

Aus der
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Sebastian Adeberg
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Wirkung von Kohlenstoffionenbestrahlung auf die Überlebensrate und
Doppelstrangbruchreparatur von HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stefan Lerch
aus Gelnhausen
Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
12.05.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

| | |
|-----------------|---|
| Dekanin: | Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner |
| Referentin: | Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic |
| 1. Korreferent: | PD Dr. Timofeev |
| 2. Korreferent: | Prof. Dr. Kaiser |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| Abbildungsverzeichnis | 8 |
| Tabellenverzeichnis | 8 |
| 1. Einleitung | 9 |
| 1.1. <i>Tumoren der Kopf-Hals-Region</i> | 9 |
| 1.1.1. Epidemiologie | 9 |
| 1.1.2. Ätiologie und Karzinogenese..... | 9 |
| 1.1.3. Therapie und Prognose..... | 11 |
| 1.1.4. Nebenwirkungen der Therapie..... | 13 |
| 1.2. <i>Grundlagen der biologischen Wirkung von Photonenbestrahlung</i> | 14 |
| 1.2.1. Strahlenempfindlichkeit HPV-pos. HNSCC-Zellen | 16 |
| 1.3. <i>Grundlagen der biologischen Wirkung von ¹²C-Bestrahlung.....</i> | 16 |
| 1.3.1. ¹² C-Ionenbestrahlung in der HNSCC-Therapie | 19 |
| 1.4. <i>Fragestellung.....</i> | 20 |
| 2. Material und Methoden | 22 |
| 2.1. <i>Zellkultur</i> | 22 |
| 2.2. <i>Bestrahlung.....</i> | 23 |
| 2.2.1. Photonenbestrahlung | 23 |
| 2.2.2. Kohlenstoffionenbestrahlung..... | 23 |
| 2.3. <i>2D-Koloniebildungstest</i> | 24 |
| 2.3.1. Auswertung..... | 25 |
| 2.4. <i>γH2AX/53BP1-Immunfluoreszenz.....</i> | 25 |
| 2.4.1. Auswertung..... | 27 |
| 2.5. <i>Statistik und Datenanalyse.....</i> | 29 |
| 3. Ergebnisse | 30 |
| 3.1. <i>Zelluläre Radiosensitivität nach Photonenbestrahlung.....</i> | 30 |
| 3.2. <i>Zelluläre Radiosensitivität nach ¹²C-Ionenbestrahlung.....</i> | 31 |
| 3.3. <i>Reparatur der Doppelstrangbrüche.....</i> | 34 |
| 3.4. <i>Residuelle Doppelstrangbrüche im Vergleich.....</i> | 37 |
| 3.5. <i>Korrelationsanalyse des zellulären Überlebens und der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche</i> | 39 |
| 4. Diskussion..... | 42 |
| 4.1. <i>Zelluläre Radiosensitivität</i> | 42 |
| 4.2. <i>DSB-Reparaturkapazität</i> | 43 |
| 4.3. <i>Residuelle DSB.....</i> | 44 |
| 4.4. <i>Bedeutung der residuellen Doppelstrangbrüche für das Zellüberleben</i> | 45 |
| 4.5. <i>Schlussfolgerung und Ausblick</i> | 46 |
| 5. Zusammenfassung..... | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 6. Summary | 49 |
| 7. Literaturverzeichnis | 51 |
| 8. Anhang..... | 65 |
| 8.1. <i>Liste der verwendeten Materialien</i> | 65 |
| 8.2. <i>Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien</i> | 67 |
| 8.3. <i>Liste der verwendeten Antikörper</i> | 68 |
| 8.4. <i>Liste der verwendeten Software.....</i> | 68 |
| 8.5. <i>Zusätzliche Abbildungen und Tabellen</i> | 69 |
| 8.6. <i>Curriculum vitae.....</i> | 70 |
| 8.7. <i>Verzeichnis der akademischen Lehrer.....</i> | 72 |
| 8.8. <i>Danksagung.....</i> | 73 |
| 8.9. <i>Ehrenwörtliche Erklärung</i> | 74 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µL | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| ΔE | Energieabgabe |
| Δs | Strecke |
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| Alt-EJ | alternatives end-joining |
| ATM | ataxia telangiectasia mutated |
| BRCA1 | breast cancer 1 |
| BRCA2 | breast cancer 2 |
| BSA | bovines Serum-Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ¹² C | Kohlenstoffion |
| CDK4/6 | cyclin-abhängige Kinasen 4 und 6 |
| cm | Centimeter |
| CtBP1 | C-terminal bindendes Protein 1 |
| CtIP | CtBP1-Interacting-Protein |
| D | Dosis |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DMSZ | Leibniz Institute German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNA-PK | DNA-Proteinkinase |
| DSB | DNA-Doppelstrangbruch |
| e _{aqu} | Elektronen mit Wasserhülle |
| EGFR | epidermal growth factor |
| EXO1 | Exonuclease 1 |
| HNSCC | Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs |
| HPV | humanes Papilloma-Virus |
| HPV-neg. | HPV-negativ |
| HPV-pos. | HPV-positiv |
| IRIF | ionizing radiation induced foci |
| g | Gramm |
| Gy | Gray |

| | |
|-----------------------|---|
| Gy/min | Gray pro Minute |
| γ H2AX | phosphoryliertes Histon 2AX |
| H | Wasserstoff |
| HG | Hintergrund |
| HR | homologe Rekombination |
| H2AX | Histon 2AX |
| IMRT | intensitätsmodulierte Radiotherapie |
| kV | Kilovolt |
| keV | Kiloelektronenvolt |
| MeV/n ^{12}C | Kiloelektronenvolt pro Kohlenstoffion |
| LET | linearer Energietransfer |
| LSCC | Plattenepithelkarzinom des Larynx |
| m ² KOF | Quadratmeter Körperoberfläche |
| mA | Milliampere |
| MDC1 | Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 |
| min | Minute |
| MIT | Marburger Ionenstrahl-Therapiezentrum |
| mg | Milligramm |
| mL | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MRN | MRE11-Rad50-NBS1 |
| NCCN | National Comprehensive Cancer Network |
| NHEJ | nicht-homologes end-joining |
| NPC | Nasopharynxkarzinom |
| OH | Hydroxyl |
| HO ₂ | Hydroxy-Peroxy |
| OPSCC | Plattenepithelkarzinom des Oropharynx |
| OSCC | Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle |
| PARP1 | Poly-(ADP ribose)-Polymerase 1 |
| PARP | Poly-(ADP ribose)-Polymerase |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PE | Plattierungseffizienz |
| PEG | percutane endoskopische Gastrostomie |
| PFA | para-Formaldehyd |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| RBW | relative biologische Wirksamkeit |
| RPMI | Roswell-Park-Memorial-Institute |

| | |
|-------|--|
| SD | Standardabweichung |
| SEM | Standardabweichung der arithmetischen Mittel |
| SF | Überlebensfraktion |
| SOBP | spread-out Bragg-peak |
| Std. | Stunden |
| TNM8 | Stadieneinteilung nach TNM gemäß der 8. Ausgabe AJCC |
| VM | Vollmedium |
| wt | Wildtyp |
| XRCC4 | X-Ray Repair Cross Complementing 4 |
| 53BP1 | p53 binding protein 1 |
| 5-FU | 5-Fluor-Uracil |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Dosis-Überlebenskurve für Photonen- und ¹² C-Ionenbestrahlung von A549-Zellen | 17 |
| Abbildung 2: Tiefendosisprofil der Photonen- und ¹² C-Ionenbestrahlung nach Weber und Kraft (Weber and Kraft, 2009) | 19 |
| Abbildung 3: Nachweis von DSB mittels Ko-Färbung von γH2AX- und 53BP1-Foci.... | 28 |
| Abbildung 4: Wirkung von Photonenbestrahlung auf das zelluläre Überleben von HNSCC-Zellen | 30 |
| Abbildung 5: zelluläres Überleben nach 2 Gy und 6 Gy Photonenbestrahlung | 31 |
| Abbildung 6: erhöhte RBW der ¹² C-Ionenbestrahlung..... | 32 |
| Abbildung 7: zelluläres Überleben nach Photonen- und ¹² C-Ionenbestrahlung | 33 |
| Abbildung 8: DSB nach Photonen- und ¹² C-Ionenbestrahlung | 35 |
| Abbildung 9: DSB-Reparaturkinetik nach Photonen- und ¹² C-Ionenbestrahlung | 36 |
| Abbildung 10: residuelle DSB nach Photonen- und ¹² C-Ionenbestrahlung..... | 38 |
| Abbildung 11: Assoziation zwischen residuellen DSB und zellulärem Überleben..... | 40 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: HPV-pos. und -neg. HNSCC-Zellen..... | 22 |
| Tabelle 2: ausgesäte Zellen pro Well für 2D-Koloniebildungstest..... | 24 |
| Tabelle 3: ausgesäte Zellen pro Well für γH2AX/53BP1-Immunfluoreszenz..... | 26 |
| Tabelle 4: verwendete Geräte und Großgeräte | 65 |
| Tabelle 5: verwendete Verbrauchsmaterialien | 66 |
| Tabelle 6: verwendete Chemikalien und Reagenzien | 67 |
| Tabelle 7: verwendete Antikörper | 68 |
| Tabelle 8: verwendete Software..... | 68 |
| Tabelle 9: Plattierungseffizienzen der Koloniebildungstests | 69 |

1. Einleitung

1.1. Tumoren der Kopf-Hals-Region

1.1.1. Epidemiologie

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs bilden in ihrer Gesamtheit mit über 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr die sechsthäufigste maligne Krebserkrankung weltweit, die in aktuellen Erhebungen in über 450.000 Fällen pro Jahr zum Tod führt (Bray et al., 2018). Anatomisch wird unterschieden zwischen Tumoren des Nasopharynx (NPC), des Hypopharynx und des Larynx (LSCC) sowie der Mundhöhle (OSCC) und des Oropharynx (OPSCC), welcher das basale Zungendrittel, die Tonsillen sowie die lateral umgebenden pharyngealen Wände repräsentiert (Vigneswaran and Williams, 2014). In Hoch-Risiko-Ländern (z.B. Indien, Sri Lanka und Bangladesch) gilt das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle als häufigste Krebserkrankung bei Männern und dritthäufigste Krebserkrankung bei Frauen (Warnakulasuriya, 2009). In Deutschland sind die altersstandardisierten Erkrankungs- (7,3/100.000) und Sterblichkeitsraten (2,4/100.000) bei Frauen in den letzten Jahren angestiegen, während sie bei Männern (24,3/100.000 und 9,9/100.000) auf deutlich höherem Niveau stabil sind.

Unabhängig vom Geschlecht haben zuletzt vor allem die Tumoren der Mundhöhle und des Oropharynx zugenommen (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2016). Dieser Trend zeigt sich auch in den USA und weiteren Industrieländern. Hier wurde insbesondere eine Zunahme der OPSCC beobachtet, während die Neuerkrankungsrate an OSCC eher abnahm (Ramqvist and Dalianis, 2010; Sturgis and Cinciripini, 2007; Vigneswaran and Williams, 2014).

1.1.2. Ätiologie und Karzinogenese

Kopf-Hals-Tumoren sind in 90% der Fälle Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC)) (Kreimer et al., 2005). Lange galten diese Tumoren als primär noxenbedingt. In den letzten Jahren steigt der Anteil weitestgehend nikotin- und alkoholunabhängiger HNSCC und gewinnt zunehmend an klinischer Bedeutung (D'Souza et al., 2007). Diese beruhen hauptsächlich auf der chronischen Infektion mit dem Hoch-Risiko-Typ 16 des humanen Papilloma-Virus (HPV) (Kreimer et al., 2005; Syrjänen et al., 1982).

Die Karzinogenese der noxen-assoziierten HPV-negativen (HPV-neg.) HNSCC folgt dem zellinhärenten Modell der mehrstufigen Mutation von Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen (Hanahan and Weinberg, 2011), in welchem die in 60-80% der HPV-neg. HNSCC vorliegende p53-Mutation die wichtigste darstellt (Stransky et al., 2011). Eine weitere Subfraktion der HPV-neg. HNSCC enthält auch Mutationen im EGFR-Signalweg (Leemans et al., 2011).

Die Karzinogenese der HPV-positiven (HPV-pos.) HNSCC wird durch eine persistierende Infektion von den an der Basalmembran aufsitzenden epithelialen Stammzellen ausgelöst. Aus dieser chronischen Infektion resultiert die Integration des Virusgenoms in die Wirtszellen und eine anschließend vermehrte Expression der Virusproteine E6 und E7 durch die zelleigene Transkription (Andl et al., 1998; Hafkamp et al., 2008; Klusmann et al., 2001; Wiest et al., 2002). Jene stellen die wichtigsten Virusproteine für die Karzinogenese dar und interagieren als starke Onkogene mit nahezu sämtlichen von Hanahan und Weinberg beschriebenen „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan and Weinberg, 2011; Mesri et al., 2014). Als wichtigste Interaktionsstellen gelten die durch E6 vermittelte Inhibierung (Thomas et al., 1999) und ubiquitin-vermittelte Degradation (Scheffner et al., 1990) von p53, welches in der Regel als Wildtyp vorliegt (Seltz et al., 2019), sowie die Markierung von pRb zur proteasomalen Degradation durch E7 (Mesri et al., 2014). Diese beiden Effekte bedeuten einen weitestgehenden Verlust der Zellzykluskontrolle. Die Inhibierung von pRb führt ebenfalls zur Akkumulierung des CDK4/6-inhibierenden Tumorsuppressors p16^{INK4A} (Mesri et al., 2014; Sano et al., 1998), der als Gewebemarker für eine aktive HPV-Infektion verwendet werden kann (Klusmann et al., 2003). Bei der Planung einer Therapie sollte dieser jedoch mit dem Nachweis von HPV-DNA kombiniert werden (Linge et al., 2018; Nauta et al., 2018).

Neben der Karzinogenese unterscheiden sich die HPV-pos. HNSCC ebenfalls in ihrer typischen Lokalisation und ihrem Metastasierungsverhalten von HPV-neg. HNSCC. Die mit Abstand wichtigste Prädilektionsstelle des HPV-pos. HNSCC liegt im Bereich des Oropharynx, insbesondere den *Tonsillae palatinae*, die durch ihre Kryptenstruktur bedingt einen direkten Angriffspunkt auf die an der Basalmembran aufsitzenden Zellen bieten (Mayer, 2014). In den letzten Jahren zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Anteils HPV-pos. OPSCC, der auf 1,6% pro Jahr beziffert werden kann (Reuschenbach et al., 2019; Tinhofer et al., 2015; Würdemann et al., 2017). Neuste Arbeiten gehen davon aus, dass derzeit bereits über 50% der OPSCC HPV-bedingt sind (Reuschenbach et al., 2019). Als weitere jedoch seltenere Prädilektionsstellen gelten die Mundhöhle, der Hypopharynx und der Larynx (Ko et al., 2017).

Ebenfalls charakteristisch für HPV-pos. HNSCC ist eine frühe lymphogene Metastasierung. Diese zunächst klinische Beobachtung konnte auf eine Hochregulation von nukleärem β -catenin und eine verminderte Expression von E-Cadherin in bereits frühen Stadien zurückgeführt werden (Stenner et al., 2011). Daher ist bei Patienten mit HPV-pos. HNSCC das häufigste Erstsymptom die Schwellung eines Halslymphknotens (Wittekindt et al., 2018), während bei Patienten mit HPV-neg. HNSCC je nach Lokalisation am häufigsten Heiserkeit (LSCC), Nasenatmungsbehinderung (NPC) oder Dysphagie (HPV-neg. OSCC und OPSCC) imponieren (Coca-Pelaz et al., 2018; Wittekindt et al., 2018).

1.1.3. Therapie und Prognose

Die leitliniengerechte Behandlung eines HNSCC basiert stets auf einem multimodalen Konzept, das die Erwägung des Einsatzes aller Säulen der modernen Tumorthherapie umfasst. Die wichtigsten Komponenten der Primärbehandlung stellen dabei die Operation, die Strahlentherapie, die Chemotherapie und die Antikörpertherapie dar. Sie werden je nach Tumorstadium und Allgemeinzustand des Patienten einzeln, simultan oder in Sequenzen angewandt. In frühen Stadien und insbesondere bei fehlender lymphogener Metastasierung erfolgt am häufigsten eine Operation des lokalen Befundes in Kombination mit einer *selektiven neck dissection*, deren Ausmaß vom typischen Metastasierungsverhalten des Primärtumors in die Halslymphknoten abhängig ist. Die Entscheidung zur Operation sollte dabei vor allem von der Möglichkeit der vollständigen Resektabilität und der zu erwartenden postoperativen Lebensqualität des Patienten abhängig gemacht werden (Stöver and Feyer, 2010). In Abhängigkeit des postoperativen Risikoprofils kann eine adjuvante Radiotherapie oder Radiochemotherapie erforderlich sein. Alternativ kann in lokal begrenzten Stadien auch eine definitive Therapie mit alleiniger Radiotherapie durchgeführt werden. Bei primär fortgeschrittenen Stadien wird hingegen eine definitive Radiochemotherapie durchgeführt. Diese umfasst je nach individueller Situation eine Gesamtdosis von 60-80 Gy, die in der Regel konventionell fraktioniert (5 mal 1,8-2,0 Gy pro Woche) appliziert wird. Bei alleiniger definitiver Radiotherapie kommen auch alternative Fraktionierungsschemata in Frage (Stöver and Feyer, 2010). Standard ist die Kombination der Strahlentherapie mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie (Cramer et al., 2019). Die Alternativtherapie mit Cetuximab ist der platinbasierten Chemotherapie unterlegen (Bauml et al., 2019), gilt aber als erste Alternative bei Kontraindikationen gegen ein platinbasiertes Chemotherapeutikum. Auch weitere zugelassene Substanzen

wie 5-FU, Carboplatin, Mitomycin C, Docetaxel oder Paclitaxel führen in Kombination mit einer Radiotherapie zu einem Überlebensvorteil gegenüber der alleinigen Radiotherapie bei Tumoren in fortgeschrittenen Stadien (Budach et al., 2006).

Patienten mit kleinen, singulär lymphogen metastasierten HPV-pos. OPSCC können nach den Empfehlungen der NCCN auch mit alleiniger Radiotherapie behandelt werden, während Patienten mit lymphogen metastasierten HPV-neg. OPSCC eine Radiochemotherapie empfohlen werden sollte. Der von HPV-pos. OPSCC exprimierte Gewebemarker p16 ist somit nicht nur als ein Surrogatmarker für die HPV-bedingte Karzinogenese zu sehen, sondern fungiert auch als therapeutischer und prognostischer Marker mit positivem Einfluss auf das Gesamtüberleben (Lassen et al., 2018). Dies führte auch zur Deklaration p16-positiver OPSCC als eigene Entität in der TNM8-Klassifikation der Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs. In der neuen Stadieneinteilung der HPV-pos. OPSCC wurde deren frühe lymphogene Metastasierung sowie der im Vergleich zu HPV-neg. OPSCC geringere Einfluss der Lymphknotenmetastasierung auf die Prognose berücksichtigt (Nauta et al., 2018). Dies führte in der Mehrzahl der Fälle zu einem Down-Grading HPV-pos. OPSCC, sodass nun die Mehrzahl der HPV-pos. OPSCC trotz Lymphknotenmetastasierung als Stadium I & II klassifiziert werden, um ihrer wesentlich besseren Prognose im 5-Jahres-Gesamtüberleben gerecht zu werden (Cramer et al., 2018). Die bessere Prognose der HPV-pos. HNSCC resultiert aus einer wesentlich höheren Therapiesensibilität bzw. Radiochemotherapiesensibilität (Ang et al., 2010; Linge et al., 2016). Die generelle Prognose von Patienten mit einem HNSCC ist vor allem von deren Erkrankungsstadium abhängig. Während das 5-Jahres-Gesamtüberleben von Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs im Stadium I unabhängig vom HPV-Status 75-90% beträgt (Stöver and Feyer, 2010), differiert die Prognose abhängig vom HPV-Status in fortgeschrittenen Stadien stark. In den fortgeschrittenen Stadien weist die Studie von Nguyen-Tan et al. daraufhin, dass das 8-Jahres-Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-pos. OPSCC (71%) nach primärer Radiochemotherapie wesentlich höher ist als bei Patienten mit HPV-neg. OPSCC (31%) in vergleichbaren Stadien (Nguyen-Tan et al., 2014). Dabei spielen vor allem Rezidive, die etwa 50% der Patienten mit lokal fortgeschrittenen HNSCC erleiden, eine große Rolle, da diese oft nur mit sehr kurzem Überleben nach Diagnosestellung assoziiert sind (Monnerat et al., 2002; Vermorken and Specenier, 2010). Eine weitere Dosisescalation der photonenbasierten Radiotherapie zur Steigerung der lokoregionären Kontrolle ist nur sehr eingeschränkt möglich, da hierbei erheblich höhere und zum Teil nicht verantwortbare Nebenwirkungsraten zu erwarten wären (Brodin and Tomé, 2018; Emami et al., 1991).

1.1.4. Nebenwirkungen der Therapie

Eine große Herausforderung bei der Therapie von fortgeschrittenen HPV-pos. und HPV-neg. HNSCC sind die ausgeprägten behandlungsbedingten Nebenwirkungen. Insbesondere bei der Kombination einer Radiotherapie mit einer simultanen Chemotherapie sind die Patienten durch Haut- und Schleimhautnebenwirkungen stark belastet. Dieses Toxizitätsprofil kann die Compliance eines relevanten Patientenanteils negativ beeinflussen und zu Therapieunterbrechungen, insbesondere der simultanen Chemotherapie, führen (Mohanti et al., 2007; Revannasiddaiah et al., 2015). Wird jedoch keine kumulative Dosis von 200mg Cisplatin/m² KOF erreicht, beeinträchtigt dies das Behandlungsergebnis erheblich (Spreafico et al., 2015). Der alternative Verzicht auf ein platinbasiertes Behandlungskonzept geht derzeit mit einem schlechteren Gesamtüberleben einher, weshalb er selbst bei Patienten mit HPV-pos. HNSCC und guter Prognose ausschließlich eine sekundäre Therapieoption darstellt (Bauml et al., 2019; Mehanna et al., 2019).

Bei der Radiotherapie von HNSCC ist ohne die Applikation hoher Gesamtdosen von 60-80 Gy keine suffiziente Tumorkontrolle zu erreichen. Dies führt am umliegenden Normalgewebe wie der Haut, den Schleimhäuten, den Speicheldrüsen und an den für den Schluckakt relevanten Strukturen zu teils starken Nebenwirkungen. Hauptnebenwirkungen der Radiotherapie von HNSCC sind daher Mucositis, Stomatitis, Dysphagie bzw. Odynophagie, Xerostomie, Ageusie, Gewichtsverlust und Erytheme. Stomatitis und Mucositis (Grad III-V) treten insbesondere bei den Behandlungen von OPSCC auf und können auch durch alternative Fraktionierungsschemata nicht signifikant gesenkt werden (Nguyen-Tan et al., 2014). Xerostomie tritt bei fast allen Patienten auf, die mit konventioneller Strahlentherapie behandelt werden. Insbesondere die schwerwiegenden parotis-assoziierten Langzeitnebenwirkungen konnten jedoch durch moderne Bestrahlungsmethoden wie der IMRT (intensitäts-modulierte Radiotherapie) gesenkt werden (Lal et al., 2018; Nutting et al., 2011). Auch die häufig auftretende Dysphagie kann durch Schonung des Musculus constrictor pharyngis mit modernen Bestrahlungsmethoden besser geschont werden (Nutting et al., 2020). Oft stehen der optimalen Schonung der Risikoorgane jedoch die grundlegenden physikalischen Eigenschaften der Photonenbestrahlung im Weg, die eine nebenwirkungsrelevante Dosisexposition in Risikostrukturen bedingt. Wesentliche Risikofaktoren für die Unterbrechung oder den Abbruch der Therapie stellen diese lokalen Nebenwirkungen zwar nur selten dar, jedoch können daraus Gewichtsverlust, Dehydratation und Ernährungsdefizite resultieren. Um dies zu vermeiden, muss bei vielen Kopf-Hals-Tumor-Patienten eine percutane endoskopische Gastrostomie mit

Implantation einer Ernährungssonde (PEG-Implantation) durchgeführt werden (Greaves, 2018), die den Standard der längerfristigen enteralen Ernährung bei Patienten mit HNSCC darstellt (Löser et al., 2005; Sieron et al., 2020). Dieser zusätzliche Eingriff beinhaltet jedoch erneut Risiken für den Patienten (Rahnemai-Azar, 2014). Die Vermeidung von bestrahlungsbedingten Nebenwirkungen durch effektivere Schonung des Normalgewebes stellt deshalb ein wesentliches Ziel der zukünftigen Behandlung von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs dar.

Zusammenfassend kann somit konstatiert werden, dass das Ziel einer künftigen Therapie von HPV-pos. und -neg. HNSCC eine Verstärkung der biologischen Wirkung der Bestrahlung bei gleichzeitiger Minimierung der Normalgewebsschädigung ist. Diese beiden Faktoren werden in der Kohlenstoffionenbestrahlung (^{12}C -Ionenbestrahlung) vereint (Durante und Debus, 2018). Erste Studien zeigen bereits vielversprechende Ergebnisse zur Effektivität und Sicherheit des Einsatzes von ^{12}C -Ionenbestrahlung in der Behandlung von fortgeschrittenen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs (Eberle et al., 2022; Hauswald et al., 2018).

1.2. Grundlagen der biologischen Wirkung von Photonenbestrahlung

Die Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen und Gewebe beruht vor allem auf Schädigung der DNA durch direkte und indirekte Ionisation (Dikomey et al., 2016, 2012). Durch indirekte Ionisation werden Radikalkettenreaktionen ausgelöst, die schädigend auf die DNA der Zellen wirken. Da Wassermoleküle die häufigste Substanz in biologischen Systemen darstellen, wird dieser Effekt insbesondere über die Radiolyse des Wassers vermittelt, bei dem sich OH-Radikale, reduzierende H-Radikale, Elektronen mit Wasserhülle (e_{aqu}) und in Anwesenheit von Sauerstoff Hydroxy-Peroxy-Radikale (HO_2 -Radikale) bilden, die dann auf die DNA wirken (Herrmann et al., 2006). Die direkte Ionisation hingegen schädigt Zellen durch die unmittelbare Absorption von Strahlung in der DNA (Herrmann et al., 2006). Der relative Anteil der jeweiligen Mechanismen ist dabei abhängig von der Ionisationsdichte der Bestrahlung (s. 1.3).

Aus 10^5 Ionisationen pro Zelle, die durch ein Gray Photonenbestrahlung verursacht werden, resultieren neben Schäden an DNA-Basen und DNA-Einzelstrangbrüchen 20 bis 40 DNA-Doppelstrangbrüche (DSB). DSB stellen sowohl Tumor- als auch sonstige Humanzellen vor eine große Herausforderung, da sie durch komplexe DNA-Reparaturmechanismen repariert werden müssen (Dikomey et al., 2012). Damit die DSB-Reparatur initiiert wird, muss der DNA-Schaden zunächst von der Zelle erkannt

und markiert werden. Diese initiale Schadenserkenkung wird über die Autophosphorylierung der Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) (Bakkenist and Kastan, 2003) und den MRN-Komplex (Mre11, Rad50 und Nibrin) vermittelt und resultiert in der posttranslationalen Phosphorylierung der Histonvariante H2AX an Serin 139 (S139). Das phosphorylierte Histon wird dann auch als γ H2AX bezeichnet (Kinner et al., 2008). Die Markierung von DSB durch γ H2AX führt zur Akkumulation von MDC1, was die Rekrutierung erster DNA-Reparaturproteine wie 53BP1 und BRCA1 zur Folge hat (Bekker-Jensen and Mailand, 2010).

Die darauffolgende Wahl des DNA-Reparaturwegs unterliegt einer strengen Hierarchie (Mansour et al., 2008) und ist vor allem zellzyklusabhängig. In der G1-Phase dominiert der Reparaturweg des Nicht-Homologen End-Joinings (NHEJ). Dabei werden die DNA-Enden des DSB von Ku70-Ku80-Heterodimeren besetzt, die die Initiierung anderer DNA-Reparaturwege verhindern und die DNA-PK_{CS} rekrutieren. Diese bildet gemeinsam mit den Ku-Proteinen das heterotrimere Haupteffektorprotein des NHEJ, die DNA-abhängige Proteinkinase. Gemeinsam mit dem XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex ligiert diese die DNA-Bruchstücke. Insgesamt führt dieser Reparaturweg häufig zu fehlerhaft reparierten DSB, da schadhafte Nucleotide teils ersatzlos entfernt werden (Dikomey et al., 2012).

In der S- und G2-Phase werden DSB neben dem NHEJ auch durch die in der Regel fehlerfrei ablaufende, langsamere Homologe Rekombination (HR) repariert. Diese wird von der primären Resektion des 5'-DNA-Endes (end clipping) durch CtBP1-Interacting Protein (CtIP) und MRE11 (Ceccaldi et al., 2016; Niu et al., 2009) und der Verlängerung der Resektion durch EXO1 u.a. initiiert. Die anschließende BRCA2-abhängige Beladung des überhängenden 3'-DNA-Einzelstrangs mit Rad51 führt zur Suche nach homologen Sequenzen auf dem Schwesterchromatid. Die anschließende DNA-Synthese und Ligation der DNA-Bruchenden schließt die Reparatur ab (Dikomey et al., 2016).

Ein weiterer DSB-Reparaturweg ist das alternative end joining (Alt-EJ), das bisher ausschließlich bei Tumorzellen beobachtet wurde. Es kann ebenfalls in allen Zellzyklusphasen stattfinden, läuft jedoch wesentlich langsamer als das NHEJ ab und ist zudem fehleranfälliger. Den Hauptfaktor des Reparaturwegs bildet die Poly-(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) (Mansour et al., 2010). Als wichtigste Inhibitoren des Alt-EJ gelten deshalb PARP-Inhibitoren wie Olaparib (Kötter et al., 2014; Wurster et al., 2016). Im Gegensatz zum Ku70/80-abhängigen NHEJ bildet im Alt-EJ ebenfalls das CtIP-abhängige end-clipping die Grundlage des Reparaturwegs (Ceccaldi et al., 2016). Das initiale end-clipping durch CtIP kann nach der Induktion komplexerer DSB durch Partikelbestrahlung auch in der G1-Phase beobachtet werden, was ein Hinweis auf die Nutzung alternativer DSB-Reparaturwege sein könnte (Averbeck et al., 2014).

1.2.1. Strahlenempfindlichkeit HPV-pos. HNSCC-Zellen

Auch *in vitro* zeigt sich, dass HPV-pos. Kopf-Hals-Tumorzellen wesentlich besser auf Strahlentherapie ansprechen als HPV-neg. HNSCC-Zellen (Arenz et al., 2014; Rieckmann et al., 2013). Dies kann nicht auf eine gesteigerte Apoptose in den HPV-pos. Zellen zurückgeführt werden, sondern vor allem auf eine veränderte Zellzyklusregulation und eine verminderte Doppelstrangbruchreparatur (Arenz et al., 2014). Zudem legt eine verminderte Bildung von Rad51-Foci nahe, dass HPV-pos. Zellen einen Defekt in der homologen Rekombination aufweisen (Ziemann et al., 2017).

1.3. Grundlagen der biologischen Wirkung von ^{12}C -Bestrahlung

Um die Heilungschancen für Tumorpatienten zu verbessern, wurden in der Strahlentherapie in den letzten Jahren zahlreiche neue Verfahren entwickelt. Hierzu zählt u.a. die Behandlung von Tumoren durch Partikelstrahlung mit Kohlenstoffionen (^{12}C -Ionen). Einer der wesentlichen Vorteile der ^{12}C -Ionenbestrahlung ist deren erhöhte biologische Wirkung auf das Überleben von Tumorzellen, das mittels Koloniebildungstest bestimmt werden kann. Unterschiede in der biologischen Wirkung von Bestrahlungen werden klassischerweise über die relative biologische Wirksamkeit (RBW) berechnet (Herrmann et al., 2006). Diese ist als Quotient jener Dosen definiert, die den gleichen biologischen Effekt aufweisen. Typischerweise ist dies jene Dosis, bei der das klonogene Überleben 10% beträgt (D_{10} bzw. RBW_{10}) (Beuve et al., 2008; Wannemacher et al., 2006). Für die Daten in Abbildung 1 ergibt dies bei einer D_{10} von 4,6 Gy für Photonenstrahlung und 1,5 Gy für ^{12}C -Ionenbestrahlung eine RBW_{10} von 3,1 ($\text{RBW}_{10} = \frac{4,6 \text{ Gy}}{1,5 \text{ Gy}} = 3,1$). Das heißt, dass das Zellüberleben bei gleicher physikalischer Dosis deutlich stärker reduziert wird und somit eine erhöhte biologische Wirksamkeit vorliegt.

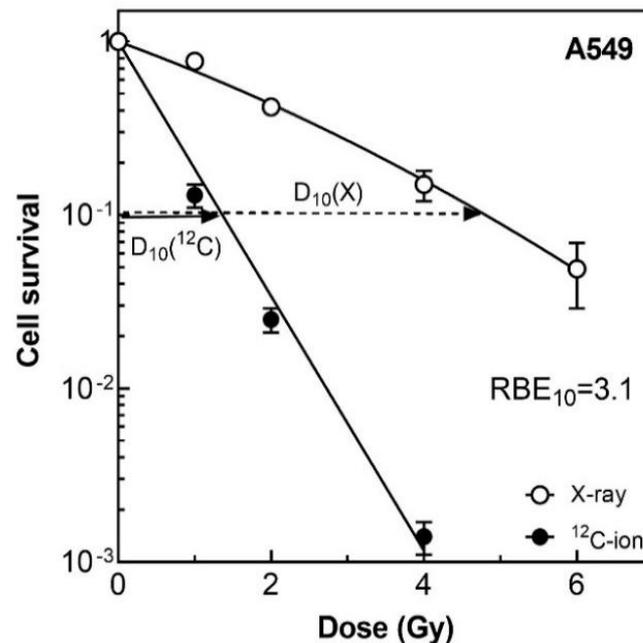


Abbildung 1: Dosis-Überlebenskurve für Photonen- und ^{12}C -Ionenbestrahlung von A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit Photonen (X) bzw. ^{12}C -Ionen (^{12}C) bestrahlt und die Überlebensrate mittels Koloniebildungstest bestimmt (Subtil et al., 2014)

Die erhöhte biologische Wirkung der Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen beruht auf der höheren Ionisationsdichte, die die Anzahl der Ionisationsereignisse auf dem Weg des Strahls angibt. Diese ist proportional abhängig vom linearen Energietransfer (LET), mit dem die im Mittel deponierte Energie ΔE pro Wegstrecke Δs der geladenen Teilchen [$\text{keV}/\mu\text{m}$] angegeben wird. Generell werden Strahlenqualitäten mit einem LET $<3,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ (Elektronen-, Photonen- und Gammastrahlen) deshalb als locker ionisierende Strahlung bezeichnet, während dicht ionisierende Strahlenarten (z.B. Alphastrahlung, Neutronenstrahlung, ^{12}C -Ionenstrahlung) einen höheren LET aufweisen.

Während die durch Photonenbestrahlung erzeugten Doppelstrangbrüche zufällig über den Zellkern verteilt sind (Newman et al., 1997) und insbesondere durch indirekte Ionisation verursacht werden, kann man nach Hoch-LET-Bestrahlung diskrete Ionisationsspuren nachvollziehen, auf denen größere, wesentlich komplexere DSB liegen, sogenannte „damage cluster“ (Bracalente et al., 2013; Hagiwara et al., 2019; Jezkova et al., 2018). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass oft mehr als zwei DNA-Bruchstellen vorliegen und sie wesentlich häufiger nur schwer oder gar nicht repariert werden können (Goodhead, 1999, 1994; Heilmann et al., 1996; Kraft et al., 1992). Dieser

Zusammenhang repräsentiert sich in wesentlich steileren Dosis-Überlebenskurven nach Hoch-LET-Bestrahlung (Herrmann et al., 2006).

Der LET und damit auch die Ionisationsdichte der ^{12}C -Ionenbestrahlung wird von der Energie der Teilchen bestimmt. Es gilt, dass der LET mit zunehmender Energie der ^{12}C -Ionen kleiner wird (Fokas et al., 2009; Gemmel, 2009). Die RBW nimmt mit steigendem LET zu und erreicht relativ unabhängig von Bestrahlungsart und Gewebe bei ca. 150 keV/ μm ein Maximum, während die RBW bei höheren LET-Werten wieder abfällt (Kraft, 1998). Dieser höhere Bereich wird als „overkill“ bezeichnet, er repräsentiert den Zusammenhang, dass die Schadenswirkung pro Teilchen begrenzt ist (Wannemacher et al., 2006). Bei der Therapie mit ^{12}C -Ionen werden deshalb Teilchenenergien verwendet, die im Zielvolumen einen LET im Bereich von 100 keV/ μm zur Folge haben, um die biologische Wirkung der ^{12}C -Ionenbestrahlung möglichst optimal auszunutzen. Da die Ionisationsdichte von ^{12}C -Ionen und damit auch der LET mit abnehmender Energie zunimmt, wird beim Eindringen von hochenergetischen Ionen in das Gewebe zunächst nur wenig biologischer Schaden erzeugt. Die resultierende Bestrahlungswirkung ist in diesem Bereich demnach relativ klein (Durante and Debus, 2018). Mit zunehmendem Energieverlust der Ionen im Laufe der Gewebepenetration nimmt der LET und damit auch die Ionisationsdichte zu und erreicht am Ende der Partikelpenetration beim Abstoppen der Teilchen im sogenannten Bragg-Peak sein Maximum (s. Abbildung 2). Somit können tiefer liegende Tumoren mit hoher biologischer Wirkung geschädigt werden, während das darüber liegende Normalgewebe verschont bleibt (Durante and Debus, 2018). Durch die Abgabe von Teilchen mit verschiedenen Initialenergien ist es möglich, die Eindringtiefe an die jeweilige Tumorlokalisation anzupassen (s. Abbildung 2). Durch die Kombination der Abgabe von Teilchen mit verschiedenen Initialenergien können sehr diskrete Hochdosisbereiche erzeugt werden, die als spread-out-bragg-peak (SOBP) bezeichnet werden (Fokas et al., 2009).

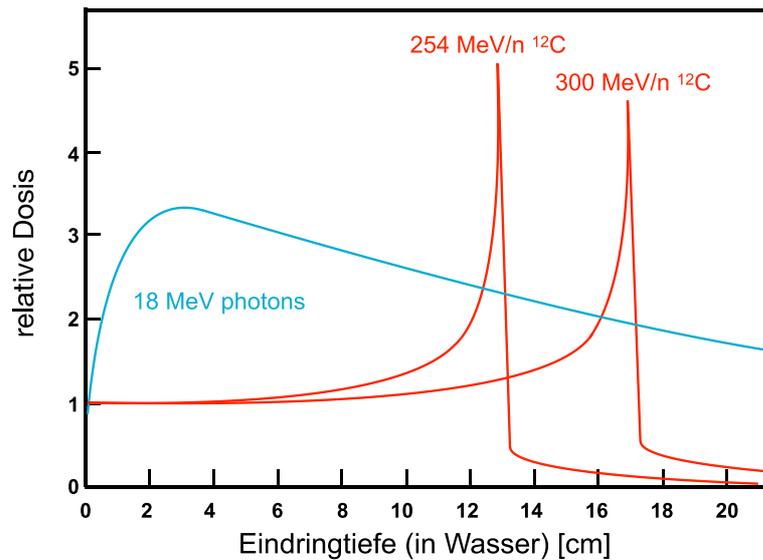


Abbildung 2: Tiefendosisprofil der Photonen- und ^{12}C -Ionenbestrahlung nach Weber und Kraft (Weber and Kraft, 2009)

Im Gegensatz zur ^{12}C -Ionenbestrahlung ist bei der Bestrahlung mit hochenergetischen Photonen in den ersten Zentimetern Eindringtiefe ein Aufbaueffekt zu beobachten, dem ein exponentieller Abfall der Dosis in Abhängigkeit der Eindringtiefe folgt (s. Abbildung 2). Der Bestrahlung von tiefliegenden Tumoren und der effektiven Schonung von Normalgewebe vor und hinter dem Zielvolumen sind demnach physikalische Grenzen gesetzt, denen mit einer Kombination aus verschiedenen Einstrahlwinkeln teilweise nur unzureichend befriedigend begegnet werden kann. Die Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen kombiniert eine hohe biologische Wirksamkeit mit der effektiven Schonung des Normalgewebes vor und hinter dem Zielvolumen sowie einer geringer ausgeprägten lateralen Streuung (Durante and Debus, 2018) und bietet somit wesentliche Vorteile bei der Behandlung von Tumoren wie dem HNSCC, wo es neben der Inaktivierung aller Tumorzellen auch sehr auf die Schonung des benachbarten Normalgewebes ankommt.

1.3.1. ^{12}C -Ionenbestrahlung in der HNSCC-Therapie

Bei der Bestrahlung von HNSCC gilt es, immer die unmittelbare Nähe der Tumoren zu empfindlichen Risikoorganen wie den Speicheldrüsen zu beachten. Es besteht die Notwendigkeit, die multimodale Therapie so schonend wie möglich durchzuführen, sodass dem Patienten nach einer effektiven Therapie ein möglichst hohes Maß an Lebensqualität erhalten bleibt. Dies hat zur Folge, dass die bisher für Bestrahlung mit

hochenergetischen Photonen maximal übliche Dosis von 70 Gy de facto nicht weiter gesteigert werden kann (Brodin and Tomé, 2018; Emami et al., 1991). Die Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen gilt deshalb als große Hoffnung, um die Behandlungsqualität von HNSCC zu steigern. Dies gilt neben der hohen biologischen Wirksamkeit und der effektiven Schonung des Normalgewebes auch deshalb, weil viele HNSCC hypoxische Areale enthalten, in denen eine Bestrahlung mit Photonen deutlich an Wirkung verliert, nicht jedoch eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen (Tinganelli et al., 2015).

In einer japanischen Phase II Studie konnte bereits 2012 gezeigt werden, dass sich eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen sehr gut für die Behandlung unterschiedlicher Kopf-Hals-Tumorentitäten eignet (Mizoe et al., 2012). Für adenoidzystische Karzinome der Speicheldrüse ist sogar eine Überlegenheit der ^{12}C -Ionenbestrahlung gegenüber anderen Therapiemodalitäten evident (Jensen et al., 2016b, 2016a, 2015). Auch für fortgeschrittene Tumoren des Oropharynx, Hypopharynx und Larynx konnte in einer Phase II Studie bereits gezeigt werden, dass ^{12}C -Ionen sicher und verträglich als Boost eingesetzt werden können (Hauswald et al., 2018). Eine weitere Studie zeigt dies ebenfalls für Tumoren im Bereich der vorderen Nasenhöhle (Eberle et al., 2022). Bisher fehlen jedoch belastbare Phase III Studien, die es erlauben würden, diese Strahlenart in der Routinebehandlung von HNSCC einsetzen zu können (Lazar et al., 2018).

Um solche Studien nicht nur für HPV-neg. sondern auch für HPV-pos. HNSCC planen und durchführen zu können, ist es erforderlich, vorab zu klären, wie HPV-pos. HNSCC-Zellen auf eine Behandlung mit ^{12}C -Ionen reagieren. Hierbei sollte vor allem bestimmt werden, ob auch für diese Strahlenart ein ähnlich deutlicher Unterschied zwischen den beiden Entitäten besteht, wie er nach der Bestrahlung mit Photonen nachzuweisen ist (Arenz et al., 2014; Rieckmann et al., 2013). Erst mit dieser Kenntnis könnten zukünftige Studien zur Bestrahlung von HPV-neg. und -pos. HNSCC mit ^{12}C -Ionen sicher geplant werden.

1.4. Fragestellung

Die größte Herausforderung in der Behandlung von HNSCC ist die Verhinderung des Auftretens bestrahlungsinduzierter Nebenwirkungen wie Xerostomie, Dysphagie und Mucositis. Hierfür ist es erforderlich, das Normalgewebe effektiver zu schonen und gleichzeitig die Tumorkontrollrate zu steigern. Die ^{12}C -Ionenbestrahlung stellt durch ihre höhere Präzision und die höhere biologische Wirksamkeit eine vielversprechende zukünftige Therapiealternative dar.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung einer Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen auf HPV-neg. und

HPV-pos. HNSCC-Zellen zu bestimmen. Hierfür soll sowohl das klonogene Überleben, die RBW sowie die Reparatur von Doppelstrangbrüchen untersucht werden. Die Experimente werden dabei an fünf HPV-pos. und fünf HPV-neg. HNSCC-Zelllinien durchgeführt. Damit soll die große biologische Bandbreite der beiden Entitäten erfasst werden.

Mit diesen Untersuchungen soll eine Grundlage erarbeitet werden, um für Patienten mit HPV-neg. und -pos. HNSCC sinnvolle Behandlungskonzepte mit ^{12}C -Ionenbestrahlung entwickeln zu können. Dafür sollen folgende Fragen als Grundlage dienen:

- Kann auch für HPV-pos. HNSCC-Zellen nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen ein deutlicher Rückgang des zellulären Überlebens beobachtet werden?
- Ist die Steigerung der Strahlenwirkung bei der Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen abhängig vom HPV-Status der HNSCC-Zellen?
- Besteht bei der Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen für HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen ein ähnlicher Unterschied im zellulären Überleben, wie er nach Photonenbestrahlung beobachtet werden kann?
- Besteht nach ^{12}C -Ionenbestrahlung ein Unterschied in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zwischen HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen?
- Welche Schlüsse müssen aus den Versuchen mit Zellkulturen für zukünftige klinische Studien gezogen werden?

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien werden mitsamt ihren Eigenschaften in Tabelle 1 aufgelistet. Sämtliche Zelllinien, deren Charakteristika und der HPV-Status wurden bereits in einschlägigen Veröffentlichungen beschrieben (Arenz et al., 2019, 2014; Ziemann et al., 2017, 2015). Um etwaige Kontaminationen auszuschließen, wurden sämtliche Zelllinien mittels *short tandem analysis* im Helmholtz-Zentrum in München unter Verwendung des GenePrint 10 kits (Promega, Mannheim, Deutschland) und der GeneMapper5.0-Software authentifiziert und überprüft. Die resultierenden Daten wurden mit den Expasy- und DMSZ-Datenbanken abgeglichen (Dirks et al., 2010). Weiterhin wurde regelmäßig auf Mycoplasmen untersucht.

Tabelle 1: HPV-pos. und -neg. HNSCC-Zellen

| Zelllinie | Alter und Geschlecht [1], [2] | Lokalisation [1], [2] | TNM [1], [2] | Therapie [1] | p53-Status [1], [2], [3], [4] | Labor |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------|---|-----------------|----------------------------------|-------|
| HPV-pos. | | | | | | |
| UM-SCC-47 | 53, m | OSCC | T ₃ N ₁ M ₀ | n.b. | wt | UM |
| UD-SCC-2 | 58, m | Hypopharynx | T ₁ N ₃ M ₀ | n.b. | wt | UD |
| 93VU-147T | 58, m | OSCC | T ₄ N ₂ M ₀ | k.T. | mut | VU |
| UM-SCC-104 | 56, m | OSCC | T ₄ N _{2b} M ₀ | RCT | wt | UM |
| UPCI:SCC154 | m | OSCC | T ₄ N ₂ | n.b. | wt | UPCI |
| HPV-neg. | | | | | | |
| UM-SCC-11b | 56, m | LSCC | T ₂ N _{2a} M ₀ | CT | mut | UM |
| UM-SCC-3 | 73, w | NPC (LK- Metastase) | n.b. | n.b. | mut | UM |
| UM-SCC-6 | 37, m | OPSCC | T ₂ N ₀ M ₀ | k.T. | mut | UM |
| UT-SCC-33 | 86, w | OSCC | T ₂ N ₀ M ₀ | k.T. | mut | UT |
| FaDu | 56, m | Hypopharynx | n.b. | n.b. | mut | ATCC |

aus Arenz et al., 2014 [1]; Lin et al., 2007 [2]; Hauser et al., 2002 [3]; Mandic et al., 2005 [4]

m: männlich; w: weiblich

LK: Lymphknoten; RCT: Radiochemotherapie; RT: Radiotherapie; k.T.: keine Therapie

wt: Wildtyp; mut: mutiert n.b.: nicht bekannt

UM: University of Michigan, USA; UD: Universität Düsseldorf, Deutschland; VU: University Medical Center Amsterdam, Niederlande; UPCI: University of Pittsburgh, USA; UT: Universität Turku, Finnland; ATCC: American Type Culture Collection

Für die Kultivierung wurde Roswell-Park-Memorial-Institute (RPMI) 1640 mit folgenden Zusätzen (im Folgenden als Vollmedium (VM) bezeichnet) genutzt:

- 10% fetales Kälberserum
- 1% nicht-essentielle Aminosäuren
- 1% L-Gutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin

Die Zellen wurden in Standard-T25- und -T75-Zellkulturflaschen mit Filter in 5 mL VM (in T25) beziehungsweise 10 mL VM (in T75) bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Es wurde bei der Kultivierung auf einen regelmäßigen Wechsel des Vollmediums geachtet. Zur Erhaltung und zur Verwendung wurden die Zellen mit Trypsin für 3-12 min inkubiert, abgelöst und in Vollmedium aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass für etwaige nachfolgende Experimente ausschließlich Zellen mit einer Konfluenz von 70-90% genutzt wurden. Die Zellzahl wurde mittels Zählung in der Neubauerzählkammer bestimmt. Für jeden Versuch wurde daraufhin zelllinienabhängig eine definierte Zellzahl (s. Tabelle 2 & Tabelle 3) ausgesät.

2.2. Bestrahlung

2.2.1. Photonenbestrahlung

Die Photonenbestrahlung fand an der Core Facility: Röntgenbestrahlungsanlage der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic statt. Verwendet wurde für die Bestrahlung eine X-RAD 320iX Röntgenröhre (Precision X-Ray Inc., Denver, USA). Die Zellen wurden in einem Fokus-Objekt-Abstand von 60 cm platziert und mit Photonen im Dosisbereich von 2-6 Gy mit einer Dosisrate von 1,2 Gy/min (bei 10 mA) bzw. 1,0 Gy/min (bei 8mA) mit 320 kV Beschleunigungsspannung bestrahlt. Ein 0,5 mm Kupfer- und 0,5 mm Aluminium-Filter sorgte für die Reduktion niederenergetischer Strahlung. Als Rückstreukörper diente eine 3 cm dicke Polymethylmethacrylat (PMMA)-Platte.

2.2.2. Kohlenstoffionenbestrahlung

Die Bestrahlung mit ¹²C-Ionen wurde am Marburger Ionenstrahl-Therapiezentrum (MIT) durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem vertikalen Strahl mit Energien von 114,5-129,5 MeV/n ¹²C-Ion bestrahlt. Es wurde ein *spread-out bragg peak* von 10 mm verwendet. Dafür wurden jeweils vier 6- oder 12-Well-Zellkulturplatten in

Bestrahlungskammern aus Plexiglas eingefasst, mit einem Deckel verschlossen und dann mittels Laser-Erfassungssystem positioniert und in einem Bestrahlungsfeld von 18x18 cm² bestrahlt.

2.3. 2D-Koloniebildungstest

Die Überlebensrate der Zellen wurde mittels Koloniebildungstest ermittelt, der als Goldstandard zur Bestimmung des klonogenen Überlebens gilt (Puck, 1956). Dafür wurden zelllinienabhängig eine zuvor bestimmte Anzahl Zellen (Berthold, 2017) in 6-Well-Platten ausgesät (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: ausgesäte Zellen pro Well für 2D-Koloniebildungstest

| Zelllinie | Zellzahl pro Well |
|-------------|-------------------|
| UM-SCC-47 | 800 |
| UD-SCC-2 | 200 |
| 93VU-147T | 900 |
| UM-SCC-104 | 1500 |
| UPCI:SCC154 | 2000 |
| UM-SCC-11b | 300 |
| UM-SCC-3 | 350 |
| UM-SCC-6 | 450 |
| UT-SCC-33 | 750 |
| FaDu | 400 |

Nach einer Inkubationszeit von 24 Std. wurden die Zellen mit Photonen oder ¹²C-Ionen bestrahlt und anschließend für 10-14 Tage bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Es wurde jeweils auch eine nicht bestrahlte, aber sonst gleichbehandelte, Kontrolle mitgeführt. Nach der Kultivierung wurde das verbrauchte VM abgesaugt, die gebildeten Zellkolonien auf der Platte mit phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und mittels 10%iger Formaldehydlösung mit 0,1%igem Kristallviolett-Zusatz fixiert und gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde anschließend vorsichtig mit Wasser abgewaschen. Für das Zählen der Kolonien wurde ein Olympus IX81-Mikroskop mit dem Olympus MPlanFL-Objektiv mit 2,5facher Vergrößerung (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet. Mithilfe der Xcellence-Software (Olympus, Hamburg, Deutschland) wurde die Plattenoberfläche eingescannt. Anschließend wurden die Kolonien in jedem Well

manuell gezählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass ausschließlich Kolonien von mehr als 50 Zellen gezählt wurden.

2.3.1. Auswertung

Aus der Anzahl der Kolonien bei den unbehandelten Zellen wurde die jeweilige Plattierungseffizienz (PE) berechnet. Auf diese Effizienz wurde die Zahl der Kolonien in den behandelten Zellen normiert (s. Tabelle 9).

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte entweder mittels Vergleichs spezifischer Überlebensfraktionen in biologisch vergleichbaren Dosen verschiedener Bestrahlungsmodalitäten oder als halblogarithmisch aufgetragene Dosis-Überlebenskurven nach dem linearquadratischen Modell nach Kellerer und Rossi (Herrmann et al., 2006):

$$SF(D) = e^{-(\alpha \cdot D + \beta \cdot D^2)}$$

SF beschreibt dabei die jeweilige Überlebensfraktion, D die applizierte Dosis, α die gewebespezifische Konstante des linearen Teils und β die gewebespezifische Konstante des quadratischen Teils.

Die Berechnung der relativen biologischen Wirkung erfolgte bei einem Überlebensniveau von 10%:

$$RBW_{10} = \frac{D_{10} (^{12}C)}{D_{10} (X)}$$

SF beschreibt dabei die jeweilige Überlebensfraktion und D die applizierte Dosis in Gy, die bei der Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen bzw. Photonen nötig war, um die Überlebensrate auf 10% zu reduzieren.

2.4. γ H2AX/53BP1-Immunfluoreszenz

Zur Schadenserkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen besitzen Zellen eine Vielzahl von Signalkaskaden, die umgehend auf diese Gefahr reagieren und in ihrer Gesamtheit als *DNA-Damage Response* bezeichnet werden. Eine zentrale Rolle spielt dabei die posttranslationale Phosphorylierung des Histons H2AX (Dikomey et al., 2012), das dann als γ H2AX bezeichnet wird. Während der ersten 30 Minuten nach DSB-Formation kommt es zur kaskadenartigen Phosphorylierung von H2AX-Molekülen über mehrere Megabasen hinweg sowie zur Akkumulation von DNA-Reparaturproteinen. Diese Areale

können dann als Foci nachgewiesen werden. Die Detektion dieser Foci erlaubt den bereits initialen Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen über die Darstellung von γ H2AX-Molekülen innerhalb des Zellkerns (Kinner et al., 2008).

Ein weiteres sehr schnell akkumulierendes DNA-Reparaturprotein ist das p53 binding protein 1 (53BP1). Es stellt in der DNA-Reparatur ein molekulares Gerüst dar, das die ATM-Aktivität amplifiziert und das Checkpoint-Signalling fördert (Panier and Boulton, 2014).

Für die Detektion von Doppelstrangbrüchen, die den wesentlichsten Marker zellulärer Schädigung nach Bestrahlung darstellen, und deren Reparatur wurde deshalb eine Ko-Färbung von γ H2AX und 53BP1 mittels Immunfluoreszenz durchgeführt (Popp et al., 2017). Zunächst wurden hierzu zelllinien- und messzeitpunktabhängig eine bestimmte Anzahl Zellen ausgesät (s. Tabelle 3). Jedes Well wurde vorher mit einem Deckglas mit 15 mm Durchmesser bestückt.

Tabelle 3: ausgesäte Zellen pro Well für γ H2AX/53BP1-Immunfluoreszenz

| Zelllinie | Zeitpunkt (t) der Fixierung nach Bestrahlung [Std.] | | | | |
|--------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| | 0 | 2 | 24 | 48 | 72 |
| UM-SCC-47 | 70.000 | | 60.000 | 40.000 | |
| UD-SCC-2 | 100.000 | | 80.000 | 50.000 | |
| 93VU-147T | 70.000 | 70.000 | 60.000 | 40.000 | 40.000 |
| UM-SCC-104 | 80.000 | | 70.000 | 60.000 | |
| UPCI:SCC154 | 90.000 | | 70.000 | 60.000 | |
| UM-SCC-11b | 70.000 | | 50.000 | 40.000 | |
| UM-SCC-3 | 70.000 | 70.000 | 50.000 | 40.000 | 40.000 |
| UM-SCC-6 | 70.000 | | 60.000 | 50.000 | |
| UT-SCC-33 | 75.000 | | 70.000 | 60.000 | |
| FaDu | 70.000 | | 50.000 | 50.000 | |

Nach 24 Std. Inkubationszeit wurden die Zellen mit Photonen bzw. mit ^{12}C -Ionen bestrahlt und anschließend bis zur Fixierung (2-72 Std.) bei 37°C und 5% CO_2 -Begasung kultiviert. Es wurde jeweils auch eine nicht bestrahlte, aber sonst gleichbehandelte, Kontrolle mitgeführt.

Zur Fixierung wurde das VM abgesaugt, die adhärennten Zellen auf den Deckgläsern für 10 min auf dem Schüttler mit PBS gewaschen und anschließend 10 min in 4%iger Para-Formaldehydlösung (PFA) in PBS auf dem Schüttler inkubiert. Überschüssige Fixierlösung wurde durch Absaugen des PFAs und dreimaliges Waschen mit PBS mit je 10 min Inkubationszeit auf dem Schüttler entfernt.

Die fixierten Zellen wurden für 10 min auf dem Schüttler mit einer 0,2%igen Triton X-100-Lösung in PBS permeabilisiert, um eine Antikörperbindung im Zellinneren zu

ermöglichen. Anschließend wurden sie mit 1%iger Lösung bovines Serumalbumins (BSA) in PBS für 10 min auf dem Schüttler gewaschen. Schließlich wurde die Permeabilisierung mit 3%iger BSA-Lösung in PBS für 1 Std. blockiert, um unspezifische Bindungen der später hinzugegebenen Antikörper zu verhindern.

Zur nachfolgenden Antikörperinkubation wurden die Deckgläser mit den darauf adhärenen Zellen mittels einer Pinzette aus den Wells herausgenommen und mit der Zellrasenseite nach oben zeigend in feuchte, lichtgeschützte Kammern auf Parafilm gelegt. Direkt im Anschluss wurden 60 µL der Primärantikörperlösung darauf pipettiert und die Zellen anschließend für 1,5 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Deckgläser mit 100 µL einer 0,1%igen Tween20-Lösung in PBS viermal gewaschen und anschließend 60 µL der Sekundärantikörperlösung darauf pipettiert und erneut eine Inkubationszeit von 1,5 Std. abgewartet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Sekundärantikörperlösung ausschließlich unter größtmöglichem Ausschluss von Licht hergestellt und verwendet wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläser erneut mit 100 µL einer 0,1%igen Tween20-Lösung in PBS viermal gewaschen. Anschließend wurden 8 µL des Eindeckmediums ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit inkludiertem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welches der Anfärbung von DNA dient, auf einen Objektträger pipettiert. Je zwei Glasdeckel wurden nun mit der Zellrasenseite nach unten zeigend mit jeweils 8 µL des Eindeckmediums auf einem Objektträger eingebettet. Bis zur Mikroskopie wurden die Objektträger für maximal eine Woche bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.4.1. Auswertung

Die Auswertung fand in der Core Facility: Zelluläre Bildgebung unter der Leitung von Dr. Katrin Roth im Zentrum für Tumor- und Immunbiologie der Philipps-Universität Marburg statt. Zur Mikroskopie wurde das Weitfeldmikroskop DM5500 von Leica (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einem Immersionsobjektiv mit 63facher Vergrößerung verwendet. Hierbei wurden Ausschnitte des Zellrasens unter Verwendung von durchschnittlich 20 Schichten mit einem Schichtabstand von 0,3 µm in den Fluoreszenzbereichen der jeweiligen Sekundärantikörper und DAPI fotografiert, mittels der am Mikroskop integrierten Leica-Software LAS-AF dekonvuliert und mittels der Software ImageJ übereinandergelegt (Abbildung 3).

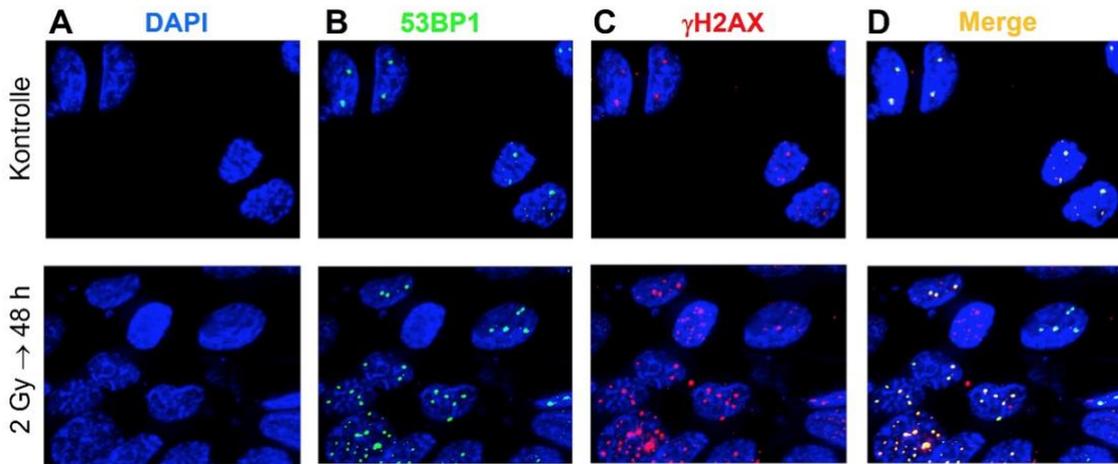


Abbildung 3: Nachweis von DSB mittels Ko-Färbung von γ H2AX- und 53BP1-Foci

Nachweis der DSB mittels immunhistochemischer Ko-Färbung der 53BP1- und γ H2AX-Foci und Fluoreszenzmikroskopie in unbestrahlten und bestrahlten 93VU-147T-Zellen. A) Nachweis der DNA mittels DAPI, B) Nachweis der 53BP1-Foci, C) Nachweis der γ H2AX-Foci, D) Überlagerung der Bilder

Abbildung 3 zeigt, dass die Zellkerne durch die DAPI-Färbung sehr gut darzustellen sind und dass die Immunfärbung eine klare Detektion der 53BP1 bzw. γ H2AX-Foci erlaubt (Abbildung 3B und C). Die Überlagerung der beiden Signale verstärkt diese klare Abtrennung vor dem Hintergrund und macht eine sichere und einfache Auswertung der DSB nach Bestrahlung möglich.

In jedem biologischen Replikat wurden die kolokalisierenden Foci von mindestens 100 Zellkernen aus mindestens zwei technischen Replikaten ausgezählt. Jede Kondition repräsentiert mindestens zwei biologische Replikate. Die nicht bestrahlten Kontrollen wurden jeweils als Hintergrund (HG) angenommen (Dahm-Daphi, 1996; Rothkamm and Löbrich, 2003), um ausschließlich die durch Bestrahlung induzierten Foci darstellen zu können. Auch in den Kontrollen wurden jeweils zwei biologische Replikate ausgezählt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte einerseits mittels Foci-Zeit-Diagramm, wobei der Hintergrund als horizontale, gestrichelte Linie eingezeichnet ist und andererseits mittels des Vergleichs residueller Foci zum Zeitpunkt 24 Std. nach Bestrahlung.

2.5. Statistik und Datenanalyse

Sämtliche Daten wurden zunächst in Microsoft Excel gesammelt. Auch die Berechnung der arithmetischen Mittel und der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Abbildungen 5 bis 14 erfolgte mittels Microsoft Excel. Mittels Graph Pad Prism erfolgte die graphische Aufarbeitung der Daten.

Die Signifikanz der Unterschiede zweier Gruppen wurden mittels zweiseitigem *studentischem t-test* bestimmt. Als signifikant wurde ein p-Wert $p < 0,05$ (*) angenommen, ein p-Wert $p < 0,01$ galt als hochsignifikant (**).

In den Korrelationsanalysen wurde mittels Graph Pad Prism eine lineare Regression durchgeführt und der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) berechnet. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels zweiseitigem t-test.

3. Ergebnisse

3.1. Zelluläre Radiosensitivität nach Photonenbestrahlung

Erstes Ziel war es, die Strahlenempfindlichkeit der HPV-pos. und HPV-neg. HNSCC-Zelllinien nach Photonenbestrahlung mithilfe des Koloniebildungstests zu bestimmen. Die Zellen wurden dafür in einer entsprechenden Zellzahl ausgesät (s. Tabelle 2). Nach 24 Std. wurden die adhärenierten Zellen mit Dosen bis zu 6 Gy bestrahlt und anschließend inkubiert, bis die Kolonien eine ausreichende Größe erreicht hatten (Abbildung 4A). Dabei wurden mehrere Zelllinien verwendet, um eine Gesamtaussage über die heterogene Gruppe der HNSCC formulieren zu können.

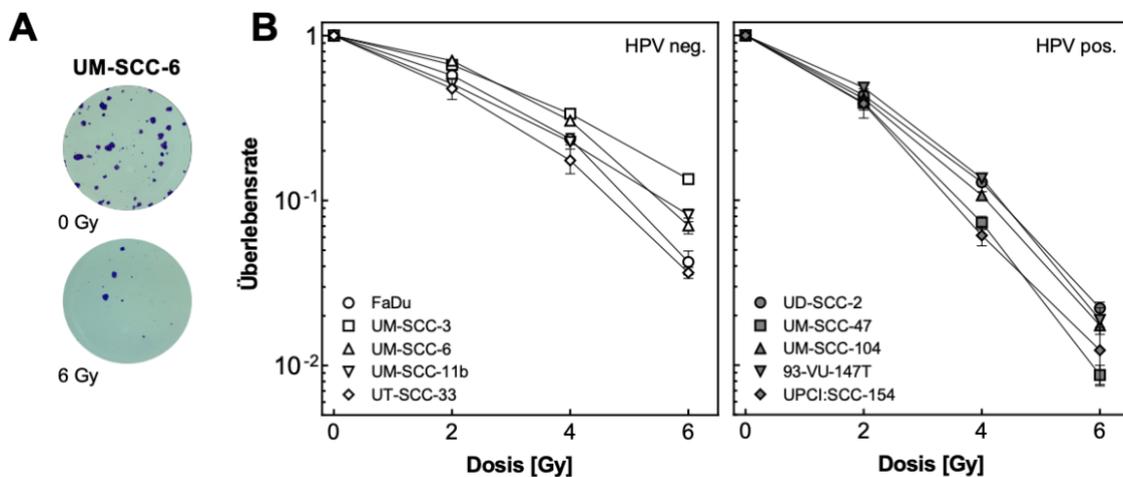


Abbildung 4: Wirkung von Photonenbestrahlung auf das zelluläre Überleben von HNSCC-Zellen

Die Zellen wurden mit Photonen in Dosen bis zu 6 Gy bestrahlt und anschließend inkubiert. A) Kolonien von unbestrahlten und bestrahlten UM-SCC-6-Zellen. B) Dosis-Überlebenskurven von HPV-neg. (links) und HPV-pos. (rechts) HNSCC-Zellen. (Lerch et al., 2020)

Sämtliche Zelllinien sind sensitiv gegenüber Photonenbestrahlung und die Überlebensrate nimmt deutlich mit zunehmender Dosis ab (Abbildung 4B). Es zeigt sich insgesamt eine größere Strahlensensibilität bei den HPV-pos. als bei den HPV-neg. Zelllinien.

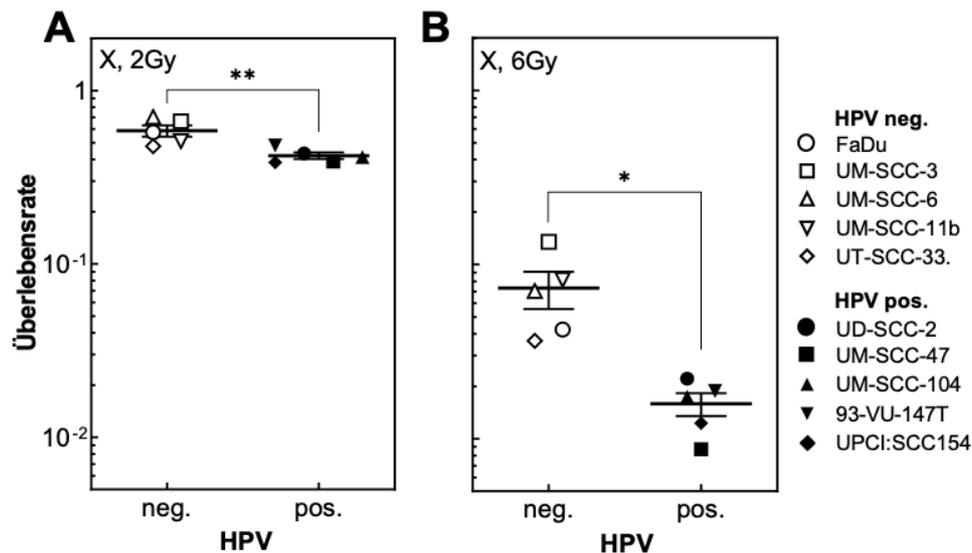


Abbildung 5: zelluläres Überleben nach 2 Gy und 6 Gy Photonenbestrahlung

Überlebensrate der HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC-Zellen nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy (A) und 6 Gy (B). Daten aus Abbildung 4. (modifiziert nach Lerch et al., 2020)

Der Unterschied wird deutlicher, wenn die Überlebensraten der beiden Entitäten für die kleinste (2 Gy) sowie die größte Dosis (6 Gy) nebeneinander aufgetragen werden (Abbildung 5A und B). Sowohl für die Dosis von 2 Gy (Abbildung 5A: $SF2_{\text{HPV-neg.}} = 0,59 \pm 0,086$; $SF2_{\text{HPV-pos.}} = 0,42 \pm 0,0036$; $p=0,0078$) als auch für die Dosis von 6 Gy (Abbildung 5B: $SF6_{\text{HPV-neg.}} = 0,073 \pm 0,017$; $SF6_{\text{HPV-pos.}} = 0,015 \pm 0,002$; $p=0,012$) zeigen sich signifikante Unterschiede des mittleren Überlebens. Diese Daten bestätigen die höhere Strahlensensibilität von HPV-pos. HNSCC-Zellen, die bereits mehrfach beschrieben wurde (Arenz et al., 2014; Rieckmann et al., 2013).

3.2. Zelluläre Radiosensitivität nach ^{12}C -Ionenbestrahlung

Mittels Koloniebildungstests wurden für die Zelllinien UM-SCC-6 (HPV-neg.) und UPCI:SCC154 (HPV-pos.) die Überlebensraten nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen in Dosen bis zu 3 Gy bestimmt. Die Überlebensraten der HPV-neg. als auch der HPV-pos. Zellen nehmen nach ^{12}C -Ionenbestrahlung sehr stark ab. Es zeigt sich, dass beide Zelllinien auf ^{12}C -Ionenbestrahlung wesentlich sensibler reagieren als auf Photonenbestrahlung (Abbildung 6). Der Vergleich der beiden Zelllinien zeigt aber auch, dass die Zunahme der Empfindlichkeit bei Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen für die HPV-neg. Zelllinie UM-SCC-6 (Abbildung 6A) deutlich größer ist als für die HPV-pos. Zelllinie UPCI:SCC154 (Abbildung 6B).

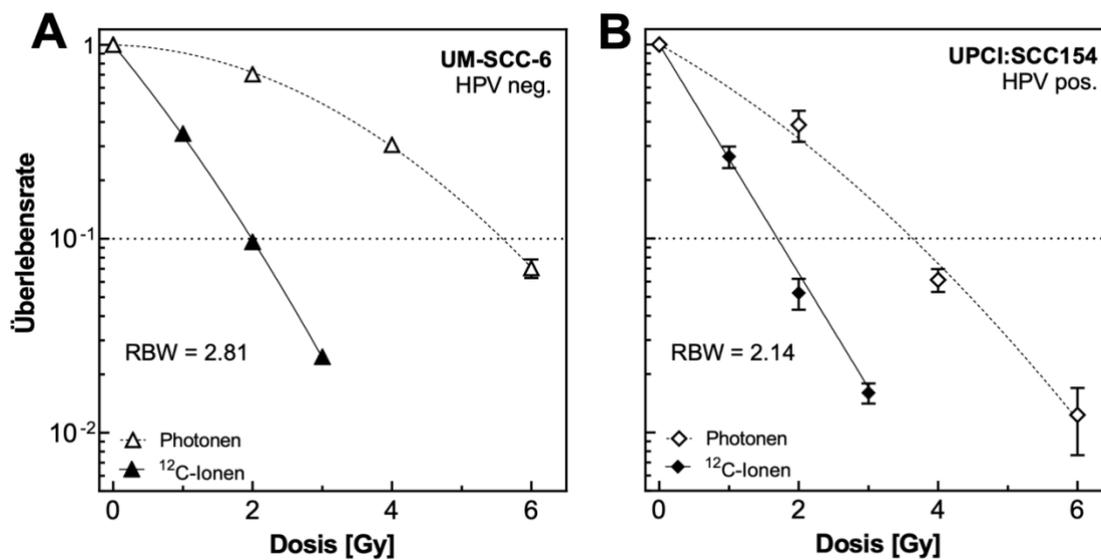


Abbildung 6: erhöhte RBW der ^{12}C -Ionenbestrahlung

Die Zellen wurden mit ^{12}C -Ionen in Dosen bis zu 3 Gy bestrahlt und anschließend inkubiert. Überlebensraten für Photonenbestrahlung aus Abbildung 4 A) HPV-neg. Zelllinie UM-SCC-6 B) HPV-pos. Zelllinie UPCI:SCC154. (Lerch et al., 2020)

Um diesen Unterschied im Zellüberleben zu quantifizieren, wurde die Relative Biologische Wirkung (RBW) der ^{12}C -Ionenbestrahlung bei 10% Überlebensrate bestimmt. In den Dosis-Überlebenskurven der HPV-neg. Zelllinie ist ein zelluläres Überleben von 10% abzulesen, wenn sie mit einer Dosis $D_{10}(\text{X})$ von 5,60 Gy Photonen oder einer Dosis $D_{10}(^{12}\text{C})$ von 1,99 Gy ^{12}C -Ionen bestrahlt wird. Daraus ergibt sich eine RBW_{10} von 2,81 ($\text{RBW}_{10} = \frac{5,60 \text{ Gy}}{1,99 \text{ Gy}} = 2,81$) für die Zelllinie UM-SCC-6. Für die HPV-pos. Zelllinie UPCI:SCC154 sind die Dosen $D_{10}(\text{X}) = 3,62 \text{ Gy}$ und $D_{10}(^{12}\text{C}) = 1,69 \text{ Gy}$ abzulesen, woraus sich eine RBW_{10} von 2,14 berechnen lässt. Diese Ergebnisse zeigen, dass für HPV-pos. Zellen eine geringere RBW_{10} der ^{12}C -Ionenbestrahlung anzunehmen ist als für HPV-neg. Zellen.

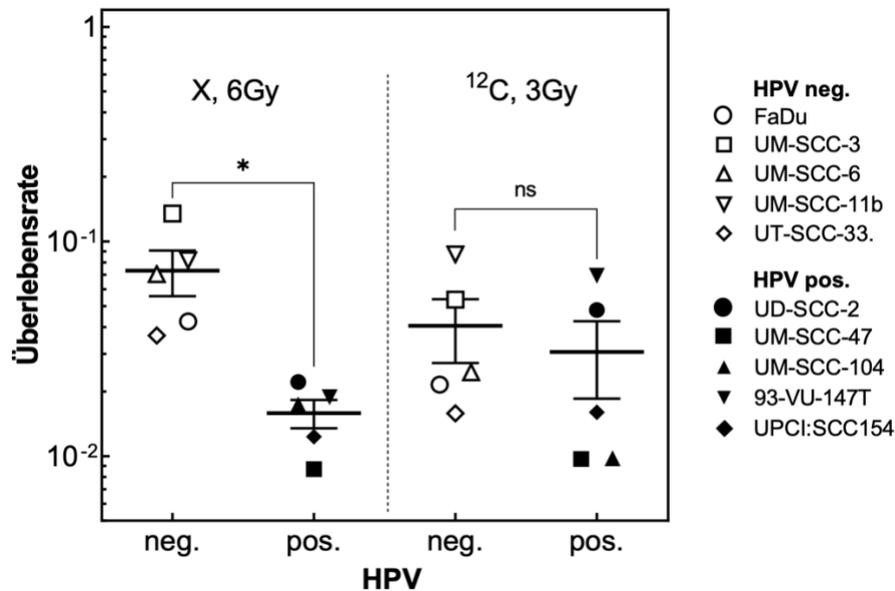


Abbildung 7: zelluläres Überleben nach Photonen- und ^{12}C -Ionenbestrahlung

Überlebensrate der HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC-Zellen nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy (links) und ^{12}C -Ionenbestrahlung mit 3 Gy (rechts). Daten für Photonenbestrahlung aus Abbildung 5B. (Lerch et al., 2020)

Um festzustellen, ob sich diese Tendenz generalisieren lässt, wurden die Überlebensraten aller verwendeten Zelllinien nach Bestrahlung mit isobiologischen Dosen beider Bestrahlungsmodalitäten verglichen. Hierbei wurde eine relative biologische Wirkung von 2 zugrunde gelegt. Die Überlebensraten der HPV-neg. und -pos. Zelllinien wurden nach 6 Gy Photonenbestrahlung und 3 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung bestimmt (Abbildung 7).

Nach 3 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung ergibt sich für die HPV-neg. Zelllinien im arithmetischen Mittel eine Überlebensrate von $\text{SF}_3 = 0,041 \pm 0,014$, für die HPV-pos. Zelllinien von $\text{SF}_3 = 0,031 \pm 0,013$. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abbildung 6 zeigt sich daher, dass bei der Bestrahlung mit 3 Gy ^{12}C -Ionen kein signifikanter Unterschied ($p=0,593$) in den Überlebensraten der HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC-Zellen vorliegt, während die Überlebensraten nach Photonenbestrahlung signifikant differieren. Damit wird erstmalig beobachtet, dass bei einer Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen im Gegensatz zur Bestrahlung mit Photonen kein signifikanter Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit HPV-neg. und -pos. HNSCC-Zellen besteht.

Während die mittlere Überlebensrate der HPV-neg. Zelllinien nach 3 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung im Vergleich zur mittleren Überlebensrate nach 6 Gy Photonenbestrahlung abnimmt, zeigen die HPV-pos. Zellen im Mittel eine höhere

Überlebensrate nach ^{12}C -Ionenbestrahlung. Dies bestätigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abbildung 6 die Tendenz, dass in HPV-neg. Zellen für ^{12}C -Ionenbestrahlung eine höhere RBW anzunehmen ist als in HPV-pos. Zellen.

3.3. Reparatur der Doppelstrangbrüche

Mithilfe der Ko-Färbung von γH2AX und 53BP1 wurden DNA-Doppelstrangbruch-Foci in einer HPV-neg. (UM-SCC-3) und einer HPV-pos. (93VU-147T) HNSCC-Zelllinie dargestellt (Abbildung 8) und deren Reparatur untersucht. Die Zellen wurden dafür bis zu 72 Std. nach der Bestrahlung fixiert und immunhistochemisch aufgearbeitet. Wiederum wurde eine RBW von 2 zugrunde gelegt, um die entstehenden DSB und deren Reparatur nach 2 Gy Photonen- und 1 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung zu vergleichen.

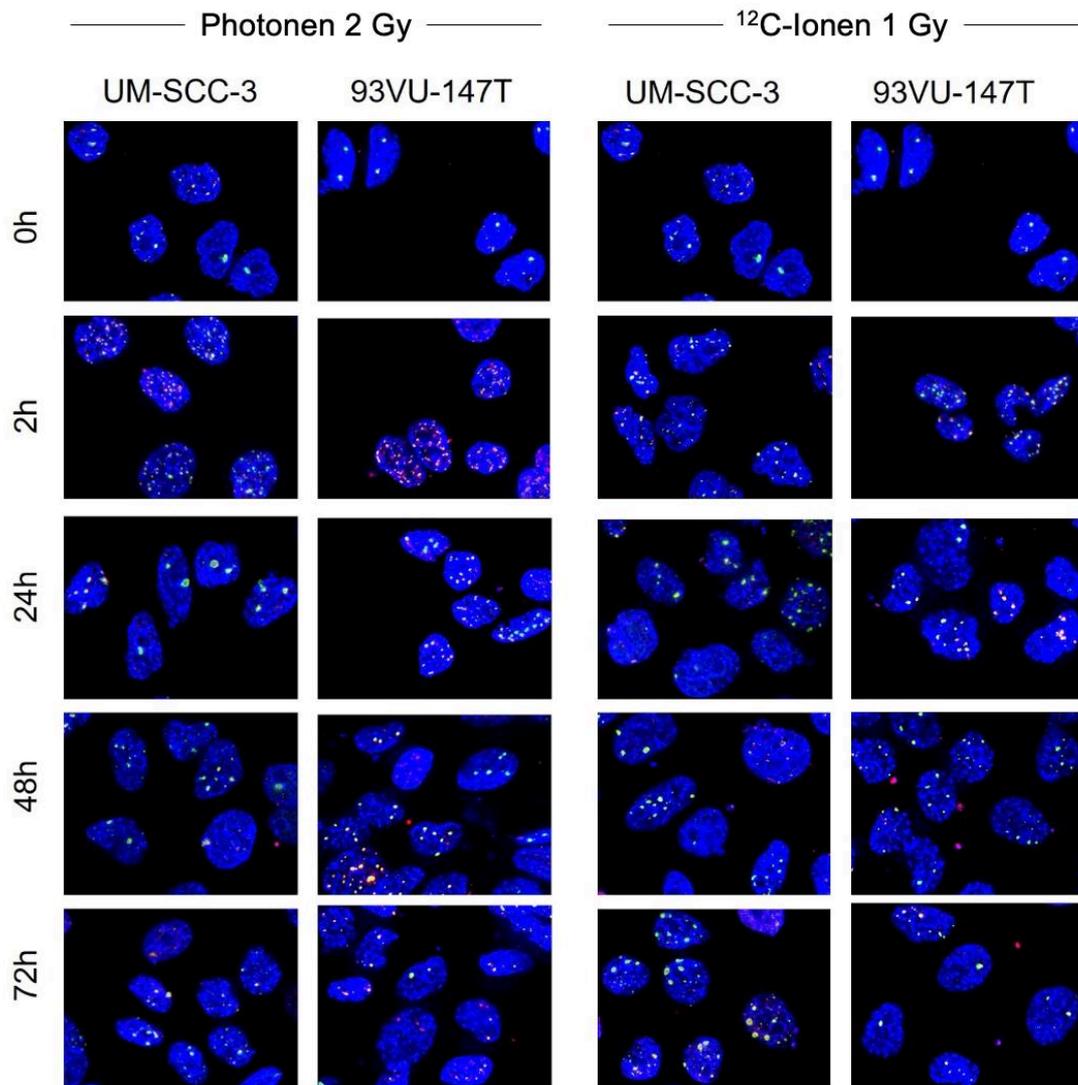


Abbildung 8: DSB nach Photonen- und ¹²C-Ionenbestrahlung

Die Zelllinien UM-SCC-3 (HPV-neg.) und 93VU-147T (HPV pos.) wurden mit Photonen in einer Dosis von 2 Gy und ¹²C-Ionen in einer Dosis von 1 Gy bestrahlt und die Zahl der DSB durch Ko-Färbung der 53BP1- und γH2AX-Foci bestimmt.

Während 2 Std. nach der Bestrahlung noch viele Foci in den Zellkernen nachweisbar sind, nimmt die Anzahl mit zunehmender Inkubationszeit ab. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurde die Anzahl der Foci in den Zellen zu verschiedenen Fixierungszeitpunkten ausgezählt und die Reparaturkinetik in einem Foci-Zeit-Diagramm ausgewertet (Abbildung 9).

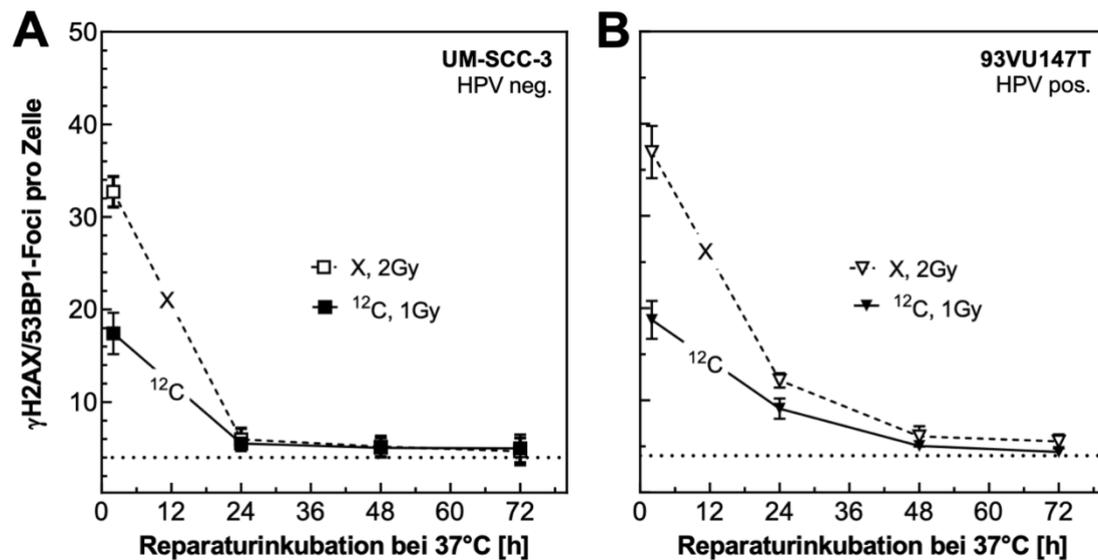


Abbildung 9: DSB-Reparaturkinetik nach Photonen- und ^{12}C -Ionenbestrahlung

Die Zelllinien UM-SCC-3 (HPV-neg.) und 93VU-147T (HPV pos.) wurden mit Photonen in einer Dosis von 2 Gy und mit ^{12}C -Ionen in einer Dosis von 1 Gy bestrahlt und die Zahl der DSB durch Ko-Färbung der 53BP1- und γH2AX -Foci zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten bestimmt. Die Zahl der Foci in unbestrahlten Zellen (HG) ist als gestrichelte Linie dargestellt. (Lerch et al., 2020)

Unabhängig von der Strahlenart sowie dem HPV-Status wird in allen Zellen eine deutliche Abnahme der Foci mit zunehmender Reparaturinkubation beobachtet, was ein Indikator für eine effektive DSB-Reparatur ist (Abbildung 9).

Die arithmetischen Mittel der Anzahl der Foci pro Zelle, welche zwei Stunden nach Bestrahlung gezählt wurden, stellen sich unabhängig vom HPV-Status ähnlich dar. Nach 2 Gy Photonenbestrahlung lassen sich in der HPV-neg. Zelllinie im Mittel $32,7 \pm 0,7$ Foci und in der HPV-pos. Zelllinie $36,9 \pm 2,8$ Foci nachweisen. Nach 1 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung zeigen sich hingegen nur etwa die Hälfte der Foci (HPV-neg.: $17,4 \pm 0,2$; HPV-pos.: $18,7 \pm 0,1$) wie nach Photonenbestrahlung (Abbildung 9A und B). Dies legt nahe, dass die Zahl der jeweils erzeugten DSB pro Gy für beide Strahlenarten nahezu identisch ist.

In der HPV-neg. Zelllinie zeigt sich sowohl nach Photonen- als auch nach ^{12}C -Ionenbestrahlung bereits nach 24 Std. eine fast vollständige Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche (Abbildung 9A). Im arithmetischen Mittel können unabhängig von der Bestrahlungsmodalität nach 24 Std. noch ca. 5,5 Foci pro Zelle detektiert werden. Dies bleibt auch nach 72 Std. konstant, weshalb davon auszugehen ist, dass später als 24 Std. nach Bestrahlung keine weitere Reparatur mehr stattfindet (Dahm-Daphi, 1996;

Rothkamm and Löbrich, 2003). Unter Einbeziehung des Hintergrunds, der durch das arithmetische Mittel der Anzahl der Foci in nicht bestrahlten Kontrollen festgelegt wird, kann für die HPV-neg. Zelllinie 24 Std. nach 2 Gy Photonenbestrahlung als auch nach 1 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung im Mittel ein residueller Foci (rFoci) abgeschätzt werden.

In der HPV-pos. Zelllinie zeigt sich die DNA-Doppelstrangbruchreparatur sowohl nach Photonen- als auch nach ^{12}C -Ionenbestrahlung verzögert. Eine vollständige Reparatur ist erst 48 Std. nach Bestrahlung zu beobachten. In der HPV-pos. Zelllinie können weniger residuelle Foci nach 1 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung ($r\text{Foci}_{12\text{C}}(24\text{h}) = 5$; $r\text{Foci}_{12\text{C}}(48\text{h}) = 1$) nachgewiesen werden als nach 2 Gy Photonenbestrahlung ($r\text{Foci}_x(24\text{h}) = 8$; $r\text{Foci}_x(48\text{h}) = 5$).

Trotz der initial deutlich geringeren Anzahl erzeugter DSB durch 1 Gy ^{12}C -Bestrahlung als durch 2 Gy Photonenbestrahlung, gleichen sich die Werte residueller DSB nach längerer Reparaturinkubation, insbesondere in der HPV-neg. Zelllinie, an. Damit deutet sich an, dass die DSB-Reparatur nach ^{12}C -Ionenbestrahlung, insbesondere in HPV-neg. Zellen, weniger effektiv ist als nach Photonenbestrahlung. Auch in der HPV-pos. Zelllinie deutet sich eine Verschlechterung der DSB-Reparatur an.

3.4. Residuelle Doppelstrangbrüche im Vergleich

Um festzustellen, ob sich diese Tendenz generalisieren lässt, wurde die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche aller verwendeten Zelllinien nach Bestrahlung mit isophysikalischen und isobiologischen Dosen beider Bestrahlungsmodalitäten verglichen. Dafür wurden die Zellen mit 2 Gy Photonen bzw. 1 und 2 Gy ^{12}C -Ionen bestrahlt und die Zahl der residuellen DSB mittels Ko-Färbung der $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ -Foci bestimmt, wobei diese Zahl jeweils um die Zahl der Foci in den unbestrahlten Zellen (Hintergrund) korrigiert wurde. Residuelle Doppelstrangbrüche wurden unabhängig vom HPV-Status der Zelllinie als jene Foci definiert, die nach einer Reparaturinkubation von 24 Std. gezählt werden konnten.

In der Anzahl der nachgewiesenen residuellen Foci 24 Std. nach 2 Gy Photonenbestrahlung zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,009$) zwischen den HPV-neg. und den HPV-pos. Zelllinien (Abbildung 10: linke Spalte). Im arithmetischen Mittel liegen bei den HPV-pos. Zellen mit $10,5 \pm 1,9$ mehr residuelle Foci vor als bei den HPV-neg. Zellen mit $2,3 \pm 0,5$. Wie in Abbildung 9 gezeigt, kann abgeschätzt werden, dass 2 Gy Photonenbestrahlung ca. 35 DSB erzeugt. Damit kann für HPV-neg. Zellen

eine Reparatureffizienz von 93% ($\frac{35-2,3}{35} = 0,93$) und für HPV-pos. HNSCC-Zellen von 70% ($\frac{35-10,5}{35} = 0,70$) berechnet werden. Dies bestätigt, dass HPV-pos. Zellen im Mittel Doppelstrangbrüche, die durch Photonenbestrahlung induziert wurden, schlechter reparieren können als HPV-neg. Zellen (Rieckmann et al., 2013).

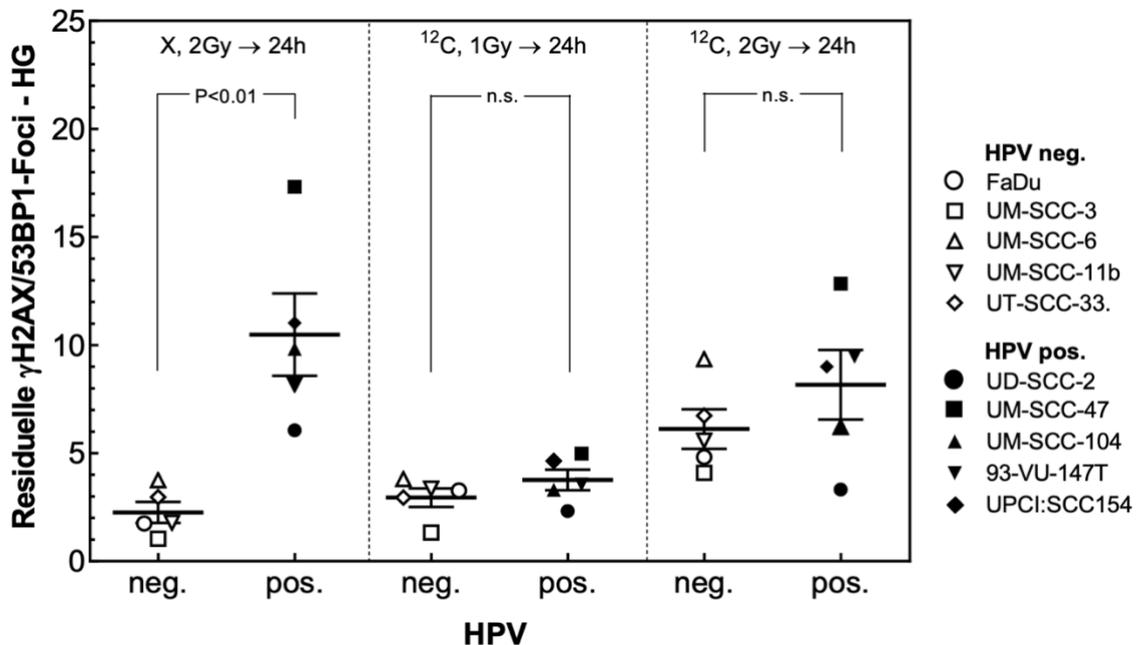


Abbildung 10: residuelle DSB nach Photonen- und ^{12}C -Ionenbestrahlung

Die Zelllinien wurden mit Photonen in einer Dosis von 1 Gy bzw. 2 Gy und mit ^{12}C -Ionen in einer Dosis von 1 Gy bestrahlt und nach 24 Std. Reparaturinkubation die Zahl der residuellen DSB durch Ko-Färbung der 53BP1- und γH2AX -Foci bestimmt. Hierzu wurden die Anzahl der Foci jeweils um die Zahl der Foci in unbestrahlten Zellen korrigiert. (Lerch et al., 2020)

Dieser Unterschied zeigte sich sowohl nach der ^{12}C -Ionenbestrahlung mit 1 Gy (isobiologische Dosis bei einer RBW von 2) als auch mit 2 Gy (iosphysikalische Dosis) nur noch geringfügig (Abbildung 10: mittlere und rechte Spalte) und war nicht mehr signifikant (1 Gy: $p=0,237$; 2 Gy: $p=0,301$). Nach 1 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung wurden in den HPV-neg. Zellen im Mittel $2,9 \pm 0,4$ und in den HPV-Positiven $3,9 \pm 0,5$ residuelle DSB nachgewiesen, während sich nach 2 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung in den HPV-neg. Zelllinien im Mittel $6,0 \pm 0,9$ und in den HPV-Positiven $8,1 \pm 1,5$ residuelle DSB zeigten. Damit wird erstmalig gezeigt, dass, anders als nach Photonenbestrahlung, nach ^{12}C -Ionenbestrahlung offensichtlich kein deutlicher Unterschied in der Effizienz der DSB-Reparatur vorliegt.

Für die HPV-neg. Zellen werden nach Bestrahlung mit 2 Gy ^{12}C -Ionen im Mittel signifikant mehr residuelle Foci gemessen als nach 2 Gy Photonenbestrahlung ($6,0 \pm 0,9$ vs. $2,3 \pm 0,5$, $p=0,003$). Wie bereits oben dargestellt, ist nach Abbildung 9 davon auszugehen, dass eine Bestrahlung mit 2 Gy unabhängig von der Strahlenart die gleiche Anzahl DSB erzeugt. Für die HPV-neg. Zellen kann daher eine Reparatureffizienz von 83% ($\frac{35-6,0}{35} = 0,83$) nach ^{12}C -Ionenbestrahlung abgeschätzt werden. Damit zeigt sich für HPV-neg. Zellen eine um 10% verringerte DSB-Reparatureffizienz als nach Photonenbestrahlung.

Überraschenderweise zeigten sich für die HPV-pos. Zellen nach 2 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung weniger residuelle DSB als nach 2 Gy Photonenbestrahlung ($8,1 \pm 1,5$ vs. $10,5 \pm 1,9$, $p=0,350$). Dies lässt vermuten, dass HPV-pos. Zellen durch ^{12}C -Ionen erzeugte DSB mindestens genauso effizient reparieren können wie jene, die durch Photonenbestrahlung erzeugt werden.

3.5. Korrelationsanalyse des zellulären Überlebens und der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche

Um die zuvor genannten Unterschiede HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC-Zelllinien besser zu verstehen, wurde die Beziehung der residuellen DSB und des zellulären Überlebens näher untersucht. Hierfür wurde die Überlebensrate nach 6 Gy Photonenbestrahlung gegen die Zahl der residuellen DSB nach 2 Gy Photonenbestrahlung aufgetragen (Abbildung 11A) und entsprechend das zelluläre Überleben nach 3 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung mit der Anzahl der residuellen Doppelstrangbrüche nach 1 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung korreliert (Abbildung 11B).

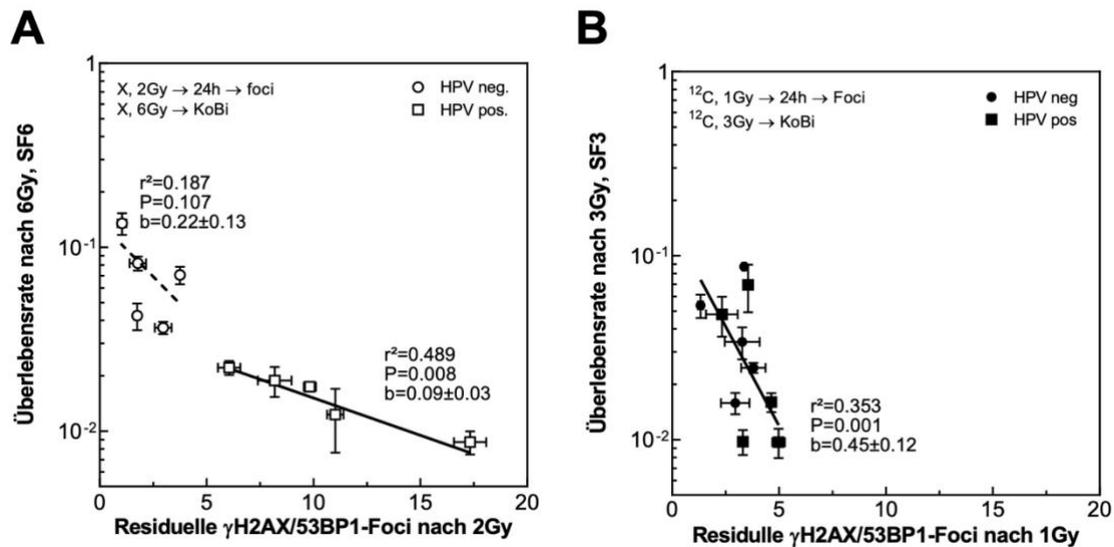


Abbildung 11: Assoziation zwischen residuellen DSB und zellulärem Überleben

Assoziation zwischen residuellen DSB und zellulärem Überleben für Photonen- und ^{12}C -Ionenbestrahlung. A) Aufgetragen ist das zelluläre Überleben nach 6 Gy Photonenbestrahlung gegen die Zahl der residuellen DSB nach 2 Gy. B) Aufgetragen ist das zelluläre Überleben nach 3 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung gegen die Zahl der residuellen DSB nach 1 Gy. Für die Regressionsanalyse wurden die logarithmierten Werte der Überlebensraten verwendet; b definiert die Neigung der linearen Regression. (Lerch et al., 2020)

Nach Photonenbestrahlung zeigen nur die HPV-pos. Zelllinien eine signifikante Korrelation zwischen der Überlebensrate und der Zahl der residuellen DSB ($r^2=0,489$; $p=0,008$). Die HPV-neg. HNSCC-Zellen weisen hingegen eine wesentlich kleinere Variation in der Anzahl der residuellen DSB auf, die deshalb nicht signifikant mit der Überlebensrate in Beziehung stehen ($r^2=0,187$; $p=0,107$). Auffällig ist, dass die beiden Assoziationen in der linearen Regression mit einer unterschiedlich starken Neigung beschrieben werden, wobei die HPV-neg. Zelllinien eine steiler geneigte Assoziation aufweisen ($b=0,22\pm 0,13$) als die HPV-pos. Zelllinien ($b=0,09\pm 0,03$). Dies deutet daraufhin, dass eine Zunahme der residuellen DSB in HPV-neg. Zellen mit einer stärkeren Abnahme der Überlebensrate einhergeht als in HPV-pos. Zellen. Dieser Unterschied deutet sich auch in anderen Untersuchungen an (Rieckmann et al., 2013).

Nach ^{12}C -Bestrahlung lässt sich die Beziehung zwischen Überlebensrate und residuellen DSB für HPV-pos. und -neg. Zellen durch eine gemeinsame signifikante Korrelation beschreiben ($r^2=0,353$; $p=0,001$). Die Assoziation weist in der linearen Regression mit $b=0,45\pm 0,12$ eine stärkere Neigung auf, als sie nach Photonenbestrahlung beobachtet werden kann. Dies deutet daraufhin, dass die durch

^{12}C -Bestrahlung induzierten residuellen DSB unabhängig vom HPV-Status in einer starken Abnahme der Überlebensrate resultieren.

Insgesamt zeigen die Assoziationen, dass je nach HPV-Status der Zellen eine unterschiedliche Beziehung zwischen residuellen DSB und Zellüberleben vorliegt. Nach Photonenbestrahlung sind in HPV-pos. Zellen mehr residuelle DSB für die Abnahme des Zellüberlebens erforderlich als in HPV-neg. Zellen. Nach ^{12}C -Bestrahlung sind bei beiden Entitäten deutlich weniger residuelle DSB nötig, um das Zellüberleben zu reduzieren.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von ^{12}C -Ionenbestrahlung auf HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC-Zellen zu charakterisieren und mit jener von Photonenbestrahlung zu vergleichen. Hierfür sollte an fünf HPV-pos. und fünf HPV-neg. HNSCC-Zelllinien das klonogene Überleben sowie die Reparatur von Doppelstrangbrüchen untersucht werden.

Es wurden Zelllinien ausgewählt, die bereits in anderen Publikationen der radiobiologischen Charakterisierung von HPV-neg. und -pos. HNSCC dienen (Arenz et al., 2014; Ziemann et al., 2015). Die große Zahl an Zelllinien wurde benutzt, um die Heterogenität der Tumoren der Kopf-Hals-Region abzubilden (Kasten-Pisula et al., 2011). Die HPV-neg. Zelllinien zeichnen sich durch p53-Mutationen aus, wie es für diese Entität typisch ist. Die HPV-pos. Zelllinien weisen hingegen bis auf die Zelllinie 93VU-147T einen p53-Wildtyp-Status auf (Tabelle 1). Dies spiegelt Grundbedingungen wider, wie sie aufgrund der ätiologischen Unterschiede zu erwarten und auch in der klinischen Situation zu finden sind (Wittekindt et al., 2012).

4.1. Zelluläre Radiosensitivität

Um die zelluläre Radiosensitivität von Tumoren der Kopf-Hals-Region nach ^{12}C -Ionenbestrahlung zu beurteilen, wurde zunächst die Reaktion der HNSCC-Zelllinien auf Photonenbestrahlung radiobiologisch charakterisiert. Dabei zeigte sich eine wesentlich höhere Strahlensensibilität in der Gruppe der HPV-pos. als in der Gruppe der HPV-neg. Zelllinien (Abbildung 4). Dies zeigte sich selbst bei der einer geringen Dosis von 2 Gy (Abbildung 5). Trotz der Heterogenität der Überlebensfraktionen, insbesondere im Bereich höherer Dosen, zeigte sich keine Überlappung der Dosis-Überlebenskurven zwischen HPV-pos. und HPV-neg. Zelllinien. Damit bestätigen diese Daten den Unterschied in der zellulären Empfindlichkeit HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC-Zellen auf Photonenbestrahlung (Arenz et al., 2014; Rieckmann et al., 2013; Seltzsaam et al., 2019; Ziemann et al., 2015). Diese Erkenntnisse spiegeln sich auch in der klinischen Situation wider. Der positive p16-Status dient hier als prognostischer Marker mit positivem Einfluss auf das Gesamtüberleben (Lassen et al., 2018) infolge einer höheren Therapiesensibilität HPV-assoziiierter OPSCC (Ang et al., 2010; Linge et al., 2016).

Erstmalig wurde in dieser Arbeit die zelluläre Empfindlichkeit von HPV-pos. Zellen auf ^{12}C -Ionenbestrahlung untersucht (Abbildungen 6 & 7). Hierbei zeigt sich, dass, anders als nach Photonenbestrahlung, kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate

HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC-Zelllinien besteht (Abbildung 7). Anhand der Dosis-Überlebens-Kurven wird die Ursache dafür deutlich. Während für die HPV-neg. Zelllinie UM-SCC-6 eine RBW_{10} von 2,81 gemessen werden kann, kann für die HPV-pos. Zelllinie UPCI:SCC154 lediglich eine RBW_{10} von 2,14 bestimmt werden (Abbildung 6). Für HPV-neg. HNSCC-Zellen wurden auch in anderen Arbeiten schon ähnliche Werte für die RBW_{10} publiziert (Bertrand et al., 2014; Beuve et al., 2008). Der Unterschied in der RBW_{10} auf HPV-pos. und HPV-neg. Zellen konnte durch Messungen des zellulären Überlebens aller Zelllinien nach 3 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung bestätigt werden (Abbildung 7). Mittlerweile wurde in weiteren Publikationen ein Unterschied der RBW_{10} von ^{12}C -Ionenbestrahlung auf HPV-pos. und -neg. HNSCC beschrieben, welche die Daten dieser Arbeit bestätigen (Osu et al., 2020).

Die etwas höheren Standardabweichungen der Mittelwerte nach ^{12}C -Ionenbestrahlung beim Vergleich des zellulären Überlebens der HPV-pos. und -neg. Zelllinien weisen noch einmal auf die Heterogenität der bestrahlten Zelllinien innerhalb der Gruppen sowie der HNSCC generell hin. Sie verdeutlichen die Relevanz der Suche nach weiteren therapeutischen Markern außer dem HPV-Status, die eine Selektion jener Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs ermöglichen, welche am meisten von der erhöhten biologischen Wirkung der ^{12}C -Ionenbestrahlung profitieren.

4.2. DSB-Reparaturkapazität

Das zelluläre Überleben bzw. die Strahlenempfindlichkeit von HNSCC-Zellen wird ganz wesentlich durch die jeweilige Reparaturkapazität der DSB bestimmt (Arenz et al., 2014; Kasten-Pisula et al., 2011; Seltzsam et al., 2019; Ziemann et al., 2017). Die Messung der DSB und deren Reparatur erfolgte in dieser Arbeit durch die Ko-Färbung von γH2AX und 53BP1 mittels Immunfluoreszenz, was eine bewährte Standardmethode darstellt (Popp et al., 2017). Dabei wurden ausschließlich kolokalisierte Foci gezählt, was die Sicherheit der Auszählung wesentlich erhöht.

Nach einer Photonendosis von 2 Gy konnten 2 Std. nach Bestrahlung in den beiden untersuchten Zelllinien UM-SCC-3 (HPV neg.) und 93VU-147T (HPV-pos.) im Mittel ca. 17 DSB pro Gy gezählt werden (Abbildung 9). Ähnliche Werte zeigten sich ebenfalls nach 1 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung (HPV-neg.: 17,4; HPV-pos.: 18,7), was nahelegt, dass die Induktion von Doppelstrangbrüchen durch die in dieser Arbeit verwendeten Bestrahlungsmodalitäten vor allem von deren physikalischer Dosis abhängig ist. Generell zeigt sich, dass die Zahl der DSB pro Gy abhängig vom LET der Strahlenart ist. Dabei stellt sich in einem LET-Bereich von 150-200 keV/ μm ein Maximum ein

(Heilmann et al., 1995; Taucher-Scholz et al., 1995). Für Partikelbestrahlung mit den hier gewählten Energien zwischen 114,5 und 129,5 MeV/n wurde bereits in einer anderen Arbeit publiziert, dass die gleiche Anzahl an DSB pro Gy erzeugt wird wie nach Photonenbestrahlung (Heilmann et al., 1995).

In beiden Zelllinien konnte anschließend sowohl nach Photonen- als auch nach ^{12}C -Ionenbestrahlung eine rasche Reparatur der DSB beobachtet werden. Diese war nach 24 Std. weitestgehend abgeschlossen, wobei die HPV-pos. Zelllinie eine geringfügig verzögerte Reparatur sowohl nach Photonen- als auch nach ^{12}C -Ionenbestrahlung aufwies. Erste Arbeiten aus dem eigenen Labor zeigen, dass HPV-pos. HNSCC-Zellen einen Defekt in der HR aufweisen (Ziemann et al., 2017), was ein Grund für die verzögerte Reparatur darstellen könnte. Nach ^{12}C -Ionenbestrahlung zeigte sich für die HPV-pos., vor allem aber auch für die HPV-neg. Zelllinie, eine geringere Effizienz der DSB-Reparatur, die in dieser Arbeit durch das Verhältnis von residuellen DSB zu initialen DSB beschrieben wird. Gleiches wurde auch in anderen Arbeiten nach Hoch-LET-Bestrahlung beobachtet (Taucher-Scholz et al., 1995).

4.3. Residuelle DSB

Nach Photonenbestrahlung zeigte sich zwischen den HPV-pos. und HPV-neg. Zelllinien ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der residuellen DSB, die als jene DSB definiert werden, die nach 24 Std. noch nachweisbar sind (Abbildung 10). Dies entspricht den Ergebnissen aus anderen Arbeiten (Arenz et al., 2014; Rieckmann et al., 2013; Ziemann et al., 2015) und bestätigt, dass HPV-pos. HNSCC-Zellen nach Photonenbestrahlung eine höhere Anzahl an residuellen DSB und damit eine geringere DSB-Reparatureffizienz aufweisen als HPV-neg. Zellen. Dies könnte wie auch die verminderte Reparaturkapazität auf einen Defekt HPV-pos. HNSCC-Zellen in der HR zurückzuführen sein (Ziemann et al., 2017).

In dieser Arbeit wurde erstmalig beschrieben, dass HPV-pos. und HPV-neg. HNSCC-Zellen nach ^{12}C -Ionenbestrahlung keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl residueller DSB aufweisen. Dies zeigt sich sowohl nach der Bestrahlung mit 1 Gy als auch mit 2 Gy ^{12}C -Ionenbestrahlung (Abbildung 10). Werden diese Werte mit jenen nach Photonenbestrahlung verglichen, so zeigt sich für HPV-neg. Zellen eine deutlich geringere DSB-Reparatureffizienz.

Eine wesentliche Ursache dafür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit, dass durch Hoch-LET-Strahlung DSB erzeugt werden, die wesentlich komplexer und damit schlechter zu

reparieren sind (Jezkova et al., 2018). In anderen Arbeiten wurde außerdem gezeigt, dass diese hochkomplexen DSB an den Bruchenden bearbeitet werden (Averbeck et al., 2014), sodass bestimmte Reparaturwege wie die HR behindert werden und andere Prozesse wie das alternative End-Joining (alt-EJ) bevorzugt werden (Liu et al., 2018; Takahashi et al., 2014). Diese Annahmen müssen noch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Sie liefern jedoch einen möglichen wichtigen Hinweis darauf, warum der Defekt in der HR, den HPV-pos. HNSCC aufweisen, nach ^{12}C -Ionenbestrahlung eine geringere Rolle zu spielen scheint und warum HPV-pos. Zellen die durch ^{12}C -Ionen erzeugten DSB mindestens genauso effizient reparieren können wie jene, die durch Photonenbestrahlung erzeugt werden (Abbildung 10).

4.4. Bedeutung der residuellen Doppelstrangbrüche für das Zellüberleben

Mit dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Beziehung zwischen zellulärem Überleben und residuellen DSB in HNSCC-Zellen sowohl vom HPV-Status als auch von der Strahlenart abhängt. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Empfindlichkeit einer Zelllinie auf Photonenbestrahlung wesentlich von deren DSB-Reparatureffizienz bestimmt wird (Kötter et al., 2014; Rieckmann et al., 2013) und bereits eine Reduktion der Reparatureffizienz um ein Prozent einen erheblichen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit nimmt (Kasten-Pisula et al., 2005).

In den Korrelationsanalysen zeigt sich dieser Zusammenhang in der Steilheit der Assoziationen. Während die Assoziation der HPV-neg. Zelllinien mit einer starken Neigung zu beschreiben ist, verläuft jene der HPV-Pos. flacher (Abbildung 11). Offensichtlich bewirkt die Zunahme residueller DSB in HPV-pos. Zellen keine so starke Zunahme der Strahlenempfindlichkeit wie in HPV neg. HNSCC-Zellen. Dies erklärt sich daraus, dass DSB in HPV-pos. Zellen aufgrund eines Defekts in der HR (Ziemann et al., 2017) vor allem in späten Zellzyklusphasen akkumulieren, während sie in HPV-neg. Zellen über alle Zellzyklusphasen hinweg auftreten (Arenz et al., 2014; Beucher et al., 2009). Da der DNA-Gehalt in der S- und G2-Phasezellen höher ist, werden in der Regel auch mehr residuelle DSB benötigt, um beide Tochterzellen abzutöten (Durante et al., 2013).

Korreliert man hingegen residuelle DSB und das zelluläre Überleben nach ^{12}C -Bestrahlung, so lässt sich die Assoziation unabhängig vom HPV-Status beschreiben (Abbildung 11). Dies stützt die These, dass die HR nach ^{12}C -Bestrahlung eine geringere Rolle in der DNA-Reparatur spielt als nach Photonenbestrahlung. Die wesentlich stärkere Neigung der Assoziation lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die hohe

Komplexität der durch Hoch-LET-Bestrahlung induzierten DSB zurückführen. Diese bedingt ein hohes Risiko für fehlerhafte Reparaturen und damit für letale Chromosomenschäden (Lee et al., 2010).

4.5. Schlussfolgerung und Ausblick

In der Arbeit konnte mittels der Bestrahlung kultivierter Zelllinien gezeigt werden, dass sich der nach Photonenbestrahlung beobachtete deutliche Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit HPV-pos. und -neg. HNSCC-Zellen nach ^{12}C -Ionenbestrahlung nicht mehr nachweisen lässt. Dabei fiel auf, dass die Angleichung der Radiosensibilität dadurch entsteht, dass ^{12}C -Ionenbestrahlung eine höhere relative biologische Wirkung auf HPV-neg. Zellen als auf HPV-Pos. hat. Insbesondere die Ergebnisse zur Korrelation von residuellen DSB mit dem zellulären Überleben lassen vermuten, dass die komplexere Struktur der durch ^{12}C -Ionenbestrahlung induzierten Doppelstrangbrüche die erhöhte biologische Wirkung vermittelt. Geprüft werden sollte, inwieweit der DNA-Reparaturdefekt HPV-pos. HNSCC in der HR einen Einfluss auf deren geringeres Ansprechen auf ^{12}C -Ionenbestrahlung hat. Dabei sollte insbesondere die Rolle alternativer DNA-Reparaturwege untersucht werden.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Strahlenempfindlichkeit sowohl von HPV-neg. als auch von HPV-pos. HNSCC durch eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen gesteigert werden kann, wobei die Strahlenempfindlichkeit der beiden Entitäten nicht relevant differiert. Dieser markante Unterschied zur Bestrahlung von HNSCC mit Photonen, bei der sich ein deutlicher Unterschied in der Strahlensensibilität zwischen HPV-neg. und HPV-pos. HNSCC zeigt, ist bei der Planung klinischer Studien mit HNSCC-Patienten unbedingt zu berücksichtigen. Insbesondere im Bereich HPV-negativer HNSCC besteht wegen der bisher erzielten Heilungsraten von nur 40-60% großer Handlungsbedarf. Da eine weitere Eskalation der klassischen Radiochemotherapie aufgrund der bereits bei den derzeit verwendeten Behandlungsschemata auftretenden starken Nebenwirkungen kaum möglich ist, kann die zielgenauere und innerhalb des Zielvolumens biologisch wesentlich wirksamere ^{12}C -Ionenbestrahlung, insbesondere im Bereich der Behandlung HPV-neg. HNSCC, eine sinnvolle zukünftige Alternative darstellen.

5. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) sind mit über 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr die sechsthäufigste Tumorerkrankung weltweit. Sie lassen sich ätiologisch in eine primär noxen-bedingte (HPV-negative) Gruppe und eine mit Hoch-Risiko-Typen des Humanen Papilloma-Virus assoziierte (HPV-positive) Gruppe differenzieren. In fortgeschrittenen Stadien werden HNSCC mit einer Radiochemotherapie mit hochenergetischen Photonen behandelt. In Studien hat sich gezeigt, dass HPV-positive HNSCC wesentlich sensibler auf die Therapie reagieren, was biologisch unter anderem auf einen Defekt in der DNA-Reparatur zurückzuführen ist. Dies führt dazu, dass der positive p16-Status, der als Surrogatmarker für die HPV-Infektion fungiert, ebenfalls ein prognostischer Marker ist. Dieser geht mit einer höheren 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate (>80%) einher, während die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von Patienten mit fortgeschrittenen HPV-negativen HNSCC mit ca. 50% abgeschätzt werden kann. Dies zeigt, dass eine Eskalation der biologischen Therapiewirkung von Nöten ist, um das Überleben von Patienten mit HNSCC zu verbessern. Diese ist aber nur schwer erreichbar, da die Therapie bereits jetzt schwere Nebenwirkungen wie Entzündungen der Mundschleimhaut, Mundtrockenheit und Dysphagie hervorruft. Nicht selten machen diese Nebenwirkungen eine künstliche Ernährung nötig oder führen sogar zum Abbruch der Therapie. Eine vielversprechende zukünftige Alternative stellt die hoch-konformale Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen dar, da diese sowohl eine effektive Normalgewebsschonung ermöglicht als auch eine erhöhte biologische Wirkung auf den Tumor aufweist.

Um die Etablierung von ^{12}C -Ionenbestrahlung an Patienten mit HNSCC zu ermöglichen, ist eine Charakterisierung der biologischen Wirkung dieser Bestrahlungsmodalität auf HNSCC-Zellen von Nöten. Ziel dieser Arbeit war es, diese Erkenntnisse anhand von fünf HPV-negativen und fünf HPV-positiven HNSCC-Zelllinien zu erarbeiten.

Dabei wurden folgende Resultate erzielt:

- Die erhöhte Sensibilität HPV-positiver HNSCC-Zellen gegenüber Photonenstrahlung konnte durch diese Arbeit bestätigt werden.
- Die Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen führt sowohl bei HPV-positiven als auch bei HPV-negativen HNSCC-Zellen zu einer deutlich höheren Strahlensensibilität.
- Für HPV-positive Zellen zeigt sich eine geringere relative biologische Wirkung der ^{12}C -Ionenbestrahlung als für HPV-negative HNSCC-Zellen.
- Der Unterschied in der relativen biologischen Wirkung führt zu einer Angleichung des zellulären Überlebens HPV-positiver und HPV-negativer HNSCC-Zellen nach ^{12}C -Ionenbestrahlung.

- Während sich nach Photonenbestrahlung deutlich mehr residuelle DNA-Doppelstrangbrüche in HPV-positiven Zellen als in HPV-negativen Zellen zeigen, ist nach der Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl residueller Doppelstrangbrüche mehr nachweisbar.
- Die Assoziation der Ergebnisse für das zelluläre Überleben mit der Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche zeigt, dass, in Analogie zu den Ergebnissen nach Photonenbestrahlung, auch nach der Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen die Doppelstrangbruch-Reparatureffizienz das zelluläre Überleben wesentlich bestimmt.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass bei einer Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen kein signifikanter Unterschied im zellulären Überleben HPV-positiver und HPV-negativer HNSCC nachweisbar ist. Dies steht in erheblichem Kontrast zu den Ergebnissen, die nach der Bestrahlung mit hochenergetischen Photonen gefunden werden können. Dieser markante Unterschied ist bei der Planung zukünftiger Studien zum Einsatz von ^{12}C -Ionenbestrahlung zur Behandlung von HNSCC unbedingt zu berücksichtigen.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht: 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. Dabei wurde die Veröffentlichung vom Erstautor konzipiert, ausgewertet und geschrieben.

6. Summary

Tumors of the head and neck region (HNSCC) are the sixth most common cancer worldwide with nearly 600.000 new cases every year. They can be subdivided in a subgroup which is mainly driven by noxa (HPV-negative) and a subgroup which is mainly depending on a chronic infection with a high-risk papilloma virus (HPV-positive). In advanced stages these tumors are generally treated by photon-based radiochemotherapy. It is shown in several studies that patients with HPV-positive HNSCC profit more from the therapy than patients with HPV-negative HNSCC. This is considered to result from an increased cellular radiosensitivity of HPV-positive HNSCC caused by a defect in DNA double strand break repair. This stronger effect leads to an increased 5-year overall survival rate (>80%) of patients with a p16-positive tumor which is a surrogate marker for HPV positivity and therefore also a prognostic marker. The 5-year overall survival of patients with HPV-negative HNSCC is worse with about 50% mainly depending on the state. Therefore, a therapy escalation is necessary to increase the survival rates of patients with HNSCC. However, even the therapy schemes which are currently used are accompanied with substantial rates of side effects like mucositis, xerostomia or dysphagia. This leads to a relevant number of cases which need artificial feeding or makes it even necessary to break up the therapy.

For HNSCC a promising alternative is seen in the high conformal irradiation with carbon ions (^{12}C -ions). This radiation quality allows a strong local effect on the tumor with a noticeable protection of the normal tissue at the same time. Before starting a clinical trial with ^{12}C -ion irradiation on patients the effects of these ions on HNSCC cells must be known. The aim of this study was to obtain these data by using five HPV-negative and five HPV-positive HNSCC cell lines.

The following results were obtained:

- The study could confirm the higher radiosensitivity of HPV-positive HNSCC cells for irradiation with photons.
- The irradiation with ^{12}C -ions leads to an increase of radiosensitivity in HPV-positive and HPV-negative HNSCC cells.
- ^{12}C -ion irradiation showed a lower relative biological effect on HPV-positive HNSCC cells than on HPV-negative HNSCC cells.
- The difference in the relative biological effectiveness led to an alignment of cellular survival of HPV-positive and HPV-negative HNSCC cells after ^{12}C -ion irradiation.

- More residual DNA double strand breaks can be found in HPV-positive cells than in HPV-negative cells after photon irradiation. After ^{12}C -ion irradiation there was no significant difference.
- The association between residual DNA double strand breaks and cell survival shows that both after photon irradiation and after ^{12}C -ion irradiation cellular survival is mainly depending on the DNA double strand break repair efficacy.

It is shown here for the first time that the cellular survival of HPV-positive and HPV-negative HNSCC cells does not differ significantly after an irradiation with ^{12}C -ions. This stands in contrast to the huge difference previously found after photon irradiation. This marked difference needs to be considered when planning new trials for the clinical application of ^{12}C -ion irradiation for patients with both HPV-negative and HPV-positive HNSCC.

Parts of this work were published: 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. The article was designed, evaluated and written by the first named author.

7. Literaturverzeichnis

- Andl, T., Kahn, T., Pfuhl, A., Nicola, T., Erber, R., Conradt, C., Klein, W., Helbig, M., Dietz, A., Weidauer, H., Bosch, F.X., 1998. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res.* 58, 5–13.
- 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>
- Arenz, A., Patze, J., Kornmann, E., Wilhelm, J., Ziemann, F., Wagner, S., Wittig, A., Schoetz, U., Engenhardt-Cabillic, R., Dikomey, E., Fritz, B., 2019. HPV-negative and HPV-positive HNSCC cell lines show similar numerical but different structural chromosomal aberrations. *Head Neck* 41, 3869–3879. <https://doi.org/10.1002/hed.25924>
- Arenz, A., Ziemann, F., Mayer, C., Wittig, A., Dreffke, K., Preising, S., Wagner, S., Klusmann, 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>
- Averbeck, N.B., Ringel, O., Herrlitz, M., Jakob, B., Durante, M., Taucher-Scholz, G., 2014. DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells. *Cell Cycle* 13, 2509–2516. <https://doi.org/10.4161/15384101.2015.941743>
- Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Baumli, J.M., Vinnakota, R., Anna Park, Y.H., Bates, S.E., Fojo, T., Aggarwal, C., Di Stefano, J., Knepley, C., Limaye, S., Mamtani, R., Wisnivesky, J., Damjanov, N., Langer, C.J., Cohen, R.B., Sigel, K., 2019. Cisplatin versus cetuximab with definitive concurrent radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma: An analysis of Veterans Health Affairs data. *Cancer* 125, 406–415. <https://doi.org/10.1002/cncr.31816>
- Bekker-Jensen, S., Mailand, N., 2010. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair* 9, 1219–1228. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.010>

- Berthold, S., 2017. Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit HPV (-) und HPV (+) HNSCC-Zelllinien unter 2D- und 3D-Kultivierungsbedingungen (Master-Thesis). Philipps-Universität Marburg.
- Bertrand, G., Maalouf, M., Boivin, A., Battiston-Montagne, P., Beuve, M., Levy, A., Jalade, P., Fournier, C., Ardail, D., Magné, N., Alphonse, G., Rodriguez-Lafrasse, C., 2014. Targeting Head and Neck Cancer Stem Cells to Overcome Resistance to Photon and Carbon Ion Radiation. *Stem Cell Rev. Rep.* 10, 114–126. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9467-y>
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A., Löbrich, M., 2009. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* 28, 3413–3427. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.276>
- Beuve, M., Alphonse, G., Maalouf, M., Colliaux, A., Battiston-Montagne, P., Jalade, P., Balanzat, E., Demeyer, A., Bajard, M., Rodriguez-Lafrasse, C., 2008. Radiobiologic Parameters and Local Effect Model Predictions for Head-and-Neck Squamous Cell Carcinomas Exposed to High Linear Energy Transfer Ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 71, 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.10.050>
- Bracalente, C., Ibañez, I.L., Molinari, B., Palmieri, M., Kreiner, A., Valda, A., Davidson, J., Durán, H., 2013. Induction and persistence of large γ H2AX foci by high linear energy transfer radiation in DNA-dependent protein kinase-deficient cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 87, 785–794. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.07.014>
- 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>
- Brodin, N.P., Tomé, W.A., 2018. Revisiting the dose constraints for head and neck OARs in the current era of IMRT. *Oral Oncol.* 86, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.08.018>
- 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, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-28>

- 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>
- Coca-Pelaz, A., Takes, R.P., Hutcheson, K., Saba, N.F., Haigentz, M., Bradford, C.R., de Bree, R., Strojan, P., Lund, V.J., Mendenhall, W.M., Nixon, I.J., Quer, M., Rinaldo, A., Ferlito, A., 2018. Head and Neck Cancer: A Review of the Impact of Treatment Delay on Outcome. *Adv. Ther.* 35, 153–160. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0663-7>
- Cramer, J.D., Burtneess, B., Le, Q.T., Ferris, R.L., 2019. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 669–683. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0227-z>
- Cramer, J.D., Hicks, K.E., Rademaker, A.W., Patel, U.A., Samant, S., 2018. Validation of the eighth edition American Joint Committee on Cancer staging system for human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Head Neck* 40, 457–466. <https://doi.org/10.1002/hed.24974>
- Dahm-Daphi, 1996. Rejoining of DNA double-strand breaks in X-irradiated CHO cells studied by constant- and graded-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 69, 615–621. <https://doi.org/10.1080/095530096145625>
- Dikomey et al., 2016. Radiation DNA damage and use in cancer therapeutics - translation of radiation modifiers, in: *DNA Repair in Cancer Therapy*. Elsevier Inc., pp. 329–347.
- Dikomey et al. (Ed.), 2012. *Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen*, in: Zeller - Zur Hausen Onkologie. ecomed Sorck, Heidelberg.
- 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>
- D'Souza, G., Kreimer, A.R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W.M., Westra, W.H., Gillison, M.L., 2007. Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 356, 1944–1956. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497>
- 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. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 756, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.014>

- Durante, M., Debus, J., 2018. Heavy Charged Particles: Does Improved Precision and Higher Biological Effectiveness Translate to Better Outcome in Patients? *Semin. Radiat. Oncol.* 28, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.11.004>
- Eberle, F., Engenhardt-Cabillic, R., Schymalla, M.M., Dumke, C., Schötz, U., Subtil, F.S.B., Baumann, K.-S., Stuck, B.A., Langer, C., Jensen, A., Hauswald, H., Lautenschläger, S., 2022. Carbon Ion Beam Boost Irradiation in Malignant Tumors of the Nasal Vestibule and the Anterior Nasal Cavity as an Organ-Preserving Therapy. *Front. Oncol.* 12, 12.
- Emami, B., Lyman, J., Brown, A., Cola, L., Goitein, M., Munzenrider, J.E., Shank, B., Solin, L.J., Wesson, M., 1991. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol.* 21, 109–122. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90171-Y](https://doi.org/10.1016/0360-3016(91)90171-Y)
- Fokas, E., Kraft, G., An, H., Engenhardt-Cabillic, R., 2009. Ion beam radiobiology and cancer: Time to update ourselves. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1796, 216–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.07.005>
- Gemmel, A., 2009. Berechnung der RBW-gewichteten Dosis und biologische Dosimetrie für bewegte Zielvolumina in der Tumortherapie mit gescannten Kohlenstoffionen (Inauguraldissertation). Technische Universität Darmstadt.
- Goodhead, D., 1999. Mechanisms for the Biological Effectiveness of High-LET Radiations. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 40, 1–13. <https://doi.org/10.1269/jrr.40.S1>
- Goodhead, D.T., 1994. Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing Radiations: Clustered Damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 7–17. <https://doi.org/10.1080/09553009414550021>
- Greaves, J.R., 2018. Head and Neck Cancer Tumor Seeding at the Percutaneous Endoscopic Gastrostomy Site. *Nutr. Clin. Pract.* 33, 73–80. <https://doi.org/10.1002/ncp.10021>
- Hafkamp, H.C., Manni, J.J., Haesevoets, A., Voogd, A.C., Schepers, M., Bot, F.J., Hopman, A.H.N., Ramaekers, F.C.S., Speel, E.-J.M., 2008. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int. J. Cancer* 122, 2656–2664. <https://doi.org/10.1002/ijc.23458>
- Hagiwara, Y., Oike, T., Niimi, A., Yamauchi, M., Sato, H., Limsirichaikul, S., Held, K.D., Nakano, T., Shibata, A., 2019. Clustered DNA double-strand break formation and the repair pathway following heavy-ion irradiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 60, 69–79. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry096>
- 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>

- Hauser, U., Balz, V., Carey, T.E., Grénman, R., van Lierop, A., Scheckenbach, K., Bier, H., 2002. Reliable detection of p53 aberrations in squamous cell carcinomas of the head and neck requires transcript analysis of the entire coding region. *Head Neck* 24, 868–873. <https://doi.org/10.1002/hed.10128>
- Hauswald, H., Jensen, A.D., Krauss, J., Haselmann, R., Lossner, K., Hartmann, S., Windemuth-Kieselbach, C., Münter, M.W., Debus, J., 2018. Phase II study of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, 5-fluorouracil followed by radioimmunotherapy with cetuximab and intensity-modulated radiotherapy in combination with a carbon ion boost for locally advanced tumors of the oro-, hypophary. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* 13, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2018.09.005>
- Heilmann, J., Taucher-Scholz, G., Haberer, T., Scholz, M., Kraft, G., 1996. Measurement of intracellular DNA double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34, 599–608. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)02112-4](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)02112-4)
- Heilmann, J., Taucher-Scholz, G., Kraft, G., 1995. Induction of DNA Double-strand Breaks in CHO-K1 Cells by Carbon Ions. *Int. J. Radiat. Biol.* 68, 153–162. <https://doi.org/10.1080/09553009514551051>
- Herrmann, Th., Baumann, M., Dörr, M., 2006. *Klinische Strahlenbiologie*, 4. Auflage. ed. Elsevier GmbH, München.
- Jensen, Nikoghosyan, A.V., Poulakis, M., Höss, A., Haberer, T., Jäkel, O., Münter, M.W., Schulz-Ertner, D., Huber, P.E., Debus, J., 2015. Combined intensity-modulated radiotherapy plus raster-scanned carbon ion boost for advanced adenoid cystic carcinoma of the head and neck results in superior locoregional control and overall survival. *Cancer* 121, 3001–3009. <https://doi.org/10.1002/cncr.29443>
- Jensen, Poulakis, M., Nikoghosyan, A.V., Welzel, T., Uhl, M., Federspil, P.A., Freier, K., Krauss, J., Höss, A., Haberer, T., Jäkel, O., Münter, M.W., Schulz-Ertner, D., Huber, P.E., Debus, J., 2016a. High-LET radiotherapy for adenoid cystic carcinoma of the head and neck: 15 years' experience with raster-scanned carbon ion therapy. *Radiother. Oncol.* 118, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.05.010>
- Jensen, Poulakis, M., Vanoni, V., Uhl, M., Chaudhri, N., Federspil, P.A., Freier, K., Krauss, J., Debus, J., 2016b. Carbon ion therapy (C12) for high-grade malignant salivary gland tumors (MSGTs) of the head and neck: Do non-ACCs profit from dose escalation? *Radiat. Oncol.* 11, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13014-016-0657-z>

- Jezkova, L., Zadneprianetc, M., Kulikova, E., Smirnova, E., Bulanova, T., Depes, D., Falkova, I., Boreyko, A., Krasavin, E., Davidkova, M., Kozubek, S., Valentova, O., Falk, M., 2018. Particles with similar LET values generate DNA breaks of different complexity and reparability: A high-resolution microscopy analysis of γ H2AX/53BP1 foci. *Nanoscale* 10, 1162–1179. <https://doi.org/10.1039/c7nr06829h>
- Kasten-Pisula, U., Saker, J., Eicheler, W., Krause, M., Yaromina, A., Meyer-Staeckling, S., Scherkl, B., Kriegs, M., Brandt, B., Grénman, R., Petersen, C., Baumann, M., Dikomey, E., 2011. Cellular and Tumor Radiosensitivity is Correlated to Epidermal Growth Factor Receptor Protein Expression Level in Tumors Without EGFR Amplification. *Int. J. Radiat. Oncol.* 80, 1181–1188. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.02.043>
- Kasten-Pisula, U., Tastan, H., Dikomey, E., 2005. Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int. J. Radiat. Biol.* 81, 409–419. <https://doi.org/10.1080/09553000500140498>
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., Iliakis, G., 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36, 5678–5694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn550>
- Klussmann, J.P., Gültekin, E., Weissenborn, S.J., Wieland, U., Dries, V., Dienes, H.P., Eckel, H.E., Pfister, H.J., Fuchs, P.G., 2003. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am. J. Pathol.* 162, 747–753. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63871-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63871-0)
- Klussmann, J.P., Weissenborn, S.J., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Jungehülsing, M., Eckel, H.E., Dienes, H.P., Pfister, H.J., Fuchs, P.G., 2001. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 92, 2875–2884. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20011201\)92:11<2875::AID-CNCR10130>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20011201)92:11<2875::AID-CNCR10130>3.0.CO;2-7)
- Ko, H.C., Harari, P.M., Sacotte, R.M., Chen, S., Wieland, A.M., Yu, M., Baschnagel, A.M., Bruce, J.Y., Kimple, R.J., Witek, M.E., 2017. Prognostic implications of human papillomavirus status for patients with non-oropharyngeal head and neck squamous cell carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 143, 2341–2350. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2481-8>
- Kötter, A., Cornils, K., Borgmann, K., Dahm-Daphi, J., Petersen, C., Dikomey, E., Mansour, W.Y., 2014. Inhibition of PARP1-dependent end-joining contributes to Olaparib-mediated radiosensitization in tumor cells. *Mol. Oncol.* 8, 1616–1625. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.06.008>

- Kraft, G., 1998. Kraft G. Radiotherapy with heavy ions: radiobiology, clinical indications and experience at GSI, Darmstadt. *Tumori* 84, 200–204.
- Kraft, G., Krämer, M., Scholz, M., 1992. LET, track structure and models. *Radiat. Environ. Biophys.* 31, 161–180. <https://doi.org/10.1007/BF01214825>
- Kreimer, A.R., Clifford, G.M., Boyle, P., Franceschi, S., 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systemic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 467–475. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>
- Lal, P., Nautiyal, V., Verma, M., Yadav, R., Maria Das, K., Kumar, S., 2018. Objective and subjective assessment of xerostomia in patients of locally advanced head-and-neck cancers treated by intensity-modulated radiotherapy. *J. Cancer Res. Ther.* https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_200_17
- Lassen, P., Lacas, B., Pignon, J.-P., Trotti, A., Zackrisson, B., Zhang, Q., Overgaard, J., Blanchard, P., 2018. Prognostic impact of HPV-associated p16-expression and smoking status on outcomes following radiotherapy for oropharyngeal cancer: The MARCH-HPV project. *Radiother. Oncol.* 126, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.10.018>
- Lazar, A.A., Schulte, R., Faddegon, B., Blakely, E.A., Roach, M., 2018. Clinical trials involving carbon-ion radiation therapy and the path forward. *Cancer* 124, 4467–4476. <https://doi.org/10.1002/cncr.31662>
- Lee, R., Sommer, S., Hartel, C., Nasonova, E., Durante, M., Ritter, S., 2010. Complex exchanges are responsible for the increased effectiveness of C-ions compared to X-rays at the first post-irradiation mitosis. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 701, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.03.004>
- 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>
- Lerch, S., Berthold, S., Ziemann, F., Dreffke, K., Subtil, F.S.B., Senger, Y., Jensen, A., Engenhart-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>
- Lin, C.J., Grandis, J.R., Carey, T.E., Gollin, S.M., Whiteside, T.L., Koch, W.M., Ferris, R.L., Lai, S.Y., 2007. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Established models and rationale for selection. *Head Neck* 29, 163–188. <https://doi.org/10.1002/hed.20478>

- 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. *Radiother. Oncol.* 121, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.11.008>
- 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>
- Liu, Q., Ma, L., Jones, T., Palomero, L., Pujana, M.A., Martinez-Ruiz, H., Ha, P.K., Murnane, J., Cuartas, I., Seoane, J., Baumann, M., Linge, A., Barcellos-Hoff, M.H., 2018. Subjugation of TGF β signaling by human papilloma virus in head and neck squamous cell carcinoma shifts DNA repair from homologous recombination to alternative end joining. *Clin. Cancer Res.* 24, 6001–6014. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1346>
- Löser et al., 2005. Consensus Statement; ESPEN guidelines on Artificial enteral nutrition - percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG). *Clin. Nutr.* 24, 848–861. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2005.06.013>
- Mandic, R., Schamberger, C.J., Müller, J.F., Geyer, M., Zhu, L., Carey, T.E., Grénman, R., Dünne, A.A., Werner, J.A., 2005. Reduced cisplatin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with mutations affecting the COOH-terminal nuclear localization signal of p53. *Clin. Cancer Res.* 11, 6845–6852. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0378>
- 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>

- Mansour, W.Y., Schumacher, S., Roskopf, R., Rhein, T., Schmidt-Petersen, F., Gatzemeier, F., Haag, F., Borgmann, K., Willers, H., Dahm-Daphi, J., 2008. Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 36, 4088–4098. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn347>
- Mayer, C., 2014. Strahlenbiologische Charakterisierung humaner Oropharynx-Karzinom-Zelllinien (PhD Thesis). Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Mehanna, H., Robinson, M., Hartley, A., Kong, A., Foran, Bernadette, Fulton-Lieuw, T., Dalby, M., Mistry, P., Sen, M., O'Toole, L., Al Booz, H., Dyker, K., Moleron, R., Whitaker, S., Brennan, Sinead, Cook, A., Griffin, M., Aynsley, E., Rolles, M., De Winton, E., Chan, A., Srinivasan, D., Nixon, I., Grumett, J., Leemans, C.R., Buter, J., Henderson, J., Harrington, K., McConkey, C., Gray, A., Dunn, J., McArdle, O., Husband, D., Loo, V., Soe, W., Sridhar, T., Jankowska, P., Joseph, M., Geropantas, K., Vaidya, D., Vijayan, R., Hwang, D., Pettit, L., Brennan, Sinéad, Mendes, R., Forster, M., Evans, M., Foran, Bernie, Nankivell, P., Bryant, J., Sharma, N., Spruce, R., Brooks, J., Batis, N., Roques, T., Bidmead, M., Yang, H., Nutting, C., Tyler, J., Baines, H., Gasnier, A., Miles, E., Clark, C., 2019. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet* 393, 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32752-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32752-1)
- Mesri, E.A., Feitelson, M.A., Munger, K., 2014. Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis. *Cell Host Microbe* 15, 266–282. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.011>
- Mizoe, J., Hasegawa, A., Jingu, K., Takagi, R., Bessyo, H., Morikawa, T., Tonoki, M., Tsuji, H., Kamada, T., Tsujii, H., Okamoto, Y., 2012. Results of carbon ion radiotherapy for head and neck cancer. *Radiother. Oncol.* 103, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.12.013>
- Mohanti, B.K., Nachiappan, P., Pandey, R.M., Sharma, A., Bahadur, S., Thakar, A., 2007. Analysis of 2167 head and neck cancer patients' management, treatment compliance and outcomes from a regional cancer centre, Delhi, India. *J. Laryngol. Otol.* 121, 49–56. <https://doi.org/10.1017/S0022215106002751>
- Monnerat, C., Faivre, S., Temam, S., Bourhis, J., Raymond, E., 2002. End points for new agents in induction chemotherapy for locally advanced head and neck cancers. *Ann. Oncol.* 13, 995–1006. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf172>
- Nauta, I.H., Rietbergen, M.M., van Bokhoven, A.A.J.D., Bloemena, E., Lissenberg-Witte, B.I., Heideman, D.A.M., de Jong, R.J.B., Brakenhoff, R.H., Leemans, C.R., 2018.

- Evaluation of the eighth TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing. *Ann. Oncol.* 29, 1273–1279. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy060>
- Newman et al., H., 1997. DNA double-strand break distributions in X-ray and alpha-particle irradiated V79 cells: evidence for non-random breakage. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 347–363. <https://doi.org/10.1080/095530097143978>
- Nguyen-Tan, P.F., Zhang, Q., Ang, K.K., Weber, R.S., Rosenthal, D.I., Soulieres, D., Kim, H., Silverman, C., Raben, A., Galloway, T.J., Fortin, A., Gore, E., Westra, W.H., Chung, C.H., Jordan, R.C., Gillison, M.L., List, M., Le, Q.T., 2014. Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the radiation therapy oncology group 0129 trial: Long-term report of efficacy and toxicity. *J. Clin. Oncol.* 32, 3858–3867. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.3925>
- Niu, H., Raynard, S., Sung, P., 2009. Multiplicity of DNA end resection machineries in chromosome break repair. *Genes Dev.* 23, 1481–1486. <https://doi.org/10.1101/gad.1824209>
- Nutting, C., Rooney, K., Foran, B., Pettit, L., Beasley, M., Finneran, L., Roe, J., Tyler, J., Roques, T., Cook, A., Petkar, I., Bhide, S., Srinivasan, D., Boon, C., De Winton, E., Frogley, R., Mertens, K., Emson, M., Hall, E., 2020. Results of a randomized phase III study of dysphagia-optimized intensity modulated radiotherapy (Do-IMRT) versus standard IMRT (S-IMRT) in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 38, 6508–6508. https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.6508
- Nutting, C.M., Morden, J.P., Harrington, K.J., Urbano, T.G., Bhide, S.A., Clark, C., Miles, E.A., Miah, A.B., Newbold, K., Tanay, M.A., Adab, F., Jefferies, S.J., Scrase, C., Yap, B.K., A'Hern, R.P., Sydenham, M.A., Emson, M., Hall, E., 2011. Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): A phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 12, 127–136. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70290-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70290-4)
- Osu, N., Kobayashi, D., Shirai, K., Musha, A., Sato, H., Hirota, Y., Shibata, A., Oike, T., Ohno, T., 2020. Relative biological effectiveness of carbon ions for head-and-neck squamous cell carcinomas according to human papillomavirus status. *J. Pers. Med.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.3390/jpm10030071>
- Panier, S., Boulton, S.J., 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/nrm3719>

- Popp, H.D., Brendel, S., Hofmann, W.K., Fabarius, A., 2017. Immunofluorescence microscopy of γ H2AX and 53BP1 for analyzing the formation and repair of DNA double-strand breaks. *J. Vis. Exp.* 2017, 1–7. <https://doi.org/10.3791/56617>
- Puck, 1956. ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS. *J. Exp. Med.* 103.
- Rahnemai-Azar, A.A., 2014. Percutaneous endoscopic gastrostomy: Indications, technique, complications and management. *World J. Gastroenterol.* 20, 7739. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7739>
- Ramqvist, T., Dalianis, T., 2010. Oropharyngeal Cancer Epidemic and Human Papillomavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1671–1677. <https://doi.org/10.3201/eid1611.100452>
- Reuschenbach, M., Tinhofer, I., Wittekindt, C., Wagner, S., Klusmann, J.P., 2019. A systematic review of the HPV-attributable fraction of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Germany. *Cancer Med.* 8, 1908–1918. <https://doi.org/10.1002/cam4.2039>
- Revannasiddaiah, S., Pant, N., Pandey, K., 2015. Evaluation of factors in relation with the non-compliance to curative intent radiotherapy among patients of head and neck carcinoma: A study from the Kumaon region of India. *Indian J. Palliat. Care* 21, 21. <https://doi.org/10.4103/0973-1075.150161>
- Rieckmann, T., Tribius, S., Grob, T.J., Meyer, F., Busch, C.J., Petersen, C., Dikomey, E., Kriegs, M., 2013. 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>
- Rothkamm, K., Löbrich, M., 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5057–5062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0830918100>
- Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T., Nakajima, T., 1998. Expression Status of p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. *Am. J. Pathol.* 153, 1741–1748. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65689-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65689-1)
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M., 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129–1136. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90409-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90409-8)
- Seltzsaam, S., Ziemann, F., Dreffke, K., Preising, S., Arenz, A., Schötz, U., Engenhardt-Cabillic, R., Dikomey, E., Wittig, A., 2019. In HPV-Positive HNSCC Cells, Functional Restoration of the p53/p21 Pathway by Proteasome Inhibitor

- Bortezomib Does Not Affect Radio- or Chemosensitivity. *Transl. Oncol.* 12, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.11.013>
- Sieron, H.L., Eberle, F., Gress, T.M., Mahnken, A.H., Wiegand, S., 2020. Safety of Prophylactic Gastrostomy Tube Placement and Gastrostomy Tube Usage in Patients Treated by Radio(chemo)therapy for Head and Neck Cancer. *Anticancer Res.* 40, 1167–1173. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.14059>
- Spreafico, A., Huang, S.H., Xu, W., Granata, R., Liu, C.-S., Waldron, J.N., Chen, E., Ringash, J., Bayley, A., Chan, K.K., Hope, A.J., Razak, A.R.A., Perez-Ordóñez, B., Weinreb, I., Bossi, P., Orlandi, E., Licitra, L.F., O’Sullivan, B., Siu, L.L., Kim, J.-H.J., 2015. Differential impact of cisplatin dose intensity on human papillomavirus (HPV)-related (+) and HPV-unrelated (–) locoregionally advanced head and neck squamous cell carcinoma (LAHNSCC). *J. Clin. Oncol.* 33, 6020–6020. https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.6020
- Stenner, M., Yosef, B., Huebbers, C.U., Preuss, S.F., Dienes, H.-P., Speel, E.-J.M., Odenthal, M., Klusmann, J.P., 2011. Nuclear translocation of β -catenin and decreased expression of epithelial cadherin in human papillomavirus-positive tonsillar cancer: an early event in human papillomavirus-related tumour progression? *Histopathology* 58, 1117–1126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03805.x>
- Stöver, I., Feyer, P., 2010. *Praxismanual Strahlentherapie*, 2. Auflage. ed. Springer Berlin Heidelberg, Heidelberg.
- Stransky, N., Egloff, A.M., Tward, A.D., Kostic, A.D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Kryukov, G.V., Lawrence, M.S., Sougnez, C., McKenna, A., Shefler, E., Ramos, A.H., Stojanov, P., Carter, S.L., Voet, D., Cortes, M.L., Auclair, D., Berger, M.F., Saksena, G., Guiducci, C., Onofrio, R.C., Parkin, M., Romkes, M., Weissfeld, J.L., Seethala, R.R., Wang, L., Rangel-Escareno, C., Fernandez-Lopez, J.C., Hidalgo-Miranda, A., Melendez-Zajgla, J., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S.B., Meyerson, M., Lander, E.S., Getz, G., Golub, T.R., Garraway, L.A., Grandis, J.R., 2011. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science* 333, 1157–1160. <https://doi.org/10.1126/science.1208130>
- 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>
- Subtil, F.S.B., Wilhelm, J., Bill, V., Westholt, N., Rudolph, S., Fischer, J., Scheel, S., Seay, U., Fournier, C., Taucher-Scholz, G., Scholz, M., Seeger, W., Engenhart-Cabillic, R., Rose, F., Dahm-Daphi, J., Hänze, J., 2014. Carbon ion radiotherapy

- of human lung cancer attenuates HIF-1 signaling and acts with considerably enhanced therapeutic efficiency. *FASEB J.* 28, 1412–1421. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242230>
- Syrjänen, K., Syrjänen, S., Pyrhönen, S., 1982. Human Papilloma Virus (HPV) Antigens in Lesions of Laryngeal Squamous Cell Carcinomas. *ORL* 44, 323–334. <https://doi.org/10.1159/000275612>
- Takahashi, A., Kubo, M., Ma, H., Nakagawa, A., Yoshida, Y., Isono, M., Kanai, T., Ohno, T., Furusawa, Y., Funayama, T., Kobayashi, Y., Nakano, T., 2014. Nonhomologous End-Joining Repair Plays a More Important Role than Homologous Recombination Repair in Defining Radiosensitivity after Exposure to High-LET Radiation. *Radiat. Res.* 182, 338–344. <https://doi.org/10.1667/rr13782.1>
- Taucher-Scholz, G., Heilmann, J., Schneider, M., Kraft, G., 1995. Detection of heavy-ion-induced DNA double-strand breaks using static-field gel electrophoresis. *Radiat. Environ. Biophys.* 34, 101–106. <https://doi.org/10.1007/BF01275214>
- Thomas, M., Pim, D., Banks, L., 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18, 7690–7700. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202953>
- Tinganelli, W., Durante, M., Hirayama, R., Krämer, M., Maier, A., Kraft-Weyrather, W., Furusawa, Y., Friedrich, T., Scifoni, E., 2015. Kill-painting of hypoxic tumours in charged particle therapy. *Sci. Rep.* 5, 17016. <https://doi.org/10.1038/srep17016>
- 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>
- Vermorken, J.B., Specenier, P., 2010. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann. Oncol.* 21, vii252–vii261. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq453>
- 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>
- Wannemacher, Debus, Wenz, 2006. *Strahlentherapie*. Springer Berlin Heidelberg.

- Warnakulasuriya, S., 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 45, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>
- Weber, U., Kraft, G., 2009. Comparison of carbon ions versus protons. *Cancer J.* 15, 325–332. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181b01935>
- Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., Bosch, F.X., 2002. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 21, 1510–1517. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205214>
- 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.* 11, Doc09. <https://doi.org/10.3205/cto000091>
- Wittekindt, C., Wagner, S., Sharma, S.J., Würdemann, N., Knuth, J., Reder, H., Klußmann, J.P., 2018. HPV - A different view on Head and Neck Cancer. *Laryngorhinootologie.* 97, S48–S113. <https://doi.org/10.1055/s-0043-121596>
- Würdemann, N., Wagner, S., Sharma, S.J., Prigge, E.S., Reuschenbach, M., Gattenlöhner, S., Klussmann, J.P., Wittekindt, C., 2017. Prognostic impact of AJCC/UICC 8th edition new staging rules in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Front. Oncol.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00129>
- Wurster, S., Hennes, F., Parplys, A.C., Seelbach, J.I., Mansour, W.Y., Zielinski, A., Petersen, C., Clauditz, T.S., Münscher, A., Friedl, A.A., Borgmann, K., 2016. PARP1 inhibition radiosensitizes HNSCC cells deficient in homologous recombination by disabling the DNA replication fork elongation response. *Oncotarget* 7, 9732–9741. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6947>
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 274. <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2016-014>
- Ziemann, F., Arenz, A., Preising, S., Wittekindt, C., Klussmann, J.P., Engenhardt-Cabillic, R., Wittig, A., 2015. Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation ± Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis. *Am. J. Cancer Res.* 5, 1017–31.
- Ziemann, F., Seltz, S., Dreffke, K., Preising, S., Arenz, A., Subtil, F.S.B., Rieckmann, T., Engenhardt-Cabillic, R., Dikomey, E., Wittig, A., 2017. Roscovitine strongly enhances the effect of olaparib on radiosensitivity for HPV neg. but not for HPV pos. HNSCC cell lines. *Oncotarget* 8, 105170–105183. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22005>

8. Anhang

8.1. Liste der verwendeten Materialien

Tabelle 4: verwendete Geräte und Großgeräte

| Gerät | Firmenname | Firma, Sitz |
|--|---|---|
| Bestrahlungsgerät | X-RAD 320iX (Dosisleistung 1,0 Gy/min) | Precision X-Ray, Inc. North Branford/CT, USA |
| Feinwaage | MXX-412 | Denver Instrument GmbH, Göttingen |
| Inkubatoren | HERACELL 240i | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Mikroskope | - Motorised research inverted system microscope IX81 - CKX41 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| | - Weitfeldmikroskop DM5500 - DMIL LED | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| ¹² C-Ionen- Bestrahlungsanlage | | Marburger Ionenstrahltherapiezentrum, Marburg |
| Pipettierhilfe | Integra PIPETBOY | Integra, Biebertal |
| | pipetus® | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Schüttler | Duomax 1030 | Heidolph Instruments & Co. KG, Schwabach |
| Sterilbank | HERASAFE KS | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Vakuumpumpe | CVC2000 II | vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim |
| Vortexer | VortexGenie2™ | Scientific Industries Bohemia, NY, USA |
| Zentrifugen | Universal 320R | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen |

| | |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| Heraeus MEGAFUGE 16R Centrifuge | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Biozym® sprout | Biozym Scientific, Hess. Oldendorf |

Tabelle 5: verwendete Verbrauchsmaterialien

| Plastik-/Glasware | Größe | Firma, Sitz |
|--|------------------------------------|--|
| 6-Well-Platten | | BD Biosciences, Heidelberg |
| 12-Well-Platten | | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Deckgläschen | 15mm Durchmesser | VWR International GmbH, Radnor, PA, USA |
| Kanülen | 0,8 x 40 mm | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Pipettenspitzen | 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1mL | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße | 15 mL, 50 mL | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| serologische Pipetten CELLSTAR® | 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen |
| serologische Pipetten | 2mL | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Menzel-Gläser Super Frost® Objektträger | 25 x 75 x 1 mm | Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland |

8.2. Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: verwendete Chemikalien und Reagenzien

| Lösung, Reagenz | Firma, Sitz |
|--|---|
| Formaldehydlösung 37% | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Fötales Rinderserum Cat No: FBS-11A | Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund |
| Kristallviolett (C3886) | SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH, Steinheim |
| L-Glutamin | Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund |
| nicht-essenzielle Aminosäuren (REF11140-035) | Thermo-Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Penicillin-Streptomycin (P0781) | SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH, Steinheim |
| phosphat-gepufferte Salzlösung | SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH, Steinheim |
| ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI | Life Technologies Corporation, Eugene, Oregon, USA |
| Rinder-Serumalbumin | Capricorn Scientific GmbH |
| Roswell-Park-Memorial Institute 1640 Medium (R0883) | SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH, Steinheim |
| Triton X-100 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Trypsin-EDTA | SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH, Steinheim |
| Tween® 20 | SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH, Steinheim |

8.3. Liste der verwendeten Antikörper

Tabelle 7: verwendete Antikörper

| Antikörper | Firma, Sitz |
|--|--|
| 53BP1 Antibody NB 100-305 (rabbit, polyclonal) | Novus Biologicals, Centennial, CO, USA |
| phospho-histone 2AX, clone JBW301 (mouse, monoclonal) | Millipore Corporation, Temecula, CA, USA |
| 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 |

8.4. Liste der verwendeten Software

Tabelle 8: verwendete Software

| Softwarenutzung | Firmenname der Software | Firma, Sitz |
|--|--------------------------------|--|
| Datenauswertung und - dokumentation | Microsoft Office 2020 | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| Datenauswertung und - darstellung | GraphPad Prism 8.0 | GraphPad Software, La Jolla, CA, USA |
| Datenerhebung | Olympus Xcellence | Olympus, Hamburg |
| Datenerhebung | ImageJ | open source |
| Datenverarbeitung | LAS-AF | Leica, Wetzlar |
| Literaturverwaltung | Zotero | open source |

8.5. Zusätzliche Abbildungen und Tabellen

Tabelle 9: Plattierungseffizienzen der Koloniebildungstests

| Zelllinie | Mittelwerte der Plattierungseffizienzen der Koloniebildungstests | |
|-----------------|--|-----------------------|
| | Photonen | ¹² C-Ionen |
| HPV-pos. | | |
| UM-SCC-47 | 0,12 | 0,15 |
| UD-SCC-2 | 0,34 | 0,41 |
| 93VU-147T | 0,06 | 0,12 |
| UM-SCC-104 | 0,11 | 0,08 |
| UPCI:SCC154 | 0,14 | 0,14 |
| HPV-neg. | | |
| UM-SCC-11b | 0,21 | 0,15 |
| UM-SCC-3 | 0,11 | 0,12 |
| UM-SCC-6 | 0,12 | 0,14 |
| UT-SCC-33 | 0,40 | 0,30 |
| FaDu | 0,19 | 0,35 |

8.6. Curriculum vitae

Dieser Teil der Arbeit enthält persönliche Daten und wurde deshalb aus der online veröffentlichten Fassung entfernt.

8.7. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer waren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Adamkiewicz, Basler, Baranowski, Bauer, Bette, Bertoune, Braun, Brehm, Bogdan, Bonaterra, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Eickmann, Feuser, Geraedts, Grundmann, Halaszovich, Hildebrandt, Hobiger, Koolman, Lill, Löffler, Mey, Milani, Mueller, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Reese, Rost, Röhm, Rust, Schäfer, Schütz, Schwarz, Seitz, Stahl, Steiniger, Schratt, Suske, Thieme, von Zezschwitz, Weihe, Wertenbruch, Westermann, Wilhelm, Wrocklage

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Alexander Arenz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Bäumlein, Becker, Becker, Bein, Bender, Best, Bien, Birk, Bliemel, Bohlander, Burchert, Carl, Czubayko, Damanakis, Dettmeyer, Denkert, Denzer, Dietz, Divchev, Donner-Banzhoff, Duda, Eberle, Ehlenz, Engenhardt-Cabillic, Eming, Fendrich, Frink, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Fuest, Gebhardt, Geisthoff, Geks, Geraedts, Geßner, Ghazy, Görg, Gress, Greulich, Grgic, Grikscheit, Grimm, Grosse, Grzeschik, Haas, Hertl, Hellinger, Hoch, Höffken, Hoffmann, Holland, Holzer, Hoyer, Huber, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kamp-Becker, Kampmann, Kann, Keber, Kemmling, Kill, Kircher, Kirschbaum, Klemmer, Klose, Knake, Knipper, Koczulla, Köhler, Kömhoff, König, Kühnert, Leonhardt, Lohoff, Luster, Lüsebrink, Mack, Mahnken, Maier, Maisner, Mandic, Mann, Maurer, Menzler, Merte, Moll, Morin, Mossdorf, Möller, Müller, Mutters, Neff, Nenadic, Neubauer, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Parahuleva, Pedrosa, Peterlein, Pfarr, Pfützner, Portig, Pöttgen, Plant, Rastan, Renke, Renz, Reimann, Richter, Riera-Knorrenschild, Rinke, Rothmund, Ruchholtz, Rüscher, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schneider, Schötz, Schu, Schuhmacher, Schulze, Schütt, Schymalla, Seifert, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sieveking, Simon, Sohlbach, Sommer, Stuck, Strik, Tackenberg, Thiemer, Thum, Timmermann, Timmesfeld, Vahdad, Vogelmeier, Vogt, Vojnar, Vorwerk, Wagner, Weber, Werner, Wiese, Wiesmann, Wissniowski, Wittig, Worzfeld, Wulf, Wündisch, Zavorotny, Zemlin, Ziller, Zimmer, Ziller, Ziring, Zwiorek

8.8. Danksagung

An allererster Stelle möchte ich Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic für die Möglichkeit danken, in Ihrer Klinik promovieren zu dürfen. Sie hat mir die Möglichkeit gegeben, auch über die Promotion hinaus, sehr viel über Strahlentherapie zu lernen und meinen beruflichen Weg damit in wesentlichem Maße geprägt.

Mein großer Dank gilt PD Dr. Ulrike Theiß für die Möglichkeit, das Thema unter ihrer Anleitung im Labor der Klinik für Strahlentherapie zu bearbeiten. Dabei danke ich ihr sowohl für den Freiraum, in dem ich wissenschaftlich arbeiten durfte, als auch für die hervorragende Betreuung und die Selbstverständlichkeit, mit der sie mir stets ihre Hilfe anbot. Ebenfalls danke ich PD Dr. Fabian Eberle, ohne dessen Engagement die Umsetzung dieser Arbeit ebenfalls nicht gelungen wäre.

Des Weiteren danke ich PD Dr. Florentine Subtil, Dr. Andrea Arenz, Dr. Kristin Dreffke und Dr. Ricarda Hannen für die wissenschaftliche Betreuung.

Einen besonderen Dank möchte ich Prof. Dr. Ekkehard Dikomey aussprechen, der mich in seiner Rolle als Gastprofessor in der Klinik für Strahlentherapie in Marburg während meiner Tätigkeit im Labor und bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr unterstützt hat und dessen methodische und wissenschaftliche Beiträge maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei meinen Weggefährten aus dem Labor für Strahlentherapie, mit denen ich viele Stunden an Tag und Nacht im Labor gearbeitet habe. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Dinesh Tiwari und Dr. Maximilian Al-Bazaz für ihr stets offenes Ohr und den wissenschaftlichen Austausch bedanken. Ebenso gilt mein Dank allen weiteren Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie des UKGM und des Marburg Ionenstrahl-Therapiezentrum. An dieser Stelle seien vor allem Prof. Dr. Klemens Zink und seine Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter genannt, denen ich für die Dosimetrie und die physikalische Betreuung am MIT danken möchte.

Schließlich gilt ein sehr großer Dank Stefanie Preising und Leoni Piepke aus dem Labor für Strahlentherapie, ohne deren Hilfe und Anleitung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich hoffe ihr seht auf die Zeit ebenso glücklich zurück wie ich.

Mein größter Dank gebührt jedoch meiner Familie und meiner Freundin Anne Gravemeyer, ohne deren Hilfe und Unterstützung ich nie bis zu diesem Punkt gekommen wäre. Ihr seid mein Ein und Alles.

8.9. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Wirkung von Kohlenstoffionenbestrahlung auf die Überlebensrate und Doppelstrangbruchreparatur von HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zellen“ in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter Leitung von Prof. Dr. med. Engenhardt-Cabillic mit Unterstützung durch PD Dr. rer. nat. Ulrike Theiß und PD Dr. med. Fabian Eberle 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.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der Publikation „HPV-positive HNSCC cell lines show strongly enhanced radiosensitivity after photon but not after carbon ion irradiation“ in der Zeitschrift *Radiotherapy and Oncology* (Lerch et al., 2020) veröffentlicht.