit einem schlechteren Überleben einher (Fischer et al., 2011). Bei HNSCC wird eine erhöhte Repopulation als einer der häufigsten Gründe für das Scheitern der herkömmlichen Strahlentherapie angesehen (Withers et al., 1988; Bese et al., 2005). Verschiedene Studien haben zudem gezeigt, dass mit zunehmendem Tumolvolumen das Risiko für ein Lokalrezidiv und damit geringeres Überleben steigt (Hoebers et al., 2008; Knejjens et al., 2010).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Wachstumsverhalten von HNSCC-Zellen durch CD44v6 bzw. CD44v3-10 beeinflusst wird. In der Zelllinie UPCI:SCC040

bewirkte ein Knockdown von CD44v6 eine Zunahme der Verdopplungszeit von 26 auf 32 Stunden mit einer zweifach geringeren Zellzahl bereits nach vier Tagen (Abb. 6). Analog zu diesen Ergebnissen wurde in den UPCI:SCC131-Zellen nach Überexpression von CD44v3-10 eine Beschleunigung des Zellwachstums beobachtet. Die Verdopplungszeit nahm nach Überexpression von 59 auf 38 Stunden deutlich ab. Bezüglich der Zellzahl ergab dies nach vier Tagen einen Unterschied von mehr als einem Faktor von vier. Es wurde außerdem beobachtet, dass die parentale Linie UPCI:SCC131 sich mit einer Verdopplungszeit von 41 Stunden wesentlich schneller teilt als die GFP Kontrolle. Ein entsprechend negativer Einfluss von GFP auf das Zellwachstum wurde bereits beschrieben (Ansari et al., 2016).

Einen ähnlichen Effekt von CD44v6 auf die Proliferation von HNSCC wurde auch in der Arbeit von Alvi und Johnson beobachtet (Alvi und Johnson, 1997). Auch für andere Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass CD44v6 einen deutlichen Einfluss auf die Proliferation hat. So nahm bei Ovarialkarzinomzellen die Koloniebildung und auch die Proliferation signifikant ab, wenn CD44v6 durch einen Knockdown ausgeschaltet wurde (Wang et al., 2019). Ähnliches wurde für Pankreaskarzinom- und Colonkarzinomzelllinien beobachtet. Dies wurde u.a. darauf zurückgeführt, dass CD44v6 mit Integrinen und Proteasen interagiert, welche der Zelle Stammzelleigenschaften verleihen (Wang et al., 2016).

Verschiedene Daten deuten außerdem an, dass CD44v6 an der Metastasierung beteiligt ist (Okuyama et al., 2019; Garcia et al., 2019). Ein Knockdown von CD44v6 bewirkt eine verminderte Migration und Invasion der Tumorzellen (Wang et al., 2016). Im Mausmodell konnte anhand einer Pharynxkarzinom-Zelllinie gezeigt werden, dass CD44 an der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt ist, welche für die Metastasierung entscheidend ist (Ihler et al., 2018).

Insgesamt machen die hier erarbeiteten Ergebnisse sowie die Daten aus anderen Publikationen deutlich, warum CD44v6 über seinen Einfluss auf die Proliferation und die Migration ein wichtiger prognostischer Faktor für HNSCC-Patienten ist.

4.2 Bedeutung von CD44v6 auf die Zellzyklusregulation nach Bestrahlung

Tumorzellen reagieren nach Bestrahlung mit einer komplexen Regulation des Zellzyklus. Vor allem beobachtet man das Auftreten eines Arrests in der G2-Phase. Dieser Arrest kann je nach Zelllinie erheblich variieren. Für HNSCC-Zellen hängt dieser Arrest vor allem vom HPV-Status ab, wobei HPV-positiven HNSCC-Zellen generell einen stärkeren G2-Arrest zeigen als HPV-negativen Zellen (Rieckmann et al., 2013; Arenz et al., 2014). In dieser Arbeit wurde erstmalig für eine HPV-negative Linie UPCI:SCC040 gezeigt,

dass durch einen KD von CD44v6 der strahleninduzierte G2-Arrest deutlich verstärkt wird (Abb. 9A). In unbestrahlten Zellen wurde dagegen kein Unterschied in der Zellzyklusprogression gefunden (Abb. 6C). Bei humanen Colon- und Pankreaskarzinom-Ziellinien scheint dagegen ein KD von CD44v6 bereits zu einem deutlichen Anstieg in der G2/M-Phase zu führen (Wang et al., 2016).

Es wurde ebenfalls untersucht, welchen Einfluss CD44v6 auf das Auftreten von apoptotischen Zellen hat. Dies wurde anhand des sub-G1-Anteils in den jeweiligen DNA-Histogrammen bestimmt (Abb. 9A). Es zeigte sich, dass dieser Anteil stets sehr gering war und erst nach 72 Stunden zu erkennen war. Hierbei bestand zwischen CD44v6 KD und den Kontrollen kein nachweisbarer Unterschied. Damit konnte gezeigt werden, dass der KD von CD44v6 keine direkte Auswirkung auf den strahleninduzierten Zelltod hat.

In dieser Arbeit wurde erstmalig beobachtet, dass bei KD von CD44v6 eine Photonenbestrahlung zur Entstehung eines super-G2 Peaks führte (Abb. 9B). In unbestrahlten Zellen sowie in den Kontrollen trat dies nicht auf. Solche tetraploide Zellen entstehen in der Mitose bei Fehlern in der Spindelanordnung, der Chromosomensegregation oder der Zytokinese (Andreassen et al., 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hierfür nicht die für die Mitose wichtige Phosphatase Cdc25C verantwortlich gemacht werden kann, da CD44v6 keinen Einfluss auf die Expression dieses Proteins hat (Abb. 9C).

Für eine korrekte Zytokinese ist vor allem eine Aktin-Assemblierung erforderlich (Andreassen et al., 2001). Bei der Isoform CD44v6 geht durch Fehlen von v6 die intrazelluläre Signalwirkung auf die ERM Proteine verloren, die von der Zelle für den Aufbau des kortikalen Aktin-Zytoskelett benötigt werden (Orian-Rousseau, 2002). Die hier gezeigten Daten deuten damit an, dass diese Interaktion nach Bestrahlung gestört zu sein scheint.

4.3 Bedeutung von CD44v6 für die Strahlenempfindlichkeit

Die Strahlentherapie nimmt eine zentrale Säule in der Therapie des HNSCC ein. Dies gilt insbesondere bei fortgeschrittenen Tumoren. Mehrere klinische Studien zeigen, dass die Heilungswahrscheinlichkeit für HNSCC deutlich geringer ist, wenn sich die Tumore durch eine hohe Expression von CD44v6 auszeichnen (Heider et al., 2004; Sagawa et al., 2016; Spiegelberg und Nilvebrant, 2017; Linge et al. 2019).

Anhand des Koloniebildungstests konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD44v6 einen deutlichen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit nach Photonenbestrahlung hat (Abb. 10 und 11). Ein Knockdown von CD44v6 bewirkte in den UPCI:SCC040-Zellen eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit um den Faktor 1,15 (DVF bei D₁₀; 10%

Zellüberleben). Entsprechend dazu wurde für die Linie UPCI:SCC131 gemessen, dass eine Überexpression von CD44v3-10 eine Abnahme der Strahlenempfindlichkeit um den Faktor 0,69 (DVF bei D_{10}) bewirkte.

Einen ähnlichen Effekt für die Wirkung von CD44v6 auf die Strahlenempfindlichkeit wurde bisher nur für Prostatakarzinomzellen sowohl in vitro als auch in vivo beschrieben (Ni et al., 2020).

Damit zeigen diese Daten, dass die schlechte Prognose, wie sie für HNSCC bei einer hohen CD44v6-Expression festgestellt wurde, auf eine Strahlenresistenz dieser Tumore zurückgeführt werden kann. In zukünftigen Studien sollte daher neben CD44, welcher bereits ein etablierter Stammzellmarker in HNSCC und anderen Tumorentitäten ist, vor allem die Isoform CD44v6 als prognostischer Marker der Strahlenresistenz genutzt werden (Prince et al., 2007; Mack und Gires, 2008; Pries et al., 2008; Chen und Wang, 2019).

In dieser Arbeit wurde erstmalig beschrieben, dass die durch einen KD von CD44v6 bewirkte Strahlensensibilisierung von der Zellzyklusphase abhängt. Ein KD von CD44v6 bewirkte nur für S-Phasezellen eine signifikante Strahlensensibilisierung, nicht jedoch für G1-Phasezellen (Abb. 12). Es ist damit auch zu erwarten, dass die nach Überexpression von CD44v3-10 beobachtete Resistenz (Abb. 11), vor allem auf eine verminderte Strahlenempfindlichkeit der S-Phasezellen zurückzuführen ist. Da Ki67 ein anerkannter Marker für S-Phasezellen ist, wäre in zukünftigen Studien zu überprüfen, ob die schlechte Prognose, wie sie für Tumore mit hoher CD44v6-Expression beschrieben wurde, mit einer hohen Ki67-Expression korreliert (Heider et al., 2004; Sagawa et al., 2016; Spiegelberg und Nilvebrant, 2017; Linge et al., 2019).

Es konnte ebenfalls erstmalig gezeigt werden, dass die nach KD von CD44v6 beobachtete Strahlensensibilisierung durch eine Behandlung mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib weiter gesteigert werden kann. In unbehandelten UPCI:SCC040-Zellen wurde durch die Behandlung mit Olaparib eine Steigerung der Strahlenempfindlichkeit um den Faktor $DVF_{10}=1,44$ erreicht, wohingegen dieser Faktor auf 1,66 stieg, wenn in den Zellen CD44v6 durch einen Knockdown ausgeschaltet wurde (Abb. 13, Tab. 11).

Die strahlensensibilisierende Wirkung eines CD44v6 KD konnte nur für eine Bestrahlung mit Photonen, nicht aber für eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen beobachtet werden. UPCI:SCC0404-Zellen reagieren sehr stark auf eine ^{12}C -Ionenbestrahlung, wobei sich aber im Zellüberleben kein Unterschied bei einem KD von CD44v6 zeigte (Abb. 14). Mit den auf die Photonenbestrahlung bezogenen Verstärkungsfaktoren von DVF_{10} von 2,9 und 3 wurde eine ähnlich starker Effekt für die ^{12}C -Ionenbestrahlung beobachtet, wie zuvor in einer vorhergehenden Studie aus diesem Labor (Lerch et al., 2020). Ähnliche

Faktoren wurden auch von anderen Autoren berichtet (Fokas et al., 2009; Krieger, 2009).

4.4 Einfluss von CD44v6 auf die DSB-Reparatur

Mit dieser Arbeit wurde erstmalig beschrieben, dass CD44v6 sich auch auf die Reparatur der strahleninduzierten DSB auswirkt. Der Nachweis erfolgte dabei über die Detektion der kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci (Abb. 13C), die ein idealer Marker für strahleninduzierte DSB sind (Chan et al., 2002; Celeste et al., 2003; Sak und Stuschke, 2010). Bei Knockdown von CD44v6 nimmt die Zahl der residuellen DSB, die 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2Gy gemessen wurden, signifikant von $1,5\pm 0,3$ auf $2,7\pm 0,4$ zu (Abb. 13D). Diese Zunahme fiel noch stärker aus, wenn die Zellen zusätzlich mit dem PARP-Inhibitor Olaparib behandelt wurden ($4,6\pm 0,4$ vs. $12,3\pm 0,7$; Abb. 13D).

Bei Behandlung mit Olaparib wird die Reparatur der Einzelstrangbrüche (SSB) gehemmt, wodurch mehr nicht-reparierte SSB auf eine Replikation treffen, was zu einer vermehrten Bildung von sogenannten einzelsträngigen DSB führt, die durch die Homologe Rekombination (HR) repariert werden müssen (Farmer et al., 2005; Zhang und Jasin, 2011; Ceccaldi et al., 2016). Da ein Knockdown von CD44v6 gerade unter diesen Bedingungen eine verstärkte Hemmung der DSB-Reparatur bewirkt, deuten diese Daten an, dass CD44v6 offensichtlich an der DSB-Reparatur via HR beteiligt ist. Diese Annahme wird durch die weiteren Beobachtungen gestützt, dass ein KD von CD44v6 den strahleninduzierten G2-Arrest verstärkt (Abb. 9), sowie die Strahlensensibilisierung nur für S-Phasezellen beobachtet wird (Abb. 12). Beide Befunde sind Merkmale einer inhibierten HR (Wilson et al., 2010; Parpys et al., 2015). Diese Schlussfolgerung wird bestätigt durch die weitere Beobachtung, dass nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen kein Effekt des Knockdowns von CD44v6 gefunden wurde (Abb. 14). Aktuelle Daten aus dem Labor deuten an, dass für die durch diese Strahlenart erzeugten DSB die HR von untergeordneter Bedeutung ist (Lerch et al., 2020). Insgesamt legen die hier erhobenen Daten damit erstmalig dar, dass CD44v6 an der DSB-Reparatur via HR beteiligt ist. Dies ist durch weitere Daten abzuklären.

4.5 CD44v6 als Biomarker

Mit dieser Arbeit wird gezeigt, dass die schlechte Prognose von HNSCC bei hoher CD44v6-Expression auf eine erhöhte Strahlenresistenz zurückgeführt werden kann. Die hier vorgestellten Daten zeigen ebenfalls, dass für solche Tumore eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen eine sinnvolle Therapieoption wäre, da sich CD44v6 nicht auf die Wirksamkeit dieser Strahlenart auswirkt.

Wie in dieser Arbeit beobachtet, kann andererseits bei einer Defizienz von CD44v6 die

Kombination einer Photonenbestrahlung mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib eine sinnvolle Strategie sein. In diesem Fall kann durch Olaparib eine deutliche Steigerung der Tumorstrahlenempfindlichkeit erreicht werden. Dies kann insbesondere immer dann eine Option sein, wenn aufgrund der Lokalisation des Tumors für das Normalgewebe starke Nebenwirkungen zu befürchten sind und daher nicht die normalerweise maximal erforderliche Strahlendosis gegeben werden kann.

Daten für HNSCC und Brustkrebs deuten an, dass CD44v6 sich nicht als Target einer zielgerichteten Antikörpertherapie eignet. Eine Behandlung mit Bivatuzumab-Mertansine führte zwar zur teilweisen Stabilisierung der Erkrankung, allerdings wurden auch massive Nebenwirkungen hinsichtlich der Haut festgestellt (Tijink et al., 2006; Rupp et al., 2007; Zöller, 2011). Obwohl die meisten Hautreaktionen reversibel waren, wurden die Phase I Studien zur Dosisfindung abgebrochen, da ein Patient an der Hauttoxizität verstarb.

CD44v6 bleibt allerdings auch weiterhin Gegenstand aktueller Forschung im Hinblick auf neuartige Therapien. So konnten Haist et al. auf CD44v6 gerichtete CAR-T-Zellen etablieren und zeigen, dass diese in Zellkultur zytotoxisch auf vor allem CD44v6-überexprimierende HNSCC Tumorzellen wirkten (Haist et al., 2021).

4.6 Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass CD44v6 einen deutlichen Einfluss auf HNSCC-Zellen hat. CD44v6 stimuliert die Proliferation und erhöht die Resistenz gegenüber einer Photonenbestrahlung. Letzteres wird auf die Beteiligung von CD44v6 an der DSB-Reparatur via HR zurückgeführt. CD44v6 hat dagegen keinen Einfluss auf die Wirkung einer ^{12}C -Ionenbestrahlung. Bei einem HNSCC mit hoher CD44v6-Expression könnte daher die Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen eine sinnvolle Therapieoption sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Neuere klinische Studien zeigen, dass beim HNSCC eine hohe Expression des Stammzellfaktors CD44v6 mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Ziel dieser Arbeit war es, die dafür verantwortlichen molekularen und zellulären Mechanismen aufzuklären. Die Untersuchungen wurden an zwei HNSCC-Zelllinien durchgeführt, die sich durch eine hohe (UPCI:SCC040) bzw. niedrige (UPCI:SCC131) CD44v6-Expression auszeichnen. In der Zelllinie mit hohem Level wurde mittels siRNA die Expression von CD44v6 unterdrückt und in der Linie mit niedrigem Level eine Überexpression durch stabile Transfektion mit entsprechender cDNA erreicht.

Mithilfe dieser Zelllinien konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

1. CD44v6 hat einen deutlichen Einfluss auf die Zellproliferation. Ein KD von CD44v6 bewirkt eine Verlangsamung und dementsprechend eine Überexpression, eine Beschleunigung des Zellwachstums. Dieser Einfluss betrifft alle Zellzyklusphasen.
2. CD44v6 wirkt sich auf die Zellzyklusregulation nach Photonenbestrahlung aus. Ein KD bewirkt eine deutliche Verstärkung des strahleninduzierten G2-Arrests.
3. CD44v6 beeinflusst die Strahlenempfindlichkeit. Dieser Effekt wird allerdings nur nach Bestrahlung mit Photonen, nicht aber nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen beobachtet. Dabei bewirkt ein KD von CD44v6 eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit und eine Überexpression, eine starke Resistenz. Dieser Einfluss von CD44v6 auf die Strahlenempfindlichkeit zeigt sich nur für Zellen in der S- nicht jedoch der G1-Phase. Die Daten mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit nach KD von CD44v6, die insbesondere in S-Phasezellen beobachtet wird und welche einhergeht mit einem verstärkten G2-Arrest, deuten insgesamt darauf hin, dass CD44v6 an der DSB-Reparatur mittels Homologer Rekombination beteiligt ist.
4. Die obige Annahme wird dadurch bestätigt, dass bei KD von CD44v6 durch eine Behandlung mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib eine deutliche Steigerung der Strahlenempfindlichkeit erreicht wird.
5. Beim HNSCC könnte bei hoher CD44v6-Expression die Bestrahlung mittels ^{12}C -Ionen eine sinnvolle Therapieoption sein, da erstmalig gezeigt werden kann, dass die bei hoher Expression von CD44v6 festgestellte schlechte Prognose von HNSCC-Patienten auf eine erhöhte Strahlenresistenz zurückzuführen ist. Diese Resistenz gilt aber nur für die Bestrahlung mit Photonen, nicht aber für ^{12}C -Ionen.

6 SUMMARY

Recent clinical trials indicate that for HNSCC an elevated expression of the stem cell factor CD44v6 is associated with poor prognosis. The aim of this study was to unravel the underlying molecular and cellular mechanisms. The investigation was performed with two HNSCC cell lines characterized either by a high (UPCI:SCC040) or low (UPCI:SCC131) expression of CD44v6. In cell line with high level of CD44v6 expression was knocked-down by specific siRNA, while in cell line with low level the expression was enhanced by stable transfection with respective cDNA.

Using these cell lines the following observations were made:

1. CD44v6 shows a strong effect on cell growth. KD of CD44v6 causes a reduction and, vice versa, an over-expression of CD44v6 a stimulation of cell growth. This effect is valid for all cell cycle phases.
2. After photon-irradiation, CD44v6 also affects cell cycle regulation. KD of CD44v6 was found to enhance the radiation-induced G2-arrest.
3. CD44v6 shows a strong effect on cellular radiosensitivity. However, this effect was only observed when cells were exposed to photons but not to ^{12}C -ions. KD of CD44v6 led to an enhanced radiosensitivity, while overexpression resulted in a strongly enhanced radioresistance. The effect of CD44v6 on radiosensitivity was only apparent when cells were irradiated in S- but not for G1-phase.

The enhanced radiosensitivity observed after KD of CD44v6 as especially seen for S-phase cells, which also coincides with a stronger radiation-induced G2 arrest, indicates that CD44v6 might be involved in DSB repair via homologous recombination.

4. This assumption was further confirmed by the observation, that in cells depleted in CD44v6, radiosensitivity is strongly enhanced when treated by the PARP1-inhibitor Olaparib.
5. For HNSCC showing an elevated expression of CD44v6 treatment with ^{12}C -ions might be the optimal therapy, because it is demonstrated by this report for the first time, that the poor prognosis of HNSCC seen in clinical studies when expression of CD44v6 was high, might result from an enhanced cellular radioresistance. However, this resistance is apparent only when treated by photons but not after ^{12}C -irradiation.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agaimy, A., Weichert, W., 2016. Grading von Tumoren der Kopf-Hals-Region. *Pathol.* 37, 285–292. <https://doi.org/10.1007/s00292-016-0173-9>
- Alvi, A., Johnson, J.T., 1997. Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head Neck* 19, 500–505. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0347\(199709\)19:6<500::aid-hed7>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0347(199709)19:6<500::aid-hed7>3.0.co;2-2)
- Andreassen, P.R., Lohez, O.D., Lacroix, F.B., Margolis, R.L., 2001. Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol. Biol. Cell* 12, 1315–1328. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1315>
- 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., Gillison, M.L., 2010. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 24–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
- Ansari, A.M., Ahmed, A.K., Matsangos, A.E., Lay, F., Born, L.J., Marti, G., Harmon, J.W., Sun, Z., 2016. Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev. Rep.* 12, 553–559. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9670-8>
- Arantes, L.M.R.B., De Carvalho, A.C., Melendez, M.E., Lopes Carvalho, A., 2018. Serum, plasma and saliva biomarkers for head and neck cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 18, 85–112. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1404906>
- Arenz, A., Ziemann, F., Mayer, C., Wittig, A., Dreffke, K., Preising, S., Wagner, S., Klussmann, J.-P., Engenhardt-Cabillic, R., Wittekindt, C., 2014. Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlenther. Onkol.* 190, 839–846. <https://doi.org/10.1007/s00066-014-0605-5>
- Asaithamby, A., Uematsu, N., Chatterjee, A., Story, M.D., Burma, S., Chen, D.J., 2008. Repair of HZE-Particle-Induced DNA Double-Strand Breaks in Normal Human Fibroblasts. *Radiat. Res.* 169, 437–446. <https://doi.org/10.1667/RR1165.1>
- Barnes, B., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Wienecke, A., 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021 <https://doi.org/10.25646/8353>
- Barnes, B., Nowossadeck, E., Schönfeld, I., Wolf, Kraywinkel, K., 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Inst. Hrsg Ges. Epidemiol. Krebsregister Dtschl. EV Hrsg 274.
- Bernhard, E.J., Maity, A., Muschel, R.J., McKenna, W.G., 1995. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression: A review. *Radiat. Environ. Biophys.* 34, 79–83. <https://doi.org/10.1007/BF01275210>
- Bese, N.S., Sut, P.A., Ober, A., 2005. The effect of treatment interruptions in the postoperative irradiation of breast cancer. *Oncology* 69, 214–223. <https://doi.org/10.1159/000087909>
- Bhave, S.L., Teknos, T.N., Pan, Q., 2011. Molecular Parameters of Head and Neck Cancer Metastasis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 21, 143–153. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v21.i2.40>

- 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., Ang, K.K., 2006. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* 354, 567–578. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa053422>
- Börjesson, P.K.E., Postema, E.J., de Bree, R., Roos, J.C., Leemans, C.R., Kairemo, K.J.A., van Dongen, G.A.M.S., 2004. Radioimmunodetection and radioimmunotherapy of head and neck cancer. *Oral Oncol.* 40, 761–772. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2003.11.009>
- Bourhis, J., Overgaard, J., Audry, H., Ang, K.K., Saunders, M., Bernier, J., Horiot, J.-C., Le Maître, A., Pajak, T.F., Poulsen, M.G., O’Sullivan, B., Dobrowsky, W., Hliniak, A., Skladowski, K., Hay, J.H., Pinto, L.H., Fallai, C., Fu, K.K., Sylvester, R., Pignon, J.-P., 2006. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *The Lancet* 368, 843–854. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69121-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69121-6)
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Budach, W., Hehr, T., Budach, V., Belka, C., Dietz, K., 2006. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer* 6, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-28>
- Cardarelli, F., Digiaco, L., Marchini, C., Amici, A., Salomone, F., Fiume, G., Rossetta, A., Gratton, E., Pozzi, D., Caracciolo, G., 2016. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci. Rep.* 6, 25879. <https://doi.org/10.1038/srep25879>
- Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D’Andrea, A.D., 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 26, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., Nussenzweig, A., 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* 5, 675–679. <https://doi.org/10.1038/ncb1004>
- Chan, D.W., Chen, B.P.-C., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J., Chen, D.J., 2002. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* 16, 2333–2338. <https://doi.org/10.1101/gad.1015202>
- Chao, K.S.C., Deasy, J.O., Markman, J., Haynie, J., Perez, C.A., Purdy, J.A., Low, D.A., 2001. A prospective study of salivary function sparing in patients with head-and-neck cancers receiving intensity-modulated or three-dimensional radiation therapy: initial results. *Int. J. Radiat. Oncol.* 49, 907–916. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(00\)01441-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(00)01441-3)
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., Boulton, S.J., 2012. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* 47, 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- Chen, D., Wang, C.-Y., 2019. Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. *Precis. Clin. Med.* 2, 152–165. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz016>

- Ciccia, A., Elledge, S.J., 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* 40, 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- Clarke, M., 2019. Clinical and Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells. *N. Engl. J. Med.* 381, e19. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1908886>
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., Wahl, G.M., 2006. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 66, 9339–9344. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>
- Coates, P.J., Lorimore, S.A., Wright, E.G., 2005. Cell and tissue responses to genotoxic stress. *J. Pathol.* 205, 221–235. <https://doi.org/10.1002/path.1701>
- Coordes, A., Lenz, K., Qian, X., Lenarz, M., Kaufmann, A.M., Albers, A.E., 2016. Meta-analysis of survival in patients with HNSCC discriminates risk depending on combined HPV and p16 status. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 273, 2157–2169. <https://doi.org/10.1007/s00405-015-3728-0>
- 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., Vokes, E.E., 2015. Comparison of outcomes of locoregionally advanced oropharyngeal and non-oropharyngeal squamous cell carcinoma over two decades. *Ann. Oncol.* 26, 198–205. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu511>
- Dikomey, E., Borgmann, K., Köcher, S., Kriegs, M., Mansour, W., Parplys, A.C., Rieckmann, T., Rothkamm, K., 2016. Radiation DNA damage and use in cancer/therapeutics-translation of radiation modifiers, in: *DNA Repair in Cancer Therapy*. Elsevier, pp. 329–352. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803582-5.00011-5>
- Dirks, W.G., MacLeod, R.A.F., Nakamura, Y., Kohara, A., Reid, Y., Milch, H., Drexler, H.G., Mizusawa, H., 2010. Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 126, 303–304. <https://doi.org/10.1002/ijc.24999>
- Du, E., Mazul, A.L., Farquhar, D., Brennan, P., Anantharaman, D., Abedi-Ardekani, B., Weissler, M.C., Hayes, D.N., Olshan, A.F., Zevallos, J.P., 2019. Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *The Laryngoscope* 129, 2506–2513. <https://doi.org/10.1002/lary.27807>
- Durante, M., Bedford, J.S., Chen, D.J., Conrad, S., Cornforth, M.N., Natarajan, A.T., van Gent, D.C., Obe, G., 2013. From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 756, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.014>
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N.J., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N.M.B., Jackson, S.P., Smith, G.C.M., Ashworth, A., 2005. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>
- Fehon, R.G., McClatchey, A.I., Bretscher, A., 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 276–287. <https://doi.org/10.1038/nrm2866>
- Fischer, C.A., Jung, M., Zlobec, I., Green, E., Storck, C., Tornillo, L., Lugli, A., Wolfensberger, M., Terracciano, L.M., 2011. Co-overexpression of p21 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma relative to a significantly poor prognosis. *Head Neck* 33, 267–273. <https://doi.org/10.1002/hed.21440>
- Fokas, E., Kraft, G., An, H., Engenhart-Cabillic, R., 2009. Ion beam radiobiology and cancer: Time to update ourselves. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1796, 216–229.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.07.005>

- Gallatin, W.M., Weissman, I.L., Butcher, E.C., 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304, 30–34. <https://doi.org/10.1038/304030a0>
- Garcia, A.S., Assao, A., Carvalho, A.L., Soares, F.A., Kowalski, L.P., Oliveira, D.T., 2019. The stem cell markers expression CD44v6 and podoplanin in lip cancer: clinical significance. *Virchows Arch.* 474, 745–754. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02539-3>
- Goldman, R., Shields, P.G., 2003. Food Mutagens. *J. Nutr.* 133, 965S-973S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.3.965S>
- Haas, S., 2005. Tricks - ECL-Blots hausgemacht. *Laborjournal Online*.
- Hada, M., Sutherland, B.M., 2006. Spectrum of Complex DNA Damages Depends on the Incident Radiation. *Radiat. Res.* 165, 223–230. <https://doi.org/10.1667/RR3498.1>
- Hagen, T.M., Liu, J., Lykkesfeldt, J., Wehr, C.M., Ingersoll, R.T., Vinarsky, V., Bartholomew, J.C., Ames, B.N., 2002. Feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to old rats significantly improves metabolic function while decreasing oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1870–1875. <https://doi.org/10.1073/pnas.261708898>
- Hagen, T.M., Yowe, D.L., Bartholomew, J.C., Wehr, C.M., Do, K.L., Park, J.-Y., Ames, B.N., 1997. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: Membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3064–3069. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3064>
- Haist, C., Schulte, E., Bartels, N., Bister, A., Poschinski, Z., Ibach, T.C., Geipel, K., Wiek, C., Wagenmann, M., Monzel, C., Scheckenbach, K., Hanenberg, H., 2021. CD44v6-targeted CAR T-cells specifically eliminate CD44 isoform 6 expressing head/neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol.* 116, 105259. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105259>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harper, J.W., Elledge, S.J., 2007. The DNA Damage Response: Ten Years After. *Mol. Cell* 28, 739–745. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.015>
- Hecht, S.S., 2003. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 733–744. <https://doi.org/10.1038/nrc1190>
- Heider, K.-H., Kuthan, H., Stehle, G., Munzert, G., 2004. CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 567–579. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0494-4>
- Heinrich, P.C., Müller, M., Graeve, L., Löffler, G., Petrides, P.E. (Eds.), 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9., vollständig überarbeitete Auflage.* ed, Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin Heidelberg.
- Hoebbers, F.J.P., Pameijer, F.A., de Bois, J., Heemsbergen, W., Balm, A.J.M., Schornagel, J.H., Rasch, C.R.N., 2008. Prognostic value of primary tumor volume after concurrent chemoradiation with daily low-dose cisplatin for advanced-stage head and neck carcinoma. *Head Neck* 30, 1216–1223. <https://doi.org/10.1002/hed.20865>
- Ihler, F., Gratz, R., Wolff, H.A., Weiss, B.G., Bertlich, M., Kitz, J., Salinas, G., Rave-Fränk, M., Canis, M., 2018. Epithelial-Mesenchymal Transition during Metastasis of HPV-Negative Pharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/7929104>

- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J., 2009. Cancer Statistics, 2009. *CA. Cancer J. Clin.* 59, 225–249. <https://doi.org/10.3322/caac.20006>
- Jou, A., Hess, J., 2017. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Oncol. Res. Treat.* 40, 328–332. <https://doi.org/10.1159/000477127>
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., Lahav, G., 2012. Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol. Cell* 47, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.052>
- Knegjens, J.L., Hauptmann, M., Pameijer, F.A., Balm, A.J., Hoebbers, F.J., de Bois, J.A., Kaanders, J.H., van Herpen, C.M., Verhoef, C.G., Wijers, O.B., Wiggeraad, R.G., Buter, J., Rasch, C.R., 2010. Tumor volume as prognostic factor in chemoradiation for advanced head and neck cancer. *Head Neck* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/hed.21459>
- Kopper, L., Hajdú, M., 2004. Tumor stem cells. *Pathol. Oncol. Res.* 10, 69–73. <https://doi.org/10.1007/BF02893458>
- Kraft, G., 1990. The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgengesellschaft* 166, 10–13.
- Kreimer, A.R., Clifford, G.M., Boyle, P., Franceschi, S., 2005. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomark. Prev* 10.
- Krieger, H., 2009. *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*, 3., überarb. und erw. Aufl. ed, Studium. Vieweg + Teubner, Wiesbaden.
- Kuhn, N.Z., Tuan, R.S., 2010. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis. *J. Cell. Physiol.* 222, 268–277. <https://doi.org/10.1002/jcp.21940>
- Lamontagne, C.-A., Grandbois, M., 2008. PKC-induced stiffening of hyaluronan/CD44 linkage; local force measurements on glioma cells. *Exp. Cell Res.* 314, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.07.013>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., Dick, J.E., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Leemans, C.R., Braakhuis, B.J.M., Brakenhoff, R.H., 2011. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2982>
- Lenarz, T., Boenninghaus, H.-G., 2012. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, 14., überarbeitete Auflage. ed, Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin Heidelberg.
- Lerch, S., Berthold, S., Ziemann, F., Dreffke, K., Subtil, F.S.B., Senger, Y., Jensen, A., Engenhardt-Cabillic, R., Dikomey, E., Wittig, A., Eberle, F., Schötz, U., 2020. HPV-positive HNSCC cell lines show strongly enhanced radiosensitivity after photon but not after carbon ion irradiation. *Radiother. Oncol.* 151, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.07.032>
- Linge, A., Lohaus, F., Löck, S., Nowak, A., Gudziol, V., Valentini, C., von Neubeck, C., Jütz, M., Tinhofer, I., Budach, V., Sak, A., Stuschke, M., Balermipas, P., Rödel, C., Grosu, A.-L., Abdollahi, A., Debus, J., Ganswindt, U., Belka, C., Pigorsch, S., Combs, S.E., Mönnich, D., Zips, D., Buchholz, F., Aust, D.E., Baretton, G.B., Thames, H.D., Dubrovskaja, A.,

- Alsner, J., Overgaard, J., Krause, M., Baumann, M., 2016. HPV status, cancer stem cell marker expression, hypoxia gene signatures and tumour volume identify good prognosis subgroups in patients with HNSCC after primary radiochemotherapy: A multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Radiother. Oncol.* 121, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.11.008>
- Linge, A., Schmidt, S., Lohaus, F., Krenn, C., Bandurska-Luque, A., Platzek, I., von Neubeck, C., Appold, S., Nowak, A., Gudziol, V., Buchholz, F., Baretton, G.B., Baumann, M., Löck, S., Krause, M., 2019. Independent validation of tumour volume, cancer stem cell markers and hypoxia-associated gene expressions for HNSCC after primary radiochemotherapy. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* 16, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.03.002>
- Linge, A., Schötz, U., Löck, S., Lohaus, F., von Neubeck, C., Gudziol, V., Nowak, A., Tinhofer, I., Budach, V., Sak, A., Stuschke, M., Balermipas, P., Rödel, C., Bunea, H., Grosu, A.-L., Abdollahi, A., Debus, J., Ganswindt, U., Lauber, K., Pigorsch, S., Combs, S.E., Mönnich, D., Zips, D., Baretton, G.B., Buchholz, F., Krause, M., Belka, C., Baumann, M., 2018. Comparison of detection methods for HPV status as a prognostic marker for loco-regional control after radiochemotherapy in patients with HNSCC. *Radiother. Oncol.* 127, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.12.007>
- Lokeshwar, V.B., 1994. Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J. Cell Biol.* 126, 1099–1109. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.4.1099>
- Mack, B., Gires, O., 2008. CD44s and CD44v6 Expression in Head and Neck Epithelia. *PLoS ONE* 3, e3360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003360>
- Mahaney, B.L., Meek, K., Lees-Miller, S.P., 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.* 417, 639–650. <https://doi.org/10.1042/BJ20080413>
- Mansour, W.Y., Rhein, T., Dahm-Daphi, J., 2010. The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res.* 38, 6065–6077. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq387>
- Martin, C.L., Reshmi, S.C., Ried, T., Gottberg, W., Wilson, J.W., Reddy, J.K., Khanna, P., Johnson, J.T., Myers, E.N., Gollin, S.M., 2008. Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma: Examination of 31 cell lines and review of the literature. *Oral Oncol.* 44, 369–382. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.05.003>
- Matzke-Ogi, A., Jannasch, K., Shatirishvili, M., Fuchs, B., Chiblak, S., Morton, J., Tawk, B., Lindner, T., Sansom, O., Alves, F., Warth, A., Schwager, C., Mier, W., Kleeff, J., Ponta, H., Abdollahi, A., Orian-Rousseau, V., 2016. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer Models by Interference With CD44v6 Signaling. *Gastroenterology* 150, 513-525.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.020>
- Mendelsohn, J., Baselga, J., 2003. Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 2787–2799. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.01.504>
- Milstone, L.M., Hough-Monroe, L., Kugelman, L.C., Bender, J.R., Haggerty, J.G., 1994. Epican, a heparan/chondroitin sulfate proteoglycan form of CD44, mediates cell-cell adhesion. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 11), 3183–3190.
- Mohamad, O., Sishc, B., Saha, J., Pompos, A., Rahimi, A., Story, M., Davis, A., Kim, D.W., 2017. Carbon Ion Radiotherapy: A Review of Clinical Experiences and Preclinical Research, with an Emphasis on DNA Damage/Repair. *Cancers* 9, 66. <https://doi.org/10.3390/cancers9060066>

- Münter, M., Weber, K., 2017. Strahlenbiologie, in: Reiser, M., Kuhn, F.-P., Debus, J. (Eds.), *Duale Reihe Radiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. <https://doi.org/10.1055/b-004-132212>
- Ni, J., Cheung, B.B., Beretov, J., Duan, W., Bucci, J., Malouf, D., Graham, P., Li, Y., 2020. CD44 variant 6 is associated with prostate cancer growth and chemo-/radiotherapy response in vivo. *Exp. Cell Res.* 388, 111850. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111850>
- Okuyama, K., Fukushima, H., Naruse, T., Yanamoto, S., Tsuchihashi, H., Umeda, M., 2019. CD44 Variant 6 Expression and Tumor Budding in the Medullary Invasion Front of Mandibular Gingival Squamous Cell Carcinoma Are Predictive Factors for Cervical Lymph Node Metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* 25, 603–609. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0529-y>
- Orian-Rousseau, V., 2002. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev.* 16, 3074–3086. <https://doi.org/10.1101/gad.242602>
- Orian-Rousseau, V., Morrison, H., Matzke, A., Kastilan, T., Pace, G., Herrlich, P., Ponta, H., 2007. Hepatocyte Growth Factor-induced Ras Activation Requires ERM Proteins Linked to Both CD44v6 and F-Actin. *Mol. Biol. Cell* 18, 76–83. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-08-0674>
- Orth, M., Lauber, K., Niyazi, M., Friedl, A.A., Li, M., Maihöfer, C., Schüttrumpf, L., Ernst, A., Niemöller, O.M., Belka, C., 2014. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat. Environ. Biophys.* 53, 1–29. <https://doi.org/10.1007/s00411-013-0497-2>
- O’Sullivan, B., Huang, S.H., Su, J., Garden, A.S., Sturgis, E.M., Dahlstrom, K., Lee, N., Riaz, N., Pei, X., Koyfman, S.A., Adelstein, D., Burkey, B.B., Friborg, J., Kristensen, C.A., Gothelf, A.B., Hoebbers, F., Kremer, B., Speel, E.-J., Bowles, D.W., Raben, D., Karam, S.D., Yu, E., Xu, W., 2016. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol.* 17, 440–451. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00560-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00560-4)
- Ozdek, A., Sarac, S., Akyol, M.U., Unal, O.F., Sungur, A., 2000. Histopathological predictors of occult lymph node metastases in supraglottic squamous cell carcinomas. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 257, 389–392. <https://doi.org/10.1007/s004050000231>
- Parplys, A.C., Zhao, W., Sharma, N., Groesser, T., Liang, F., Maranon, D.G., Leung, S.G., Grundt, K., Dray, E., Idate, R., Østvold, A.C., Schild, D., Sung, P., Wiese, C., 2015. NUCKS1 is a novel RAD51AP1 paralog important for homologous recombination and genome stability. *Nucleic Acids Res.* gkv859. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv859>
- Patel, U., Kannan, S., Rane, S.U., Mittal, N., Gera, P., Patil, A., Manna, S., Shejwal, V., Noronha, V., Joshi, A., Patil, V.M., Prabhash, K., Mahimkar, M.B., 2022. Prognostic and predictive roles of cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma patients receiving chemoradiotherapy with or without nimotuzumab. *Br. J. Cancer.* <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01730-9>
- Peitzsch, C., Nathansen, J., Schniewind, S.I., Schwarz, F., Dubrovskaya, A., 2019. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Identification, Characterization and Clinical Implications. *Cancers* 11, 616. <https://doi.org/10.3390/cancers11050616>
- Perri, F., Pacelli, R., Della Vittoria Scarpati, G., Cella, L., Giuliano, M., Caponigro, F., Pepe, S., 2015. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications: Radioresistance in HNSCC. *Head Neck* 37, 763–770. <https://doi.org/10.1002/hed.23837>
- Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A., 2003. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>
- Price, K.A.R., Cohen, E.E., 2012. Current Treatment Options for Metastatic Head and Neck

- Cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 13, 35–46. <https://doi.org/10.1007/s11864-011-0176-y>
- Pries, R., Wittkopf, N., Hasselbacher, K., Wollenberg, B., 2008. Konstitutive Expression des potentiellen Stammzellmarkers CD44 in permanenten HNSCC-Zelllinien. *HNO* 56, 461–466. <https://doi.org/10.1007/s00106-008-1707-0>
- Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., Ailles, L.E., 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 973–978. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610117104>
- Puck, T.T., 1956. ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS. *J. Exp. Med.* 103, 653–666. <https://doi.org/10.1084/jem.103.5.653>
- Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., 2017. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>
- Reiß, M. (Ed.), 2021. *Facharztwissen HNO-Heilkunde: differenzierte Diagnostik und Therapie, 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.* ed. Springer, Berlin [Heidelberg].
- Reuschenbach, M., Wagner, S., Würdemann, N., Sharma, S.J., Prigge, E. -S., Sauer, M., Wittig, A., Wittekindt, C., von Knebel Doeberitz, M., Klussmann, J.P., 2016. Humane Papillomviren bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion: Relevanz für Prognose, Therapie und Prophylaxe. *HNO* 64, 450–459. <https://doi.org/10.1007/s00106-016-0123-0>
- Rieckmann, T., Tribius, S., Grob, T.J., Meyer, F., Busch, C.-J., Petersen, C., Dikomey, E., Kriegs, M., 2013a. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother. Oncol.* 107, 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.03.013>
- Rieckmann, T., Tribius, S., Grob, T.J., Meyer, F., Busch, C.-J., Petersen, C., Dikomey, E., Kriegs, M., 2013b. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother. Oncol.* 107, 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.03.013>
- Rupp, U., Schoendorf-Holland, E., Eichbaum, M., Schuetz, F., Lauschner, I., Schmidt, P., Staab, A., Hanft, G., Huober, J., Sinn, H.-P., Sohn, C., Schneeweiss, A., 2007. Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study. *Anticancer. Drugs* 18, 477–485. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32801403f4>
- Sagawa, K., Uwa, N., Daimon, T., Sakagami, M., Tsujimura, T., 2016. Expression of CD44 variant isoforms, CD44v3 and CD44v6, are associated with prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *J. Laryngol. Otol.* 130, 843–849. <https://doi.org/10.1017/S0022215116008525>
- Sak, A., Stuschke, M., 2010. Use of γ H2AX and Other Biomarkers of Double-Strand Breaks During Radiotherapy. *Semin. Radiat. Oncol.* 20, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2010.05.004>
- Satoh, M.S., Lindahl, T., 1992. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356, 356–358. <https://doi.org/10.1038/356356a0>
- Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)
- Schut, H.A.J., Snyderwine, E.G., 1999. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens:

- implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 20, 353–368. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.3.353>
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., Willis, N.A., 2019. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Siomi, H., Siomi, M.C., 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457, 396–404. <https://doi.org/10.1038/nature07754>
- Specenier, P., Vermorken, J.B., 2018. Optimizing treatments for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 18, 901–915. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1493925>
- Spiegelberg, D., Nilvebrant, J., 2017. CD44v6-Targeted Imaging of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Antibody-Based Approaches. *Contrast Media Mol. Imaging* 2017, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/2709547>
- Stöver, I., Feyer, P., 2018. *Praxismanual Strahlentherapie, 2., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage.* ed. Springer, Berlin, Germany.
- Sturgis, E.M., Cinciripini, P.M., 2007. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: An emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 110, 1429–1435. <https://doi.org/10.1002/cncr.22963>
- Suzuki, Y., Kaseř, T., Kanai, K., Ando, M., 2000. Correlation between cell killing and residual chromatin breaks measured by PCC in six human cell lines irradiated with different radiation types. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 1189–1196. <https://doi.org/10.1080/09553000050134429>
- Telmer, C.A., An, J., Malehorn, D.E., Zeng, X., Gollin, S.M., Ishwad, C.S., Jarvik, J.W., 2003. Detection and assignment of TP53 mutations in tumor DNA using peptide mass signature genotyping. *Hum. Mutat.* 22, 158–165. <https://doi.org/10.1002/humu.10248>
- The Cancer Genome Atlas Network, 2015. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517, 576–582. <https://doi.org/10.1038/nature14129>
- Tijink, B.M., Buter, J., de Bree, R., Giaccone, G., Lang, M.S., Staab, A., Leemans, C.R., van Dongen, G.A.M.S., 2006. A Phase I Dose Escalation Study with Anti-CD44v6 Bivatuzumab Mertansine in Patients with Incurable Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck or Esophagus. *Clin. Cancer Res.* 12, 6064–6072. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0910>
- 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., 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. *Eur. J. Cancer* 51, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.12.018>
- Tuhkanen, A.-L., Ågren, U.M., Tammi, M.I., Tammi, R.H., 1999. CD44 Expression Marks the Onset of Keratinocyte Stratification and Mesenchymal Maturation into Fibrous Dermis in Fetal Human Skin. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1617–1624. <https://doi.org/10.1177/002215549904701213>
- Turk, A.A., Wisinski, K.B., 2018. PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside: PARP Inhibition in BRCA-Mutant Breast CA. *Cancer* 124, 2498–2506. <https://doi.org/10.1002/cncr.31307>

- Vigneswaran, N., Williams, M.D., 2014. Epidemiologic Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.* 26, 123–141. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2014.01.001>
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Harris, C.C., 1999. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 3706–3711. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3706>
- Wang, Y., Yang, X., Xian, S., Zhang, L., Cheng, Y., 2019. CD44v6 may influence ovarian cancer cell invasion and migration by regulating the NF-κB pathway. *Oncol. Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10306>
- Wang, Z., von Au, A., Schnölzer, M., Hackert, T., Zöller, M., 2016. CD44v6-competent tumor exosomes promote motility, invasion and cancer-initiating cell marker expression in pancreatic and colorectal cancer cells. *Oncotarget* 7. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10580>
- Wang, Z., Zhao, K., Hackert, T., Zöller, M., 2018. CD44/CD44v6 a Reliable Companion in Cancer-Initiating Cell Maintenance and Tumor Progression. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 97. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00097>
- Watson, J.V., Chambers, S.H., Smith, P.J., 1987. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.990080101>
- Weber, U., Kraft, G., 2009. Comparison of Carbon Ions Versus Protons: *Cancer J.* 15, 325–332. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181b01935>
- 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., 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 Oncol.* 43, 701–712. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2006.09.001>
- Wilson, P.F., Hinz, J.M., Urbin, S.S., Nham, P.B., Thompson, L.H., 2010. Influence of homologous recombinational repair on cell survival and chromosomal aberration induction during the cell cycle in γ-irradiated CHO cells. *DNA Repair* 9, 737–744. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.03.009>
- Withers, H.R., Maciejewski, B., Taylor, J.M., Hliniak, A., 1988. Accelerated repopulation in head and neck cancer. *Front. Radiat. Ther. Oncol.* 22, 105–110. <https://doi.org/10.1159/000415101>
- Wittekindt, C., Wagner, S., Mayer, C.S., Klussmann, J.P., 2012. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg.* 11Doc09 ISSN 1865-1011. <https://doi.org/10.3205/CTO000091>
- Wittekindt, Wagner, S., Mayer, C., Klußmann, J., 2012. Grundlagen der Tumorentstehung und die Bedeutung Humaner Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen. *Laryngo-Rhino-Otol.* 91, S1–S26. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1297241>
- Wolff, K.-D., Follmann, M., Nast, A., 2012. The Diagnosis and Treatment of Oral Cavity Cancer. *Dtsch. Aerzteblatt Online.* <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0829>
- Wozny, A.-S., Lauret, A., Battiston-Montagne, P., Guy, J.-B., Beuve, M., Cunha, M., Saintigny, Y., Blond, E., Magne, N., Lalle, P., Ardail, D., Alphonse, G., Rodriguez-Lafrasse, C.,

2017. Differential pattern of HIF-1 α expression in HNSCC cancer stem cells after carbon ion or photon irradiation: one molecular explanation of the oxygen effect. *Br. J. Cancer* 116, 1340–1349. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.100>
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., Fornace, A.J., 1999. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18, 2892–2900. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202667>
- Zhang, Y., Jasin, M., 2011. An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 80–84. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1940>
- Zhou, J., Haggerty, J.G., Milstone, L.M., 1999. Growth and differentiation regulate CD44 expression on human keratinocytes. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* 35, 228–235. <https://doi.org/10.1007/s11626-999-0031-7>
- Zhou, J.-Y., Ma, W.-L., Liang, S., Zeng, Y., Shi, R., Yu, H.-L., Xiao, W.-W., Zheng, W.-L., 2009. Analysis of microRNA expression profiles during the cell cycle in synchronized HeLa cells. *BMB Rep.* 42, 593–598. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2009.42.9.593>
- Zirkle, R.E., Tobias, C.A., 1953. Effects of ploidy and linear energy transfer on radiobiological survival curves. *Arch. Biochem. Biophys.* 47, 282–306. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(53\)90467-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(53)90467-6)
- Zöller, M., 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254–267. <https://doi.org/10.1038/nrc3023>

8 ANHANG

8.1 Alphabetische Auflistungen der Chemikalien und Reagenzien, Materialien, Geräte und Software

Tab. A1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Firma
53BP1 Antibody NB 100-305 (rabbit, polyclonal)	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
Accutase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
AlexaFluor488 donkey anti-rabbit IgG (donkey, monoclonal)	Thermo-Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
AlexaFluorPlus647 goat anti-mouse IgG (goat, monoclonal)	Millipore Corporation, Temecula, CA, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aqua	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
DAPI-Stocklösung, 200ng/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM Medium	Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
Ethanol (reinst)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (vergällt)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Fetales Rinder Serum (FCS) Cat No: FBS-11A	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Hygromycin B Gold (CAS number: 31282-04-9)	invivoGen, San Diego, Kalifornien, USA
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Fluka Analytical, Buchs, SG, Schweiz
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P0781)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,

	Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
phospho-histone 2AX, clone JBW301 (mouse, monoclonal)	Millipore Corporation, Temecula, CA, USA
Prolong Gold antifade reagent with Dapi	Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
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
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Scrambled RNAi stealth negative control	Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
siRNA si1230 CD44v6	Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trans Blot Turbo RTA Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, Kalifornien, USA
Tris hydroxymethyl-aminomethan (Tris)-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Triton-x 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland / Serva
Trypsin (1 x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H2O2)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien

Tab. A2: Auflistung der verwendeten Materialien

Materialien	Größe / Abmessung	Firma
Deckgläschen	15 mm Durchmesser	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Multiwell Platten	6-well, 12-well, 24-well, 96-well	BD Biosciences, Heidelberg
SuperFrost®Plus Objektträger	25 x 75 x 1 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland

Pipettenspitzen	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Probenröhrchen	5 ml für Durchflusszytometrie	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkulturgefäße	25cm ² ; 75 cm ² ; 175 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	16 cm	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. A3: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Firmenname	Firma
¹² C-Carbonion Bestrahlung		Marburger Ionenstrahltherapiezentrum, Deutschland
Autoklav	V-65	Systemec GmbH, Linden, Deutschland
Bestrahlungsgerät	X-RAD 320iX (1 Gy / min)	Precision X-ray, Inc. North Branford/CT, USA
Blotkammer	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BD Bioscience, Erembodegem, Belgien
Chemilumineszenz- Imager	ChemoCam Imager 3.2	Intas Science Imaging, Instruments GmbH Göttingen
CO ₂ -Inkubator	INCO153med	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer	BD LSR II Flow Cytometer	BD Bioscience, Erembodegem, Belgien
FACS Sorting	MoFlo™ Astrios	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Feinwaage	Summit SI-64	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Gefrierschrank -20 °C	MediLine LKPV 6520	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Herafreeze Typ HFU 586 Basic	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gelkammer	PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin ExWS	Peqlab Technologies GmbH, Erlangen
Heizblock	ThermoCell CHB-202	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China
Kurzzeitmesser	TR118	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Mikroliterpipetten	Reference® 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroliterpipetten	Research® plus 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop für CFA	Inverted microscope CKX41 Motorised research inverted	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg

	system microscope IX81	
Mikroskope	-Motorised research inverted system microscope IX81 - CKX41 - Weitfeldmikroskop DM5500 - DMIL LED	Olympus, Hamburg, Deutschland Leica, Wetzlar, Deutschland
Pipettierhelfer	accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhelfer	PIPETBOY	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Sterilbank	HERASAFE KS 12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Universalzentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

Tab. A4: Auflistung der verwendeten Software

Software	Firma
FlowJo	FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
ImageJ	open-source
Intas Imaging	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Germany
iWorks	Apple Inc., CA, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Olympus CellSense	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Pubmed	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Zotero	Corporation for Digital Scholarship, Roy Rosenzweig Center for History and New Media at George Mason University, USA

8.2 Ergänzende Abbildungen und Informationen

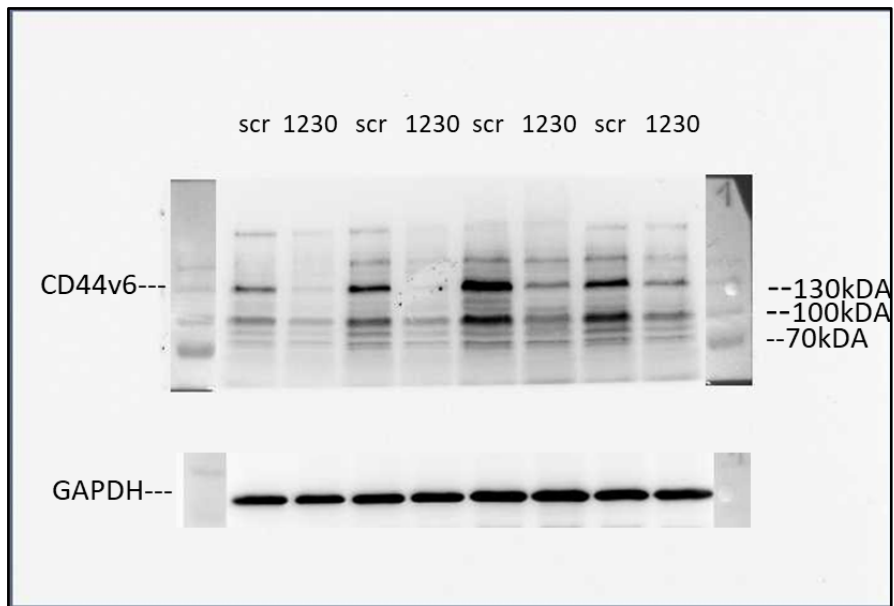


Abb. 15: Knockdown von CD44v6 in UPCI:SCC040-Zellen
Knockdown von CD44v6 in UPCI:SCC040-Zellen mittels siRNA. scr = KD Kontrolle, 1230 = siRNA CD44v6 KD.

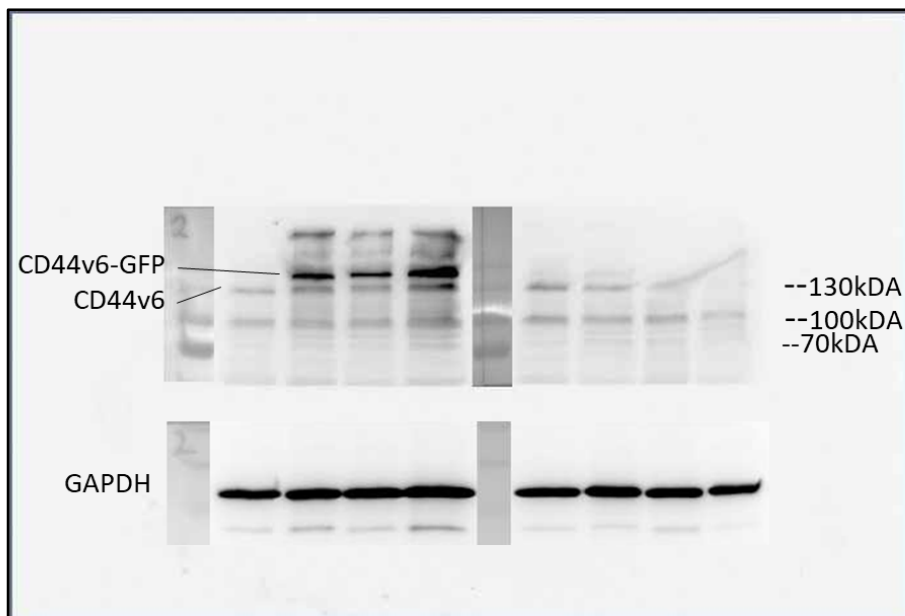


Abb. 16: Überexpression von CD44v6 in UPCI:SCC131-Zellen.
Überexpression von CD44v6 in UPCI:SCC131-Zellen. Western Blot nach stabiler Plasmidtransfektion von CD44v3-10; P = parentale Zellen unbehandelt; Sc = Subclone; 1G11 und 1G11.1 = GFP Kontrollklone.

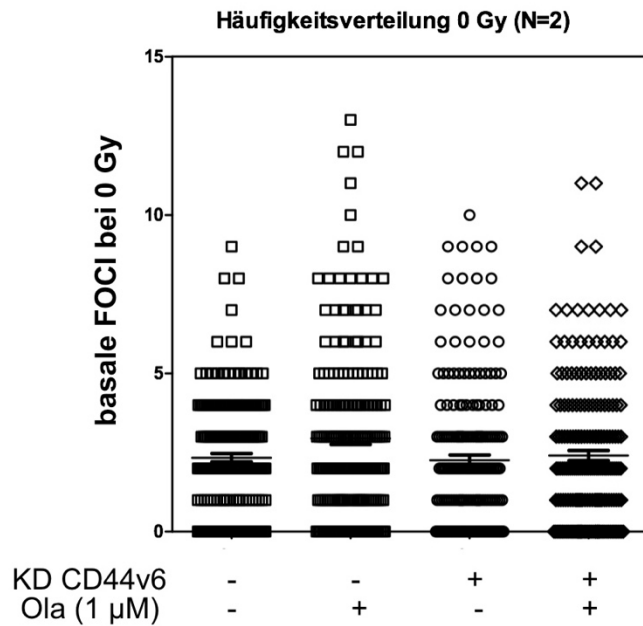


Abb. 17: Häufigkeitsverteilung der γ H2AX/53BP1 Foci in unbestrahlten Zellen. Nachweis der γ H2AX/53BP1 Foci in unbestrahlten UPCI:SCC040-Zellen. Pro Versuch Auswertung von mindestens 100 Zellen.

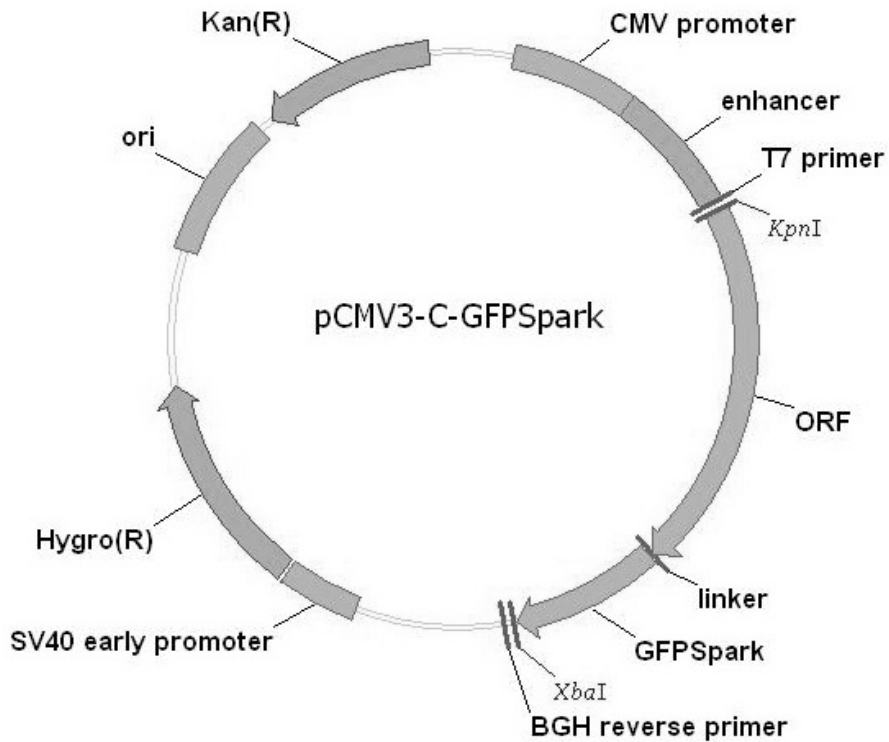


Abb. 18: Plasmidkarte von CD44v3-10. Human CD44 Gene ORF cDNA clone expression plasmid, C-GFPSpark tag (HG12211-ACG) Entspricht CD44v3-10 (Sinobiologicals)

Nukleotidsequenz (Grau: CD44v3-10 Gelb: Linker-DNA Grün: GFP)

```
ATGGACAAGTTTTGGTGGCAGCAGCCTGGGGACTCTGCCTCGTGCCGCTGAGCCTGGCGCAGATCGATTTGAATATA
ACCTGCCGCTTTGCAGGTGTATTCCACGTGGAGAAAAATGGTCGCTACAGCATCTCTCGGACGAGGCCGCTGACCTC
TGCAAGGCTTTCAATAGCACCTTGCCACAATGGCCAGATGGAGAAAGCTCTGAGCATCGGATTTGAGACCTGCAGG
TATGGGTTTCATAGAAGGGCATGTGGTGTATCCCGGATCCACCCAACTCCATCTGTGCAGCAAACAACACAGGGGTG
TACATCCTCACATCCAACACCTCCAGTATGACACATATTGCTTCAATGCTTCAGCTCCACCTGAAGAAGATTGTACA
TCAGTCACAGACCTGCCCAATGCCTTTGATGGACCAATTACCATAACTATTGTTAACCGTGATGGCACCCGCTATGTC
CAGAAAGGAGAATACAGAACGAATCCTGAAGACATCTACCCAGCAACCCTACTGATGATGACGTGAGCAGCGGCTCC
TCCAGTGAAGGATATCGCCAAACACCCAGAGAAGACTCCCATTCGACAACAGGGACAGCTGCACCTCCAGACGAAGAC
AGTCCCTGGATCACCGACAGCACAGACAGAAATCCCTGCTACCAGTACGTCTTCAAATACCATCTCAGCAGGCTGGGAG
CCAAATGAAGAAAATGAAGATGAAAGAGACAGACACCTCAGTTTTTCTGGATCAGGCATTGATGATGATGAAGATTTT
ATCTCCAGCACCATTTCAACCACACCACGGGCTTTTGACCACACAAAACAGAACCAGGACTGGACCCAGTGGAAACCA
AGCCATTCAAATCCGGAAGTCTACTTCAGACAACCACAAGGATGACTGATGTAGACAGAAATGGCACCCTGCTTAT
GAAGGAACTGGAACCCAGAAGCACACCTCCCTCATTACCATGAGCATCATGAGGAAGAAGAGACCCACATTTCT
ACAAGCACAATCCAGGCACTCCTAGTAGTACAACGGGAAGAAACAGCTACCCAGAAGGAACAGTGGTTTGGCAACAGA
TGGCATGAAGGATATCGCCAAACACCCAGAGAAGACTCCCATTCGACAACAGGGACAGCTGCACCTCCAGACATACC
AGCCATCCAATGCAAGGAAGGACAACACCAAGCCAGAGGACAGTTCCTGGACTGATTTCTTCAACCCAATCTCACAC
CCCATGGGACGAGGTTCATCAAGCAGGAAGAAGGATGGATATGGACTCCAGTCATAGTACAACGCTTCAGCCTACTGCA
AATCCAAACACAGGTTTTGGTGAAGATTTGGACAGGACAGGACTCTTTCAATGACAACGCAGCAGAGTAATTTCCAG
AGCTTCTCTACATCACATGAAGGCTTGAAGAAGATAAAGACCATCCAACAACCTTCTACTCTGACATCAAGCAATAGG
AATGATGTCACAGGTGGAAGAAGAGACCCAAATCATTCTGAAGGCTCAACTACTTTACTGGAAGGTATAACCTCTCAT
TACCACACACGAAGGAAGCAGGACCTTCATCCAGTGACCTCAGCTAAGACTGGGTCTTTGGAGTTACTGCAGTT
ACTGTTGGAGATTCCAACCTAATGTCAATCGTTCTTATCAGGAGACCAAGACACATTCACCCCAAGTGGGGGTCC
CATACCCTCATGGATCTGAATCAGATGGACACTCACATGGGAGTCAAGAAGGTGGAGCAAACAACCTCTGGTCTT
ATAAGGACACCCAAATTCAGAATGGCTGATCATCTTGGCATCCCTCTTGGCCTTGGCTTTGATTCTTGCAGTTTGC
ATTGCAGTCAACAGTCAAGAAGGTGTGGGCAGAAAGAAAGCTAGTGATCAACAGTGGCAATGGAGCTGTGGAGGAC
AGAAAGCCAAAGTGGACTCAACGGAGAGGCCAGCAAGTCTCAGGAAATGGTGCATTTGGTGAACAAGGAGTCGTGAAA
ACTCCAGACGTTTTATGACAGCTGATGAGACAAGGAACCTGCAGAAATGTGGACATGAAGATGGGGTGGGGGTGGA
GGCTCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACGGGGTGGTCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACCGGCACGTAACCGGC
CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC
GGCAAGCTGCCGTCGCCGTCGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
CACATGAAGAAGCAGCAGCTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCACTTCTTCAAGGAC
GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATT
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGCTTATATCATATGGCC
GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCTAACTCAAGGTTCCGCACAACATCGAGGACGGCAGCTGCAGCTCGCCGAC
CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCCGCC
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGC
ATGGACGAGCTGTACAAGTAA
```

Proteinsequenz

```
MDKFVHAAWGLCLVPLSLAQIDLNITCRFAGVFHVEKNGRYSISRTEAADLCKAFNSTLPTMAQMEKALSIGFETCR
YGFIEGHVVIPIRIHPNSICAAANTGVYILTSNTSQYDTCFNASAPPEEDCTSVTDLPNADFDPITITIVNRDGRYV
QKGEYRTNPEDIYPSNPTDDVSSGSSERSSTSGGYIFYTFSTVHPIPEDESPWITDSTDRIPATSTSSNTISAGWE
PNEENEDERDRHLSFSGSIDDEDFISSTISTPRAFDTKQNDQWTPQWNP SHSNPEVLLQTTTRMTDVRNGTAY
EGNWNPEAHPLIHHEHHEEETPHSTSTIQATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTGTAAASAHT
SHPMQGRTPSPEDSSWTFDFNPI SHPMGRGHQAGRRMDDSSHSTTLQPTANPNTGLVEDLDRTGPLSMTTQQSNSQ
SFSTSHGLEEDKDHPTTSTLTSSNRNDVTGRRDPNHSEGSTLLEGYTSHYPHTKESRTFIPVTSAKTGSFVGTAV
TVGDSNSNVNRSLSGDQDTFHPSGGSHTHGSESDGSHSGSEGGANTTSGPIRTPQIPEWLIILASLLALALILAVC
IAVNSRRRCQKKLVINSNGAVEDRKP SGLNGEASKSQEMVHLVNKESSETPDQFMTADETRNLQNVDMKIGVGG
GSVSKGEELFTGVVPIVLVLDGDVNGHKFSVSGEGDATYKLTLLKFICTTGKLPVWPPTLVTTLYGVQCFSTRYPD
HMKKHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDITLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVY IMA
DKQKNGIKANFKVRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLG
MDELYK
```

siRNA CD44v6 Sequenz (5' zu 3')

CD44v6_stealth_1230: GGAUAUCGCCAAACACCCAAAGAA (vorwärts)

CD44v6_stealth_1230: UUCUUUGGGUGUUUGGCGAUAUCC (rückwärts)

8.3 Sonstiges

Die meisten experimentellen Arbeiten wurden im Labor für Strahlenbiologie und Strahlentherapie im Biomedizinischem Forschungszentrum, Marburg unter Anleitung von Frau Dr. Ulrike Schötz und Frau Steffi Preising durchgeführt. Nach meiner Einarbeitung erfolgten die meisten Experimente unter eigenständiger Planung, Durchführung und Analyse. Die Vorarbeiten für die stabilen Transfektionen wurden im Institut für Molekulare Onkologie im Zentrum für Tumor- und Immunbiologie in Marburg mit Frau Bernadette Wezorke durchgeführt. Weiterhin wurden Arbeiten in der FACS Core Facility im Zentrum für Tumor- und Immunbiologie in Marburg unter Anleitung von Herrn Gavin Giel durchgeführt.

Zur Detektion der Western Blots wurde der Intas Chemocam Imager aus dem Institut für Lungenforschung im Biomedizinischem Forschungszentrum, Marburg verwendet.

Bestrahlt wurde in der Core Facility Röntgenbestrahlungsanlage im Labor für Strahlenbiologie und Strahlentherapie, sowie an dem Marburger Ionenstrahl-Therapiezentrum (MIT).

8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

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

Vorklinischer Studienabschnitt in Marburg:

Baranovski, Bauer, Brehm, Bonaterra, Cetin, Decher, del Rey, Feuser, Hildebrandt, Kincherf, Lill, Mey, Milani, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Reese, Rost, Schütz, Schwarz, Steiniger, Suske, Thieme, Weihe, Wertenbruch, Westermann, Wilhelm, Wrocklage

Klinischer Studienabschnitt in Marburg:

Aigner, Arenz, Bartsch, Bauer, Becker, Burchert, Czubayko, Denkert, Divchev, Donner-Banzhoff, Drefke, Eberle, Engenhardt-Cabillic, Froehlich, Fuchs-Winkelmann, Geraedts, Gress, Hofmann, Hoyer, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kill, Kirschbaum, Köhler, Kühnert, Lohoff, Maier, Metzelder, Merte, Moll, Müller, Mutters, Neubauer, Oberkircher, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Renke, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schötz, Schymalla, Seifert, Sevinc, Stuck, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Wulf, Wündisch, Ziller, Zwioerek

Klinischer Studienabschnitt in Wien, Österreich:

Berger, Findl, Franz, Kornek, Lang, Jank, Schmidt-Erfurth, Seitz

8.5 Danksagungen

Ich möchte zuerst sehr herzlich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic danken, dass sie mir ermöglichte, die Arbeiten in ihrem Labor durchzuführen und mich während des gesamten Prozesses meiner Promotion unterstützt und motiviert hat.

Mein ganz großer Dank gilt weiterhin Frau Dr. U. Schötz für die sehr gute und gewissenhafte wissenschaftliche Betreuung im Labor der Klinik für Strahlentherapie. Von der Planung meiner These bis hin zur Umsetzung der Experimente, das Erstellen meiner Kongressbeiträge und auch den Korrekturen meiner Dissertationsschrift konnte ich mich auf die Hilfe und wertvollen Vorschläge von Frau Dr. Schötz immer zu hundert Prozent verlassen und ich bin ihr sehr dankbar für die viele Mühe, die sie in die Betreuung meines Projektes gesteckt hat.

Hierbei ist auch ein ganz besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. Dikomey zu erwähnen, welcher als Gastprofessor in unserem Labor eine große Unterstützung während meiner gesamten Promotion war und mich sowohl in der Analyse meiner Daten als auch in meinem Schreibprozess mit sehr guten Ratschlägen unterstützte.

Weiterhin möchte ich Frau Bernadette Wezorke für die Unterstützung bei den stabilen Transfektionen danken und natürlich allen Mitarbeitern des Labors für Strahlenbiologie, insbesondere Frau Steffi Preising und Leonie Pipke. Dank Steffi und Leonie konnte ich viele Labormethoden erlernen und mit ihnen ergab sich eine wunderbare Zusammenarbeit, für die ich sehr dankbar bin. Danke natürlich auch an Dr. Dinesh Tiwari und Stefan Lerch für die Unterstützung bei der Umsetzung einiger Experimente und unzähliger guten Ratschläge bezüglich meiner Arbeit.

Zu ganz großer Dankbarkeit bin ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern verpflichtet, welchen ich diese Arbeit widme. Sie alle haben mich immer bedingungslos unterstützt und mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht.

Am Ende möchte ich noch all denen danken, die mich während meiner Zeit in Marburg ebenfalls begleitet haben und mir den nötigen Halt gegeben haben, diese Arbeit und auch mein Studium zu bewältigen. Neben all den nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter in der Klinik für Strahlentherapie sind hier natürlich auch meine Freunde zu erwähnen, denen ich unglaublich viel verdanke und welche mich in jeder Lage unterstützt haben.

8.6 Curriculum Vitae

Die Seite 81 (*Curriculum Vitae*) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

8.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Bedeutung des Tumorstammzellfaktors CD44v6 für die Wirkung von Photonen und ¹²C-Ionen bei Kopf-Hals-Tumorzellen*“ in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic mit Unterstützung durch Frau Dr. Schötz 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 Kongressbeiträge sind aus Daten der vorliegenden Dissertation entstanden:

Maximilian Al-Bazaz, Stefan Lerch, Martin Selmansberger, Rita Engenhardt-Cabillic, Kirsten Lauber, Ulrike Schötz; Kopf-Hals Tumoren: Tumorstammzellfaktor CD44v6 beeinflusst *in vitro* G2-Arrest und Strahlenempfindlichkeit in S-Phase Zellen nach Bestrahlung (Poster bei der 25. Jahrestagung der DEGRO, Münster 2019)

Maximilian Al-Bazaz, Stefan Lerch, Ricarda Hannen, Rita Engenhardt-Cabillic, Ekkehard Dikomey, Kirsten Lauber, Ulrike Schötz; CD44v3-10 affects G2-arrest and radiosensitivity of S-phase cells via homologous recombination (Presentation Number: PH-0236 bei der European Society of Radiotherapy and Oncology, 2020)

Ort, Datum, Unterschrift

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

Ort, Datum, Unterschrift Referentin