

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Prof. Dr. med. Cordula Petersen

**Einfluss des Transkriptionsfaktors Oct4 A auf die Homologe  
Rekombination nach Bestrahlung in Tumorstammzellen  
des HNSCCs**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maya-Isabel Stolte  
aus Potsdam

Hamburg 2022

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.01.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Markus Glatzel**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Borgmann**

## Vorbemerkung

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten ist folgende Publikation entstanden, die von mir zusammen mit meiner Doktormutter Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Borgmann, Prof. Dr. rer. nat. Anna Dubrovskaja der medizinischen Fakultät Dresden und weiteren Co-Autorinnen und Autoren realisiert wurde:

*Jacqueline Nathansen, Vasyl Lukiyanchuk, Linda Hein, **Maya Isabel Stolte**, Kerstin Borgmann, Steffen Löck, Ina Kurth, Michael Baumann, Mechthild Krause, Annett Linge, and Anna Dubrovskaja. 2021. "Oct4 Confers Stemness and Radioresistance to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Regulating the Homologous Recombination Factors PSMC3IP and RAD54L." *Oncogene* 40(24):4214–28.*

In der vorliegenden Dissertation wurden neben den in der Publikation von mir durchgeführten Analysen zusätzliche Experimente durchgeführt, die zu entsprechend neuen und ergänzenden Erkenntnissen führten. Sämtliche Abbildungen und Inhalte, die Bezug zu den Ergebnissen der Publikation nehmen, sind entsprechend gekennzeichnet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Kopf-Hals-Karzinome .....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.1.3	Tumorentstehung und Molekularpathologie .....	3
1.1.4	Prognose .....	3
1.1.5	Therapiekonzepte.....	4
1.2	Tumorstammzellen (TSZ).....	5
1.2.1	Entstehungsmodelle von TSZ .....	5
1.2.2	Eigenschaften von TSZ .....	7
1.2.3	Bedeutung für Strahlenresistenz im HNSCC .....	8
1.2.4	Biomarker für TSZ im HNSCC .....	9
1.3	Transkriptionsfaktor Oct4 .....	10
1.3.1	Isoformen, Struktur und Eigenschaften von Oct4.....	10
1.3.2	Vorkommen und Bedeutung im HNSCC .....	11
1.4	DNA-Schäden und DNA-Reparatur .....	13
1.4.1	DNA-Replikationsstress .....	13
1.4.2	DNA-Schadensantwort.....	14
1.4.3	DNA-Reparatur.....	15
1.4.3.1	Homologe Rekombination (HR) .....	16
1.4.3.2	Bedeutung der HR für die Therapieresistenz in TSZ .....	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1	Material.....	20
2.1.1	Zelllinien .....	20
2.1.2	Medium und Reagenzien für Zellkulturhaltung.....	21
2.1.3	Puffer, Lösungen und Chemikalien .....	21
2.1.4	Antikörper .....	23
2.1.5	Größenstandards für Proteine .....	24
2.1.6	Geräte .....	25
2.1.7	Verbrauchsmaterialien .....	26

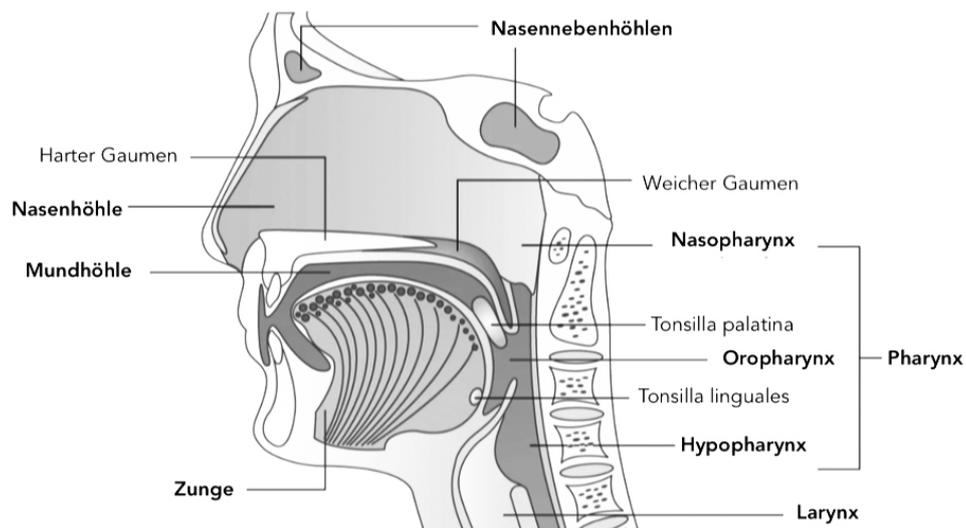
2.1.8	Auswertungsprogramme .....	26
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Zellkulturhaltung .....	26
2.2.2	Zellzahlbestimmung .....	27
2.2.3	Bestimmung der Proliferationsrate .....	28
2.2.4	Analyse der Proteinexpression von HR-Proteinen .....	28
2.2.5	Erzeugung von DNA-Schäden .....	32
2.2.6	Analyse des zellulären Überlebens im Koloniebildungstest.....	33
2.2.7	Nachweis von $\gamma$ -H2AX- und RPA Foci mit Immunfluoreszenz .....	35
2.2.8	Statistik und Auswertung.....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1	Bedeutung von Oct4 A für zelluläre Eigenschaften der UTSCC5-Klone .....	37
3.1.1	Einfluss von Oct4 A auf die Proliferation .....	37
3.1.2	Einfluss von Oct4 A auf die Klonogenität .....	38
3.1.3	Einfluss von Oct4 A auf die Entstehung endogener DNA-Schäden.....	39
3.1.4	Einfluss von Oct4 A auf die Radiosensitivität .....	40
3.1.5	Zusammenfassung 1 .....	41
3.2	Einfluss von Oct4 A auf die HR in UTSCC5-Klonen.....	42
3.2.1	Zelluläres Überleben nach PARP1-Inhibition .....	42
3.2.2	Einfluss PARP1-Inhibition auf die Radiosensitivität .....	45
3.2.3	Einfluss CHK1-Inhibition auf die Radiosensitivität.....	49
3.2.4	Expression von HR-relevanten Genen und Proteinen .....	51
3.2.5	Auswirkungen des Oct4 A Knockouts auf die Bildung von $\gamma$ H2AX- und RPA Foci-Bildung nach exogener DNA-Schädigung.....	58
3.2.6	Zusammenfassung 2.....	61
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
4.1	Einfluss von Oct4 A auf Zellproliferation und endogene DNA-Schäden.....	63
4.2	Bedeutung der Oct4 A-Expression für die zelluläre Radiosensitivität .....	65
4.3	Synthetischer Letalitätseffekt durch PARP1-Inhibition bei Oct4 A-Knockout .....	66
4.4	Hinweis auf Radiosensibilisierung durch CHK1-Inhibition bei Oct4 A-Expression .....	69

4.5	Aktivierung HR-vermittelter DNA-Reparaturmechanismen durch Oct4 A ...	70
4.6	Zusammenfassung und klinischer Bezug.....	77
4.7	Ausblick .....	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
5.1	Summary .....	82
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>102</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>103</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>104</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Kopf-Hals-Karzinome

Kopf-Hals-Karzinome umfassen eine heterogene Gruppe von Neoplasien der Mundhöhle (Mundhöhlenkarzinome), des Rachens (Pharynxkarzinome), des Kehlkopfes (Larynxkarzinom) sowie der Nase und Nasennebenhöhlen (NNH) und sind die sechsthäufigste Tumorentität weltweit (siehe Abb. 1.1) (Johnson et al., 2020; Ventelä et al., 2015). Da über 90% der Kopf-Hals-Tumore aus der obersten Zellschicht hervorgehen, ist der zusammenfassende Begriff der Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) entstanden und wird im Folgenden als dominierende Bezeichnung verwendet. Die seltenere Entität der aus Drüsengewebe entstehenden Adenokarzinome tritt vor allem in den oberen NNH auf (Elgart & Faden, 2020).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hals-Kopf-Region.** [Modifiziert nach Sabatini et al., 2019 (Sabatini & Chiocca, 2019)] Übersicht anatomischer Strukturen der Region des HNSCCs.

### 1.1.1 Epidemiologie

Mit weltweit 890.000 Neuerkrankungen und rund 450.000 Todesfällen im Jahr 2018 repräsentieren die HNSCC-Tumore ca. 6% aller Malignome und bilden damit eine Gruppe der häufigsten Krebserkrankungen (Bray et al., 2018; Hardisson, 2003). Seit einigen Jahren zeigt sich eine zunehmende Inzidenz des HNSCC, die voraussichtlich

bis zum Jahr 2030 um bis zu 30% ansteigen wird und mit einer Verbreitung des Humanen Papillomavirus (HPV) begründet wird (Bray et al., 2018; Johnson et al., 2020). Die höchste Prävalenz der Erkrankung wird in den Regionen Südostasien, Australien, USA und Westeuropa beobachtet und ist vor allem abhängig von der geographisch und kulturell bedingten Präsenz kanzerogener Faktoren, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird (Johnson et al., 2020). Weiterhin ist bekannt, dass Männer ein bis zu 4-fach höheres Risiko als Frauen haben, an einem HNSCC zu erkranken (Johnson et al., 2020). Das mittlere Erkrankungsalter des HNSCC liegt für nicht-Virus-assoziierte Erkrankungen bei 66 Jahren und bei Virus-assoziierten Karzinomen zwischen 50 und 53 Jahren (Windon et al., 2018). Die hohe Prävalenz und weiterhin zunehmende Inzidenz der Kopf-Hals-Tumore machen deutlich, dass eine Verbesserung des molekularen Verständnisses und die Integration individualisierter Vorhersagemodelle und Behandlungen von großer Bedeutung ist.

### **1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren**

Die Tumorentstehung ist auf ein multifaktorielles Geschehen zurückzuführen, wobei mehrere kanzerogene Risikofaktoren definiert werden können. Die bedeutendsten tumorfördernden Faktoren variieren in ihrem Auftreten abhängig von Region, Kultur und Gewohnheiten und sind vor allem mit Tabak- und Alkoholkonsum, Infektion mit onkogenen Stämmen des HPV und dem Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie der Exposition gegenüber Umweltschadstoffen assoziiert (Economopoulou et al., 2019; Johnson et al., 2020). Weitere Risikofaktoren sind mangelnde Mundhygiene und schlechter Zahnstatus, Antioxidantien-arme Ernährung sowie hohes Lebensalter (Johnson et al., 2020). Die Lokalisation der HNSCC-Tumore ist oft abhängig von den ätiologischen Faktoren. Hierbei sind Pharynx- und Mundhöhlenkarzinome hauptsächlich mit Tabak- und Alkoholabusus assoziiert und bilden die große Gruppe der sogenannten HPV-negativen HNSCCs (Johnson et al., 2020). Das Auftreten von oropharyngealen Tumoren wird zunehmend mit einer HPV-Infektion in Verbindung gebracht (v.a. Typ 16) und in Nasopharynxkarzinomen wird häufig aktives EBV-Genom nachgewiesen (Johnson et al., 2020; Lajer & Buchwald, 2010). Ein genetischer Risikofaktor, der ebenfalls zur Krankheitsentstehung beiträgt, ist das Vorliegen der seltenen, mutationsbedingten Fanconi-Anämie (FA), bei der eine gestörte DNA-Reparatur und damit eine erhöhte Anfälligkeit für Tumorentstehung vor allem im Mundhöhlenraum besteht (Carruthers et al., 2018; Johnson et al., 2020).

### 1.1.3 Tumorentstehung und Molekularpathologie

HPV-negative und HPV-positive HNSCCs bilden die zwei Hauptgruppen der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches und zeigen große Unterschiede hinsichtlich molekularer, pathologischer sowie klinischer und prognostischer Eigenschaften (Leemans et al., 2018).

HPV-negative Tumore entstehen durch die metabolische Aktivierung von Tabak und Alkohol abgeleiteter Karzinogene, die kovalente DNA-Addukte bilden und zelluläre Replikationsprozesse stören (Bichara et al., 2011; Johnson et al., 2020). Wenn hierbei aufgetretene DNA-Schäden nicht zuverlässig repariert werden, entstehen DNA-Mutationen, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. TP53, CDK-Inhibitor 2A) und verschiedenen Signalwegen sowie der Aktivierung von Onkogenen (z.B. EGF-Rezeptor-Protein und PIK3CA) führen können (Alsaifi et al., 2019; Johnson et al., 2020; Leemans et al., 2018). Die molekularen Veränderungen verursachen eine konsekutive Deregulierung der Zellproliferation mit folgendem Tumorwachstum.

In HPV-positiven Tumoren bewirkt die Integration des Virusgenoms und die Transkription viraler Onkoproteine unter anderem die Inaktivierung vom Tumorsuppressor-Protein p53 und Retinoblastom-Protein (pRB), was zur zellulären Transformation und Tumorwachstum führt (Alsaifi et al., 2019; Johnson et al., 2020). Unabhängig von anatomischer und ätiologischer Herkunft wurden als Ursprungszellen des Tumorwachstums des HNSCCs Tumorstammzellen (TSZ) identifiziert, die aus adulten Stamm- oder Vorläuferzellen nach onkogener Transformation entstanden sind und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Pluripotenz besitzen (Johnson et al., 2020; Major et al., 2013). Auf die Tumorstammzellhypothese wird im Kapitel 1.2 der Einleitung näher eingegangen.

### 1.1.4 Prognose

Da die Mehrzahl der HNSCC-Tumore in einem lokoregional-fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert wird, haben Kopf-Hals-Tumore eine schlechte Prognose. Die geringe 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von ca. 50% ist vor allem auf Lokalrezidive, Fernmetastasen und Therapieresistenzen zurückzuführen (Economopoulou et al., 2019; Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021; C. Zhou & Parsons, 2020). Trotz einiger Fortschritte in diagnostischen Verfahren und in der Entwicklung adjuvanter Therapiekonzepte konnte die Gesamtprognose des HNSCCs

in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert werden (Ventelä et al., 2015). Weiterhin ist bekannt, dass HPV-negative HNSCC-Tumore eine schlechtere Prognose verzeichnen als Tumore, die mit einer HPV-Infektion assoziiert sind, was mit einem schlechteren Ansprechen HPV-negativer Tumore auf Chemo- und Strahlentherapie erklärt wird (Carpén et al., 2020; Leemans et al., 2018; C. Zhou & Parsons, 2020).

### 1.1.5 Therapiekonzepte

Eine erfolgreiche Behandlung von HNSCC-Tumoren stellt im Hinblick auf steigende Inzidenzen und niedrige Überlebensraten eine komplexe und wichtige Herausforderung dar. Therapeutische Konzepte sollten ein kuratives Ziel haben und Funktionseinschränkungen weitgehend vermeiden (Johnson et al., 2020). Die anatomische Lokalisation, das Tumorstadium und weitere individuelle Merkmale berücksichtigend, sind die wichtigsten HNSCC-Therapiesäulen die operative Tumorresektion, Bestrahlungstherapie und systemische Therapieverfahren (Alsahafi et al., 2019; Johnson et al., 2020; Major et al., 2013).

Abhängig von der anatomischen Lage und damit einhergehender Operabilität des Tumors wird bei niedrigem, begrenztem Tumorstadium entweder eine primär strahlentherapeutische Behandlung oder eine primäre Tumorresektion mit ggf. einer operativen Entfernung der Halslymphknoten (*Neck Dissection*) angestrebt (Johnson et al., 2020). Im fortgeschrittenen Tumorstadium wird, ggf. zusätzlich zur operativen Resektion, eine adjuvante, platinbasierte Radiochemotherapie eingesetzt. Wenn keine Operabilität gegeben ist, wird eine primäre Radiochemotherapie mit Cisplatin angewandt (Johnson et al., 2020). Zusätzlich kann in Kombination mit Strahlen- und Chemotherapie der monoklonale Antikörper Cetuximab zum Einsatz kommen. Die Wirksamkeit weiterer zielgerichteter Therapien, wie der PD-L1-Inhibitor, wird zurzeit in klinischen Studien untersucht (Kitamura et al., 2021).

Die Radiotherapie spielt eine besondere Rolle bei der Behandlung von HNSCC-Tumoren und wird sowohl in Monotherapien als auch in kombinierten Therapiekonzepten angewandt. Trotz vieler Therapieerfolge spielen Resistenzen gegen die Bestrahlungstherapie eine große Rolle bei der Entstehung von Krankheitsrezidiven, die bei mehr als 50% der Patientinnen und Patienten auftreten (Driehuis et al., 2019; Johnson et al., 2020). Vor allem bei HPV-negativen HNSCC-Tumoren kann ein geringeres Ansprechen auf Strahlentherapie mit niedrigeren Überlebensraten beobachtet werden (C. Zhou & Parsons, 2020).

Da TSZ einen großen Anteil an der Entwicklung von Resistenzen gegenüber zytotoxischen Standardtherapien haben, gelten diese als potenzieller Angriffspunkt zur Verbesserung der Behandlungswirksamkeit und Vorbeugung von Krankheitsrezidiven (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021; Schulz et al., 2019; Wong et al., 2011). Im folgenden Abschnitt wird daher unter anderem die TSZ-Hypothese erläutert und mit Resistenzmechanismen im HNSCC in Verbindung gebracht.

### **1.2 Tumorstammzellen (TSZ)**

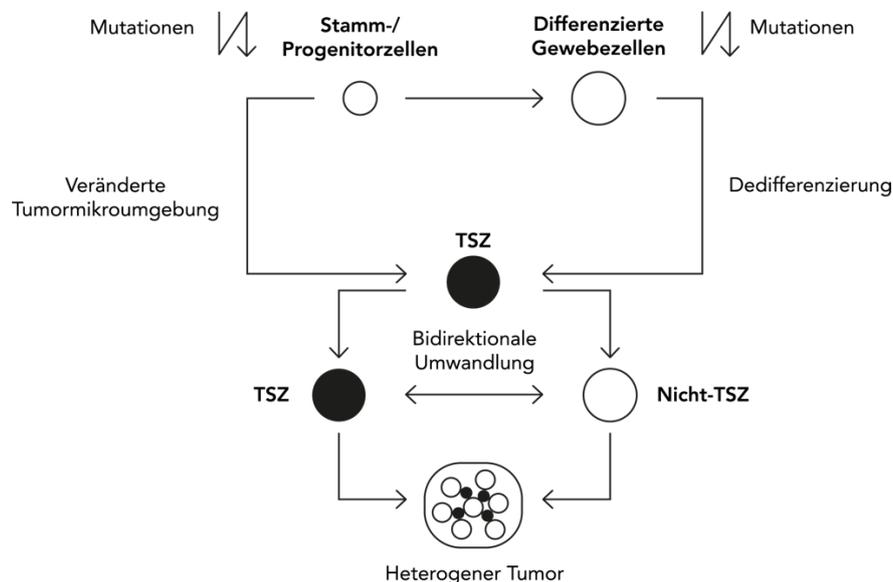
TSZ bilden eine Subpopulation von Tumorzellen, die die Fähigkeit zur unbegrenzten Selbsterneuerung und Differenzierung besitzen und damit die Tumorgenese initiieren und anhaltendes Tumorwachstum unterstützen können (Major et al., 2013; Nathansen, Meyer, et al., 2021; Wong et al., 2011). Zudem weisen TSZ signifikante Resistenzen gegenüber zytotoxischen Behandlungsmodalitäten wie Radio- und Chemotherapie auf und werden mit aggressiven und heterogenen Tumorformen assoziiert (Baumann et al., 2008; Major et al., 2013; Schulz et al., 2019; Walcher et al., 2020). Daher ist es wichtig, die Tumor-initiiierenden Zellen zu charakterisieren und Mechanismen der Therapieresistenzen aufzudecken.

#### **1.2.1 Entstehungsmodelle von TSZ**

Bereits im 19. Jahrhundert entdeckte Rudolf Virchows Schüler und Pathologe Julius Cohnheim die Tumor-initiiierende Zellpopulation und beschrieb erstmals den embryonalen Charakter der TSZ. Er stellte das Konzept vor, dass Tumorgewebe aus verbleibenden Embryonalzellen hervorgeht (Walcher et al., 2020). Über ein Jahrhundert später konnten John Dick et al. TSZ in hämatopoetischen Malignomen erstmals experimentell definieren (Lapidot et al., 1994). Bis heute wurden TSZ auch in zahlreichen soliden Tumorarten isoliert, darunter im Mamma-, Prostata-, Kolon-, Lungen- und Pankreaskarzinom sowie in Hirntumoren, im Melanom und im HNSCC (Johnson et al., 2020; Major et al., 2013; Wong et al., 2011).

Aktuell gibt es im Kontext der TSZ-Hypothese zwei verschiedene Theorien, die den Ursprung von TSZ und deren Eigenschaften erklären. Demnach entsteht ein Tumor entweder durch transformierte differenzierte Gewebezellen oder transformierte geweberesidente Stamm- oder Progenitorzellen (siehe Abb. 1.2) (Walcher et al., 2020; Wong et al., 2011). Beiden Hypothesen liegt die Annahme zugrunde, dass es im

Rahmen physiologischer Geweberegeneration oder durch endo- und exogene Einflüsse zu einer Akkumulation von Mutationen kommt. Diese Mutationen führen zu Transformationsprozessen in geweberesidenten Stammzellen oder bereits differenzierten Zellen mit einer Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die transformierten Zellen haben bzw. erwerben stammzellähnliche Eigenschaften und sind in der Lage, sowohl zusätzliche TSZ als auch verschieden differenzierte Tumorzellen hervorzubringen (Walcher et al., 2020; Wong et al., 2011). Die unidirektionale TSZ-Hypothese besagt, dass TSZ nur eine kleine Subpopulation der Zellen im Tumorgewebe bilden, welche jedoch ausreichend ist, um Tumoringenieurung und -progression zu generieren (Major et al., 2013).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des TSZ-Plastizitätsmodells.** Das Plastische TSZ-Modell verbindet die beiden herkömmlichen Hypothesen des klonalen Evolutionsmodells und der TSZ-Hypothese. Demnach können TSZ als dynamische Subpopulation von Krebszellen betrachtet werden (Afify & Seno, 2019; Marjanovic et al., 2013).

Das klonale Evolutionsmodell ist neben der Hypothese einer unidirektionalen Stammzellhierarchie eine weitere Erklärung für intratumorale Heterogenität und Tumorwachstum. Sie umfasst genetische und epigenetische Veränderungen, die im Zeitverlauf auftreten, zu Mutationen führen und beliebige Zellen, nicht nur eine bestimmte Subpopulation entsprechend der TSZ-Hypothese, zur Tumoringenieurung befähigen (Marjanovic et al., 2013). Ein weiteres, aktuell am ehesten akzeptiertes Modell postuliert eine reversible, zelluläre Plastizität von TSZ und Nicht-TSZ, indem

sich Tumorzellen in verschiedene zelluläre Zustände, bidirektional umwandeln können. Wie in Abb. 1.2 dargestellt verbindet das Plastizitätsmodell die Tumorentstehungsmodelle der Stammzellhypothese sowie der klonalen Evolutionstheorie und betont den dynamischen Prozess der Tumorprogression (Rich, 2016; Walcher et al., 2020).

Der Anteil von TSZ in Malignomen ist gewebeabhängig, dynamisch und variiert stark sowohl zwischen den verschiedenen Tumorarten als auch innerhalb einer Tumorentität. Es konnten kleine TSZ-Subpopulationen von  $< 1\%$  beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) und der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) sowie große Populationen von bis zu 82% Tumoranteil bei soliden Tumoren identifiziert werden (Rich, 2016). Prince et al. (2006) konnten im HNSCC einen bedeutsamen TSZ-Anteil von bis zu 10% beobachten (Prince et al., 2007).

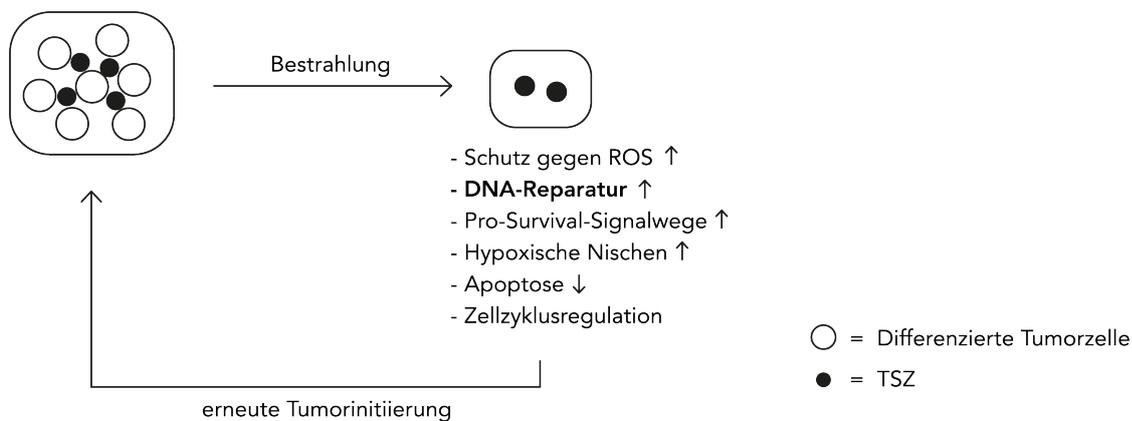
### **1.2.2 Eigenschaften von TSZ**

Die drei wichtigsten Funktionen der TSZ sind Selbsterneuerungskapazität, Differenzierungsfähigkeit und starkes proliferatives Potenzial (Major et al., 2013; Marjanovic et al., 2013; Schulz et al., 2019; Wong et al., 2011). Daneben besitzen TSZ weitere stammzellähnliche Fähigkeiten, wie angiogenetische Induktion, Migrations- und Metastasierungskapazität, erhöhte Membrantransporter-Aktivität, apoptotische Resistenz und verstärkte Aktivierung der DNA-Reparaturkapazität (Rich, 2016; Schulz et al., 2019).

Das starke, mutationsbedingte, tumorfördernde Potenzial befähigt TSZ zur Regeneration von Tumorgewebe, das nur von einer kleinen Zellpopulation abstammt (Major et al., 2013). Weiterhin sind sie aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung in der Lage, durch symmetrische und asymmetrische Teilung phänotypisch nicht unterscheidbare TSZ-Nachkommen zu bilden und damit den Krebsstammzellpool stetig zu erweitern (Baumann et al., 2008; Major et al., 2013). Mit ihrer Differenzierungskapazität ist es TSZ aber auch möglich, heterogene Nachkommen hervorzubringen, die durch transformierende Mutationen ein unbegrenztes Proliferations- und Überlebenspotenzial mit großer Plastizität besitzen. Alle genannten Eigenschaften von TSZ ermöglichen Tumoren eine stetige Progression und Erhaltung sowie Behandlungsresistenzen (Baumann et al., 2008; Major et al., 2013; Rich, 2016).

### 1.2.3 Bedeutung für Strahlenresistenz im HNSCC

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3. beschrieben, werden beim HNSCC unabhängig von anatomischen und ätiologischen Faktoren TSZ als Ursprungszellen des Tumorwachstums vermutet (Johnson et al., 2020; Major et al., 2013). Des Weiteren ist bekannt, dass das kurative Potenzial aktueller Behandlungsmodalitäten wie der Strahlentherapie, die auf eine allgemeine Zellreduktion abzielen, maßgeblich von den Eigenschaften der TSZ des HNSCCs eingeschränkt wird (siehe Abb. 1.3) (Arnold et al., 2020; Wong et al., 2011).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der TSZ-Strahlenresistenzmechanismen.** Gezeigt sind sechs grundlegende Mechanismen von TSZ, die zur Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung und damit trotz Eliminierung therapiesensibler, differenzierter Tumorzellen zu erneuter Tumorerneuerung und Rezidiven führen (Arnold et al., 2020; Konings et al., 2020; Schulz et al., 2019).

Die Wirkung ionisierender Strahlung basiert auf einer Akkumulation nicht-reparierbarer DNA-Läsionen (u.a. DNA-Doppelstrangbrüche), welche zum Tod von Tumorzellen und damit zu einer Verkleinerung des klonogenen Tumorzellpools führen (Schulz et al., 2019). Da TSZ zahlreiche Mechanismen entwickeln, um tödliche DNA-Läsionen zu verhindern, können sie nur schwer eliminiert werden (Schulz et al., 2019). Zu diesen Resistenzmechanismen der TSZ gehören unter anderem Schutz gegen Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), verstärkte DNA-Reparaturprozesse, Aktivierung von Pro-Survival-Signalwegen, hypoxische Nischen der Tumormikroumgebung, reduzierte Apoptose und Zellzykluskontrolle (Arnold et al., 2020; Konings et al., 2020; Nathansen, Meyer, et al., 2021; Schulz et al., 2019). Diese Fähigkeiten haben zur Folge, dass verbliebene TSZ in der Lage sind, das Tumorwachstum trotz postoperativer Reduktion des Tumorzellvolumens neu zu initiieren (Baumann et al., 2008; Major et al., 2013).

Darüber hinaus kann Radiotherapie im HNSCC als kompensatorische Reaktion auf den Zellverlust eine Umwandlung von Nicht-TSZ zu Zellen mit TSZ-Merkmalen bewirken und damit zu einer adaptiven Radioresistenz beitragen (Arnold et al., 2020). Dennoch basieren aktuelle Methoden zur Beurteilung des Therapieerfolgs auf den Endpunkten der Gesamtreduktion des Tumolvolumens sowie der Anzahl verbliebener Zellen, was den TSZ-Anteil nicht berücksichtigt (Major et al., 2013). Das hohe Auftreten von Tumorrezidiven nach Bestrahlungstherapie beim HNSCC könnte jedoch auf eine unzureichende Eliminierung von TSZ zurückzuführen sein (Nathansen, Meyer, et al., 2021). Die Identifizierung molekularer Resistenzmechanismen von TSZ und beteiligter Biomarker könnte sowohl zur Prognoseabschätzung als auch für die Entwicklung individualisierter, TSZ-eliminierender Therapiekonzepte dienen.

### **1.2.4 Biomarker für TSZ im HNSCC**

Biomarker sind bestimmte messbare Merkmale biologischer Strukturen, die entweder diagnostische, prognostische oder prädiktive Indikatoren darstellen können sowie die Identifizierung von Strukturen ermöglichen (Arnold et al., 2020; Polverini et al., 2018). Aufgrund der gewebsspezifischen Eigenschaften von TSZ und hoher intra- und intertumoraler Heterogenität sowie Tumorplastizität konnte bisher kein universeller, zuverlässiger Tumormarker für TSZ identifiziert werden (Arnold et al., 2020; Major et al., 2013). Dennoch gibt es einige spezifische Zelloberflächenmarker für einzelne Tumorentitäten, anhand derer TSZ identifiziert werden können. Die am besten untersuchten und prognostisch bedeutsamsten TSZ-Biomarker im HNSCC sind CD44, CD133 und ALDH1 (Johnson et al., 2020; Walcher et al., 2020).

Das Glykoprotein CD44 ist ein Zelloberflächenrezeptor, der an interzellulären Interaktionen und Zellmigration beteiligt ist. Studien zufolge besitzen HNSCC-Zellen mit hoher CD44-Expression die Fähigkeit zu Selbsterneuerung und sind mit Metastasierungen und schlechter Prognose assoziiert (Johnson et al., 2020). Das Transmembran-Glykoprotein CD133 ist in TSZ des HNSCCs ebenfalls erhöht und wird mit einer erhöhten Metastasierungsrate und Invasivität in Verbindung gebracht (Johnson et al., 2020; Major et al., 2013). ALDH1 ist ein zytosolisches Enzym, welches sowohl in Stamm- und Progenitorzellen als auch in TSZ stark exprimiert wird. Im HNSCC konnte eine erhöhte ALDH1-Expression mit Tumorbildung, Selbsterneuerungsfähigkeiten, Invasionsfähigkeiten und Therapieresistenzen assoziiert werden. Außerdem korreliert eine hohe ALDH1-Expression beim HNSCC

mit Metastasierung und geringem Patientenüberleben. Darüber hinaus konnten weitere potenzielle Marker für TSZ im HNSCC identifiziert werden, darunter die Octamer-bindenden Transkriptionsfaktoren Oct3 und Oct4 (*Octamer binding transcription factor 3, 4*), sowie Sox-2 und Nanog (Johnson et al., 2020; Major et al., 2013). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem TSZ-Marker Oct4, da eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors im Zusammenhang mit Therapieresistenz im HNSCC beobachtet werden konnte (Koo et al., 2015; Ventelä et al., 2015).

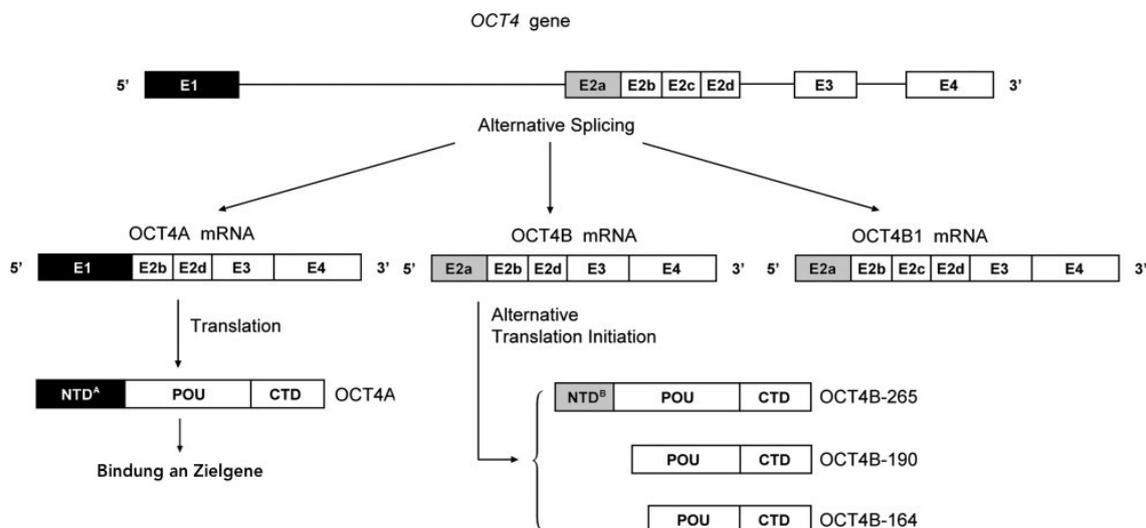
### 1.3 Transkriptionsfaktor Oct4

Oct4 wird vermehrt in embryonalen Stammzellen exprimiert und reguliert die zelluläre Selbsterneuerung und Pluripotenz (Koo et al., 2015; Ventelä et al., 2015). In den letzten Jahren konnten viele Arbeiten feststellen, dass der Transkriptionsfaktor Oct4 auch in TSZ eine entscheidende Rolle spielt und bei vielen Tumorarten überexprimiert wird. So wurde gezeigt, dass eine hohe Oct4-Expression in Tumoren oft mit einer schlechten Prognose und Resistenzen gegenüber zytotoxischen Therapiemodalitäten einhergeht (Koo et al., 2015; Ventelä et al., 2015; Wang & Dai, 2010). Da Oct4 auch im HNSCC vermehrt exprimiert ist und es Hinweise gibt, dass Oct4 maßgeblich an Therapieresistenzen im HNSCC beteiligt ist, besteht großes Interesse, den TSZ-Faktor intensiver zu untersuchen und Oct4-abhängige Resistenzmechanismen zu identifizieren (Koo et al., 2015; Ventelä et al., 2015).

#### 1.3.1 Isoformen, Struktur und Eigenschaften von Oct4

Oct4 wird vom POU5F1-Gen kodiert. Dieses Gen gehört zur Klasse 5 POU (Pit-Oct-Unc)-Familie der Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren. Durch alternatives Spleißen des Transkripts des POU5F1-Gens können drei Hauptisoformen erzeugt werden: Oct4 A, Oct4 B und Oct4 B1 (siehe Abb. 1.4). Die bisher am besten charakterisierte Isoform Oct4 A (oft als Oct4 bezeichnet) spielt die größte Rolle beim Erhalt pluripotenter Stammzellen durch die Regulation von Selbsterneuerung, Differenzierung und Reprogrammierung somatischer Zellen (Wang & Dai, 2010; Y. Zhou et al., 2018). Die Isoform Oct4 B hingegen trägt nicht zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen bei, fördert jedoch Reaktionen gegen Zellstress. Die unterschiedlichen Funktionen der Isoformen zeigen die Notwendigkeit, diese differenziert zu betrachten (Wang & Dai, 2010).

Das Oct4 A Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der regulatorische Funktionen ausübt, überwiegend im Zellkern lokalisiert ist und aus drei Domänen besteht: N-terminale Domäne, POU-Domäne und C-terminale Domäne. Über die POU-Domäne ist Oct4 A in der Lage, an Promotor- oder Enhancer-Regionen von Zielgenen zu binden und deren Transkription zu regulieren (Mohiuddin et al., 2020; Y. Zhou et al., 2018). Als mögliche Oct4 A-Zielgene in TSZ konnten bisher unter anderem Pluripotenz- (z.B. Nanog, SOX-2, REX-1 und CDX-2) sowie Protoonkogene (z.B. c-FOS) identifiziert werden. Außerdem werden DNA-Reparaturgene als Zielstrukturen vermutet, jedoch ist hier intensivere Forschung notwendig (Mohiuddin et al., 2020; Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021; Y. Zhou et al., 2018). Im Kontext von Therapieresistenz und Tumorwachstum wurde zudem festgestellt, dass Oct4 A an der Regulation von Zellwachstum- und proliferation sowie der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur beteiligt ist (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Die mögliche Regulation von DNA-Reparaturprozessen durch Oct4 A, die zu Resistenzen und Rezidiven im HNSCC beitragen könnte, wird in dieser Arbeit fokussiert untersucht.



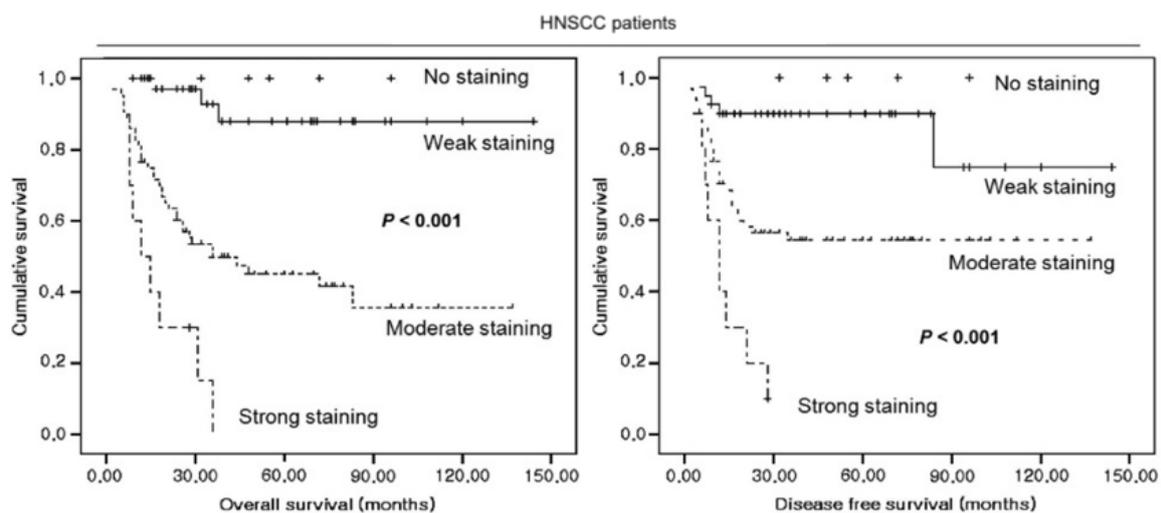
**Abbildung 1.4: Strukturelle Darstellung des Oct4-Gens, mRNA-Isoformen und Proteinprodukte.** [Modifiziert nach Gao et al. (Gao et al., 2012)]. Aus dem Oct4-Gen werden die Hauptisoformen Oct4 A, Oct4 B und Oct4 B1 gebildet und anschließend die Proteine translatiert. Abkürzungen: CTD: C-terminale Domänen; NTD: N-terminale Domänen; POU: POU-Homöodomänen.

### 1.3.2 Vorkommen und Bedeutung im HNSCC

In einige Arbeiten konnte eine erhöhte Expression von Oct4 A im HNSCC beobachtet werden (Koo et al., 2015; Ventelä et al., 2015; Yu & Cirillo, 2020). Koo et al. (2015)

zeigten mittels immunhistochemischer Verfahren, dass der Transkriptionsfaktor Oct4 A in primären HNSCC-Geweben höher exprimiert ist als in gesundem Gewebe des Hals-Kopf-Bereiches. Zudem konnten sie eine Koexpression mit dem TSZ-Marker CD44 feststellen, was die bevorzugte Expression von Oct4 A in TSZ unterstützt. Koo et al. (2015) zeigten außerdem *in vitro*, dass Oct4 A die Umwandlung von differenzierten HNSCC-Zellen in TSZ fördert und eine hohe Oct4 A-Expression mit der Invasivität von HNSCC-TSZ sowie der Tumorprogression korreliert (Koo et al., 2015). Diese Beobachtung unterstützend, untersuchten Ventelä et al. (2015) 52 Proben von HNSCC-Patientinnen und Patienten immunhistochemisch und konnten feststellen, dass davon 36,5% Oct4 A-positiv waren (Ventelä et al., 2015). Eine bisherige Limitation der Messung von endogenen Oct4 A-Expressionen ist, dass das Protein in TSZ im Vergleich zu embryonalen Stammzellen in nur sehr geringen Mengen vorliegt, die oft unterhalb der Nachweisgrenze von Routinemethoden liegen. Zhou et al. (2018) stellten jedoch fest, dass die oft nicht-detektierten Oct4 A-Mengen weitreichende biologische Funktionen ausführen (Y. Zhou et al., 2018).

Im klinischen Kontext wurde die Expression von Oct4 A in mehreren Arbeiten mit einer Therapieresistenz (Strahlen- und Chemotherapien) als auch einer schlechten Prognose für HNSCC-Patientinnen und Patienten assoziiert (siehe Abb. 1.5) (Koo et al., 2015; Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021; Ventelä et al., 2015; Wang & Dai, 2010).



**Abbildung 1.5: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der HNSCC-Patientinnen und Patienten (n=119) mit unterschiedlichen Oct4-Expressionen.** [Modifiziert nach Koo et al. (Koo et al., 2015)]. Links ist das Gesamt- (*Overall survival*) und rechts das erkrankungsfreie Überleben (*Disease free survival*) in Monaten bei leichter (*weak*), moderater (*moderate*) und starker (*strong*) Oct4-Expression aufgetragen.

### 1.4 DNA-Schäden und DNA-Reparatur

Zu den bekannten Eigenschaften von TSZ gehört die Regulierung der DNA-Reparatur. Während die fehlerfreie DNA-Reparatur in somatischen Stammzellen vor allem der Aufrechterhaltung der DNA-Integrität dient, nutzen TSZ die Fähigkeit verstärkter Reparaturprozesse zur Resistenzentwicklung gegenüber exogen induzierter DNA-Schäden, was wiederum zu Therapieversagen, Tumorprogression und Rezidiven führt (Carruthers et al., 2018; Schulz et al., 2019). Wie im Abschnitt 1.3.1. beschrieben, ist der in HNSCC-Tumoren exprimierte TSZ-Transkriptionsfaktor Oct4 A möglicherweise an der Regulation von DNA-Reparaturprozessen beteiligt (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Diese Oct4 A-abhängige Regulation gilt es intensiver zu untersuchen, um zukünftig neue Ziele in der Tumorthherapie des HNSCCs zu identifizieren.

Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen der DNA-Reparatur erläutert. Hierbei wird der Fokus auf die Homologe Rekombination (HR) gelegt, die möglicherweise als ein Hauptziel durch den Transkriptionsfaktor Oct4 A reguliert werden könnte (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021).

#### 1.4.1 DNA-Replikationsstress

Die eukaryotische DNA-Replikation beschreibt den komplexen biologischen Prozess einer akkuraten Duplikation der genomischen DNA in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus. Die DNA-Replikation beginnt nach der Bindung von Lizenzierungs- und Initiierungsfaktoren an vielen einzelnen Replikationsstartpunkten und bildet bidirektionale Replikationsgabeln. Zunächst erfolgt das Lösen der Basenpaare durch Helikasen, die Relaxation nachgeschalteter DNA-Stränge durch Topoisomerasen und den Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphaten an beiden DNA-Strängen (dNTPs) durch Polymerasen (Kitao et al., 2018; Zeman & Cimprich, 2014). Um die Entstehung genomischer Mutationen zu verhindern und DNA-Integrität zu erhalten, muss die DNA-Replikation fehlerfrei arbeiten. Dennoch kann der Replikationsapparat auf Hindernisse endo- oder exogener Herkunft treffen, die zu einer Verlangsamung oder zum Anhalten der Replikationsgabel oder DNA-Synthese führen können (Zeman & Cimprich, 2014). Diese ineffiziente DNA-Replikation wird als Replikationsstress (RS) bezeichnet. Zu den Faktoren, die das Replisom behindern und RS verursachen, gehören die Hemmung der DNA-Polymeraseaktivität, DNA-Vernetzungen (*Interstrand Crosslinks*), Blockierung der Topoisomerase oder DNA-Läsionen in Form von Strangbrüchen und

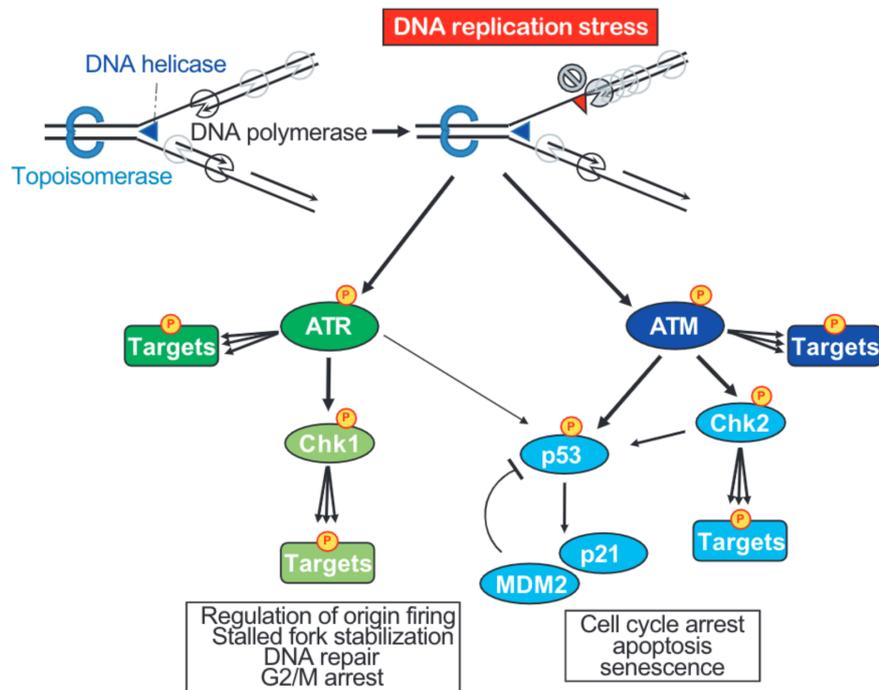
DNA-Addukten (Kitao et al., 2018). Die verursachenden Faktoren des RS können sowohl endogen durch spontane Stoffwechselmetabolite wie ROS oder Replikationsfehler hervorgerufen werden, als auch durch Umwelteinflüsse wie ionisierende Strahlung, ultraviolettes Licht und chemische Wirkstoffe induziert sein (Ciccina & Elledge, 2010). Um permanente DNA-Schäden und genomische Instabilität zu verhindern, wird in den Zellen mit blockierten Replikationsgabeln eine DNA-Schadensantwort (DDR, *DNA damage response*) aktiviert, welche die DNA-Reparatur, das Fortschreiten des Zellzyklus, zelluläre Seneszenz und Apoptose koordiniert (Carruthers et al., 2018; Kitao et al., 2018).

### 1.4.2 DNA-Schadensantwort

Die DDR ist eine Signalkaskade zur Erhaltung genomischer Integrität und wird durch die Serin/Threonin-Proteinkinasen der Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen (Pi3Ks) ATM (*Ataxia telangiectasia-mutated*), ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related*) und DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) eingeleitet (siehe Abb. 1.6) (Ciccina & Elledge, 2010).

Die ATR-Kinase ist für die DDR nach gestörter DNA-Replikation in der S-Phase verantwortlich und wird durch einzelsträngige DNA (ssDNA), die durch RPA (Replikationsprotein A) gebunden wurde, aktiviert (Kitao et al., 2018). Die RPA-gebundenen ssDNA-Stränge entstehen, wenn die Helikase in einer blockierten Replikationsgabel die Matrizen-DNA weiter entwindet, obwohl die Polymerase nicht weiter aktiv ist (Zeman & Cimprich, 2014). Nach Aktivierung phosphoryliert die ATR-Kinase viele Substrate, darunter CHK1 (*Checkpoint kinase 1*), das sowohl die DNA-Reparaturprozesse (u.a. die HR), Hemmung von Replikationsneustarts als auch den Zellzyklusarrest über den Intra-S-Phase Kontrollpunkt koordiniert (Kitao et al., 2018). Diese Reaktion fördert die Stabilisierung der Replikationsgabel und hemmt das Fortschreiten des Zellzyklus vor Behebung der Replikationsblockade (Zeman & Cimprich, 2014). Die DDR-Kinase ATM wird nach Bindung des sensorischen MRN-Komplexes in allen Phasen des Zellzyklus als Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) (z.B. durch ionisierende Strahlung) an das Chromatin rekrutiert. Das aktivierte ATM phosphoryliert anschließend Faktoren der Zellzyklusregulation sowie DSB-Reparaturmechanismen wie die HR (Blackford & Jackson, 2017). Die Kinase DNA-PKcs wird ebenfalls durch DSB aktiviert und fördert die DSB-Reparatur durch Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ, *Non-homologous end joining*).

Abhängig vom Erfolg der DDR-eingeleiteten Stabilisierungs- und Reparaturprozesse kann die DNA-Replikation entweder neu gestartet werden oder es kommt zum Kollaps der Replikationsgabel mit konsekutiv entstehenden ein-endigen DSBs, Apoptose oder zellulärer Seneszenz (Jackson & Bartek, 2009; Zeman & Cimprich, 2014).



**Abbildung 1.6: Strukturelle Darstellung der DNA-Schadensantwort auf Replikationsstress.** [Modifiziert nach Kitao et al. (Kitao et al., 2018)]. Durch die RS-abhängige Aktivierung der Kinasen ATR und ATM folgt die Phosphorylierung von Mediator- und Effektorproteinen, die u.a. das die Aktivierung von DNA-Reparaturprozessen und den Zellzyklusarrest koordinieren.

### 1.4.3 DNA-Reparatur

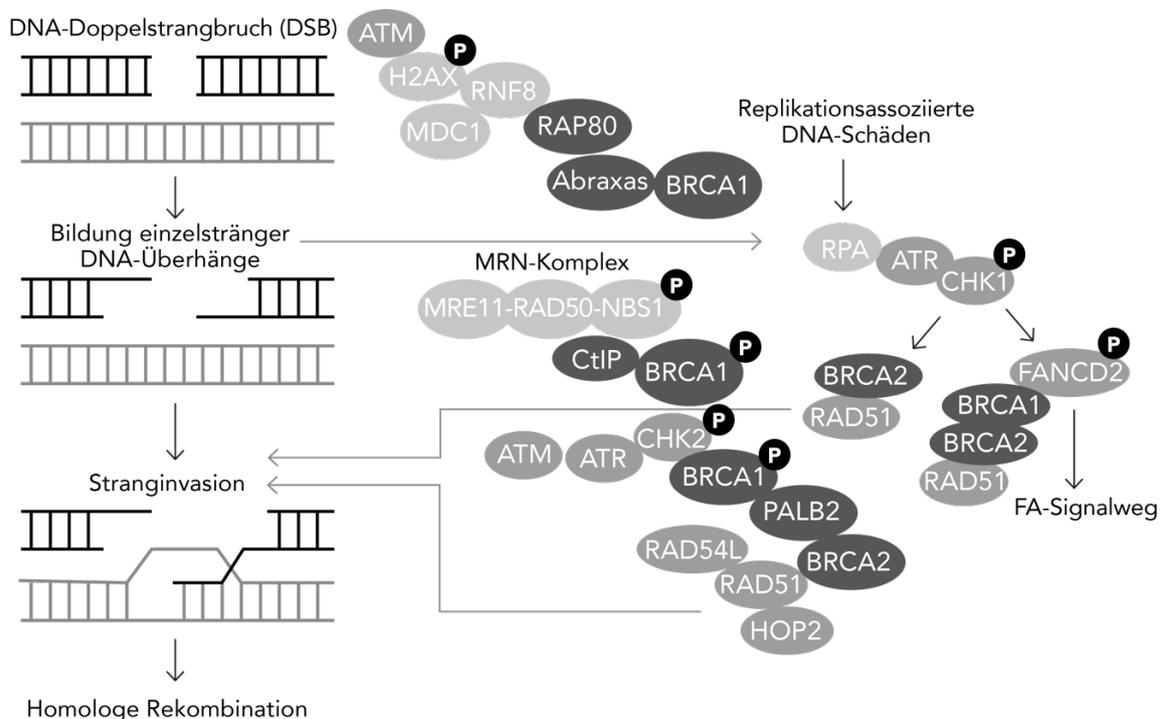
Für die adäquate Reparatur unterschiedlicher DNA-Schäden, die sich meist an die DDR anschließt, haben sich verschiedene Reparaturmechanismen entwickelt. Zu den wichtigsten DNA-Reparaturwegen zählen für Einzelstrang-DNA-Brüche (SSBs) die Fehlpaarungsreparatur (MMR, *Mismatch-Reparatur*), Basenexzisionsreparatur (BER) und Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sowie homologe Rekombination (HR) und nicht-homologe Endverbindung (NHEJ) für die Reparatur von DSBs (Ciccia & Elledge, 2010; Glorieux et al., 2017; Jackson & Bartek, 2009).

Es gibt Hinweise darauf, dass die lokale, ausgeprägte Rezidivrate beim HNSCC hauptsächlich auf eine hohe DNA-Reparaturkapazität von TSZ zurückzuführen ist

(Glorieux et al., 2017). Hierbei könnte vor allem die HR eine bedeutende Rolle spielen (Nathansen, Meyer, et al., 2021; Schulz et al., 2019).

### 1.4.3.1 Homologe Rekombination (HR)

Die HR ist der Hauptreparaturweg für ein-endige DSBs in der S-Phase und ist zudem an der Reparatur zwei-endiger DSBs und DNA-Vernetzungen sowie an der Stabilisation angehaltener Replikationsgabeln beteiligt (Heyer et al., 2010; Liao et al., 2018). Abhängig von der zu reparierenden Schadensart, teilt sich die HR in drei verschiedene Unterformen auf. Hierzu zählen das SDSA (*Synthesis-dependent strand annealing*), das dHJ (*Double-Holliday Junction model*) und die BIR (*Breakage-induced replication*). Alle Formen der HR nutzen die DNA-Stranginvasion und die Vorlagen-gesteuerte DNA-Reparatursynthese für eine akkurate Reparatur. Der dominierende SDSA-Weg wird für die Reparatur zwei-endiger DSBs eingeleitet, während ein-endige, replikationsassoziierte DSBs durch BIR repariert werden. Beide Teilwege kommen im Rahmen der DNA-Reparatur nach Schädigung mit Bestrahlung vor (Chatterjee & Walker, 2017; Heyer et al., 2010).



**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Homologen Rekombination.** [Modifiziert nach Roy et al. (Roy et al., 2012)]. Nach Erkennung von DSBs und replikationsassoziierten DNA-Schäden durch sensorische Faktoren wie ATM, ATR und den MRN-Komplex wird die HR eingeleitet und weitere HR-Faktoren rekrutiert und aktiviert. Nach der Bildung einzelsträngiger DNA-Überhänge bindet das RPA-

Protein, was anschließend durch das für die Stranginvasion essenzielle Protein RAD51 ersetzt wird. Bei diesem Schritt helfen die HR-Proteine BRCA1, PALB2, BRCA, HOP2 und RAD54L. Über den ATR-CHK1-Weg nach replikationsassoziierten Schäden wird außerdem das FA-Protein FANCD2 phosphoryliert, welches die DNA-Reparatur über den FA-Signalweg einleitet.

Wie in Abb. 1.7 dargestellt, erfolgt die Initiierung der HR durch DSBs durch die Detektion des DNA-Schadens mithilfe des MRE11-RAD50-NBS1-Komplexes und der Aktivierung von ATM mit konsekutiver Phosphorylierung von H2AX (*H2A histone family member X*) (Tanaka et al., 2006). Nach Bindung des MRN-Komplexes und ATM-Aktivierung kommt es zu einer Interaktion des MRN-Kofaktors CtIP (*CtBP-Interacting protein*) mit der NBS1-Untereinheit des MRN-Komplexes, was nach Aktivierung der Endonukleasenfunktion von CtIP zur Endresektion der DNA-Stränge führt und einzelsträngige DNA-Überhänge bildet. Diese werden durch RPA gebunden, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Zu diesem Zeitpunkt kann auch ATR durch RPA aktiviert werden und die CHK1-Signalkaskade der HR-Aktivierung durch Interaktion von CHK1 mit BRCA2 (*Breast Cancer-2 protein*) und RAD51 (*Radiation 51*) anstoßen (Meyer et al., 2020; Sørensen et al., 2005). Zudem phosphoryliert CHK1 das Fanconi-Anämie-(FA) Protein FANCD2, was zu Einleitung des FA-Signalwegs und einer Kollokalisierung von HR-Faktoren wie BRCA1 (*Breast Cancer-1 protein*), BRCA2 und RAD51 führt, dessen Zusammenwirken einen Schutz von Replikationsgabeln darstellt und die HR vorantreibt (Liao et al., 2018). Der ATR-CHK1-Weg wird jedoch vorrangig bei replikationsassoziierten Schäden aktiviert. Über ATM folgt außerdem die Aktivierung von CHK2 (*Checkpoint kinase 2*), die den Zellzyklusarrest initiiert und weitere HR-Faktoren, wie z.B. BRCA1 rekrutiert. Das phosphorylierte BRCA1 bindet über PALB2 (*Partner and Localizer of BRCA-2*) an BRCA2, welches bereits das Protein RAD51 gebunden hat. Anschließend wird RPA durch RAD51-Proteine verdrängt, was zur Bildung eines helikalen Nukleoproteinfilaments führt, welches in homologe Sequenzen des Schwesterchromatids eindringt und eine sog. Verdrängungsschleife (*D-Loop*) mit dem doppelsträngigen Bereich der Template-DNA bildet. Um das Eindringen in den nahegelegenen DNA-Strang zu ermöglichen, löst das Protein RAD54 (*Radiation 54*) im Vorfeld RAD51 von der DNA, damit die Polymerase mit der Synthese starten kann (Chatterjee & Walker, 2017; Heyer et al., 2010). Zudem sind die Proteine HOP2 (*Homologous-pairing protein 2*) und RAD54L über eine Interaktion mit RAD51 an der Stranginvasion beteiligt (Peng et al., 2013; Pezza et al., 2014). Im Folgenden teilen sich die Abläufe der verschiedenen HR-Wege auf.

Beim SDSA wird nach der anschließenden DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase die D-Schleife ohne das Überkreuzen (*Crossover*) beider DNA-Stränge vorzeitig aufgelöst. Der neu synthetisierte Strang lagert sich nun wieder an das prozessierte zweite Ende des Bruchs an und leitet die zweite Runde der DNA-Synthese ein (Chatterjee & Walker, 2017; Heyer et al., 2010). Im Unterschied zur SDSA steht für die HR bei der Reparatur ein-endiger DSBs durch BIR nur ein DNA-Ende zur Verfügung. Im HR-Verlauf kommt es nach der Bildung von Holiday-Junctions (HJ, Überkreuzen beider DNA-Stränge) zu einer langen DNA-Synthese mit Spaltung der HJs am Ende der Synthese (Malkova, 2018). Beim dHJ-Weg kommt es zur Kopie eines kleineren DNA-Abschnitts mit der Bildung zweier HJs, anschließender Lückenreparatur, Ligation und möglicher Crossover-Produktionen (Chatterjee & Walker, 2017).

### **1.4.3.2 Bedeutung der HR für die Therapieresistenz in TSZ**

Eine hochregulierte DNA-Reparatur in Krebsstammzellen konnte bereits als eine bedeutsame Ursache für Resistenzen gegenüber Radio- sowie Chemotherapie identifiziert werden (Liu et al., 2020; Nathansen, Meyer, et al., 2021; Schulz et al., 2019). Bei mehreren Tumorentitäten wurde gezeigt, dass die DNA-Reparaturkapazität in TSZ nach DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung im Vergleich zu somatischen Zellen höher ist. Dazu zählen das Glioblastom, Prostata-, Lungen- und Mammakarzinom, sowie auch im HNSCC (Arnold et al., 2020).

Da TSZ DNA-Schäden vorzugsweise über die HR reparieren, wird ihr eine besondere Bedeutung in der TSZ-bedingten Resistenz zugesprochen (Arnold et al., 2020; Schulz et al., 2019). In TSZ des Glioblastoms wurde eine verstärkte Expression von RAD51, BRCA1 und BRCA2 beobachtet, sowie eine Korrelation von Resistenz und signifikant weniger DNA-Schäden nach Bestrahlung (Balbous et al., 2016). Auch beim Ovarialkarzinom scheint die S-Phase spezifische DNA-Reparatur durch HR maßgeblich zur Therapieresistenz beizutragen (Schulz et al., 2019). Liu et al. (2020) lieferten erste Hinweise für verstärkte HR-Signalwege in HNSCC-Zellen. Sie konnten hohe Expressionswerte von BRCA1, BRCA2, RAD51 und RPA in radioresistenten HNSCC-Zelllinien und Xenotransplantaten feststellen (Liu et al., 2020). Diese möglicherweise erhöhte HR-Kapazität in radioresistenten HNSCC-Zellen gilt es in Zusammenhang mit den Oct4 A-exprimierenden TSZ zu bringen, um zukünftig TSZ-eliminierende Angriffsziele und einen potenziellen TSZ-Biomarker identifizieren zu können.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das weltweit häufig auftretende HNSCC verzeichnet eine geringe 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate mit einer hohen Rezidivrate durch Therapieversagen (Economopoulou et al., 2019). Es ist bekannt, dass TSZ eine große Rolle bei der Entwicklung von Therapieresistenzen spielen und im HNSCC vermehrt vorkommen (Johnson et al., 2020). Zu den bereits identifizierten Resistenzmechanismen der TSZ gehört eine erhöhte DNA-Reparatur unter anderem durch gesteigerte HR-Aktivität (Schulz et al., 2019). Zudem konnte bei den HNSCC-TSZ der Marker Oct4 A identifiziert werden, der zur Resistenzbildung beitragen könnte (Koo et al., 2015). Der Zusammenhang von Oct4-exprimierenden TSZ im HNSCC und HR-Kapazität im Kontext von Radioresistenz könnte zu neuen Erkenntnissen führen, um die Weiterentwicklung von TSZ-gerichteten Therapiekonzepten voranzutreiben. In dieser Arbeit sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

1. Tragen Oct4 A-exprimierende TSZ im HNSCC durch eine verstärkte HR zur Therapieresistenz nach Bestrahlung bei?
2. Kann abhängig von der Oct4 A-Expression ein synthetischer Letalitätseffekt durch PARP1-Inhibition erzielt werden und Oct4 A damit als prädiktiver Biomarker zu Therapiewahl dienen?
3. Könnten zur Strahlensensibilisierung Oct4 A-positiver HNSCC-Tumore weitere TSZ-gerichtete Therapien zum Einsatz kommen?

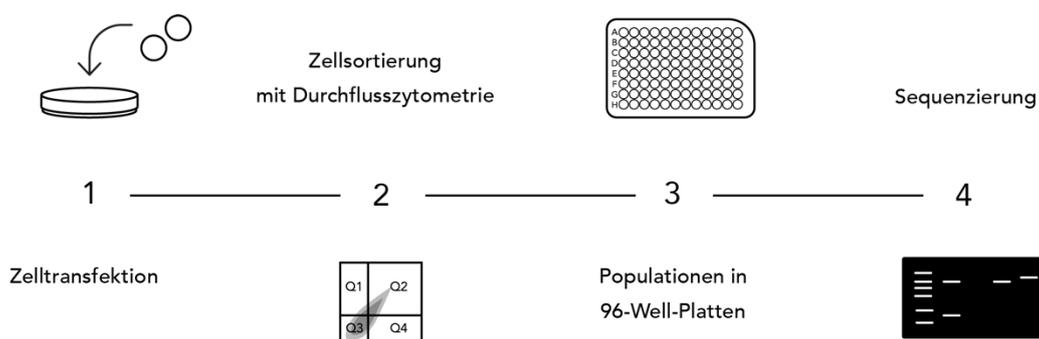
Zunächst wurde der Einfluss des potenziellen Biomarkers Oct4 A auf grundlegende Eigenschaften der etablierten Klongruppen untersucht. Hierfür wurde das Proliferationsverhalten mittels Wachstumskurven sowie die Klonogenität beobachtet. Folgend wurde mittels Koloniebildungstests die Strahlenempfindlichkeit der Klone untersucht. Um den Einfluss von Oct4 A auf die Funktionalität der HR nachzuweisen, wurde das zelluläre Überleben nach PARP1-Inhibition (Olaparib) und ionisierender Strahlung beobachtet. Es erfolgte der Einsatz einer CHK1-Inhibition mit gleicher Methodik. Die Expression HR-relevanter Proteine wurde mittels Western-Blot analysiert. Zuletzt folgte die Untersuchung replikationsassoziierter DNA-Schäden durch den Nachweis von  $\gamma$ H2AX- und RPA Foci nach Bestrahlung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Für Experimente dieser Arbeit wurde die HPV-negative HNSCC Zelllinie UTSCC5 (University of Turku-Squamosa Cell Carcinoma-5) aus dem Ursprungsgewebe eines humanen Mundhöhlenkarzinoms verwendet, welche besonders hohe Expressionslevel von Oct4 A-mRNA aufweist (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Im Rahmen vorheriger Arbeiten wurden aus der Zelllinie Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klone etabliert. Für den Oct4 A-Knockout erfolgte eine zielgerichtete Abschaltung der Pluripotenz-relevanten Isoform A des Oct4-Gens über Insertions- und Deletionsmutationen im Exon 1. mittels Transfektion spezieller doppelsträngiger RNA-Moleküle (siRNA, *Small interfering RNA*). Hierbei entstanden drei Klone, welche mittels Sequenzierung validierte Rasterschubmutationen in beiden Allelen aufwiesen, die wiederum zu einem vollständigen Oct4 A-Knockout führten (KO1, KO2 und KO3). Für das klonale Modell wurden drei weitere, entsprechende Wildtyp-Zellen selektiert, die das gleiche Verfahren durchliefen, aber keinen Gen-Knockout aufwiesen (WT1, WT2 und WT3) (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Die etablierten Klongruppen aus jeweils drei Subklonen zeigen demnach klonale Varianzen, bilden damit eine zelluläre Diversität ab und betonen Oct4 A-abhängige, signifikante Beobachtungen.



**Abbildung 2.1: Ablauf des Oct4 A-Knockouts (KO) in UTSCC5 Zellen**

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in Kryomedium aus 90% FKS und 10% DMSO gelagert (ca.  $1,0 \times 10^6$  pro 2 ml Eppendorf-Gefäß) und für Experimente aufgetaut. Es wurden hohe Passagezahlen vermieden und ggf. neue Zellportionen aufgetaut. Vor Beginn der Experimente wurden die Zellen auf Mykoplasmen geprüft.

**Tabelle 1: Einteilung Zellklone der HNSCC Zelllinie UTSCC5**

UTSCC5 Zellkone	Oct4-Genstatus	Abkürzung	Herkunft
UT5-TE2d #1	Oct4 A-Wildtyp 1	WT1	University of Turku, Finnland (Prof. Reidar Grenman)
UT5-TE2d #2	Oct4 A-Wildtyp 2	WT2	
UT5-T41 #1	Oct4 A-Wildtyp 3	WT3	
UT5-TE1 #2	Oct4 A-Knockout 1	KO1	
UT5-TE1 #4	Oct4 A-Knockout 2	KO2	
UT5-TE1 #5	Oct4 A-Knockout 3	KO3	

### 2.1.2 Medium und Reagenzien für Zellkulturhaltung

**Tabelle 2: Medium und Reagenzien für Zellkulturhaltung**

Name	Zusammensetzung / Hersteller
Coulter Isoton™ II Diluent	Beckmann Coulter™, Krefeld, DE
Dulbecco's Modified Eage'l's Medium - high glucose (DMEM)	4500 mg/L Glukose, L-Glutamin, Natriumpyruvat und Natriumbicarbonat, flüssig, sterilfiltriert / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
1x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Modifiziert ohne Kalzium- und Magnesiumchlorid, flüssig, sterilfiltriert / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
1x Trypsin-EDTA Lösung	Steril, $\gamma$ -bestrahlt, 0,25% Schweine-Trypsin (1:250) in HBSS, 0,1% EDTA / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

### 2.1.3 Puffer, Lösungen und Chemikalien

**Tabelle 3: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Proteinisolierung und Bicinchoninsäure-Test**

Name	Zusammensetzung / Hersteller
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes H <sub>2</sub> O / Millipore, Molsheim, F
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Lysepuffer	294 $\mu$ l Puffer A, 10 $\mu$ l PMSF Protease-Inhibitor, 100 $\mu$ l Glycerol
Phenylmethylsulfonylfluorid Protease-Inhibitor	200 mM in Isopropanol / Thermo Scientific

Puffer A	20 mM Hepes, 450 mM NaCl, 50 mM NaF0, 2 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol (DTT), 0,5 µg/ml Leupeptin, 0,5 µg/ml Pepstatin A, 1,0 µg/ml Trypsin Inhibitor, 0,5 µg/ml Aprotinin, 40 µg/ml Bestatin
Reagenz A, Reagenz B	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

**Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Western Blot**

Name	Zusammensetzung / Hersteller
Blockierungslösung	10x TBS, 5% Bovine Serum Albumin (BSA) / Thermo Fisher Scientific, USA
Laufpuffer	10% 10x TG-Puffer, 1% Sodiumdodecylsulfat (SDS), H <sub>2</sub> O / Carl Roth GmbH, DE
5x Probenpuffer nach Laemmli	50 mM Tris-HCl, 100 mM Dithiothreitol (DTT), 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerol / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
5x-Transblot-Puffer	5x Transblot-Puffer, NanoPure™ H <sub>2</sub> O, 70% Ethanol, H <sub>2</sub> O / Thermo Fisher Scientific, USA
10x Tris-Buffered Saline (TBS)-Puffer	10 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl / Sigma Aldrich und J.T. Baker, USA
Tris-Buffered Saline (TBS)-Tween20	0,1% Tween20 in 1x Tris-Buffered Saline (TBS) / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

**Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Immunfluoreszenz-Assay**

Name	Zusammensetzung / Hersteller
Blockierungslösung	3% BSA in 1x PBS
1x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	5x PBS in dH <sub>2</sub> O / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Fixierungslösung	2% Formaldehyd-Lösung in 1x PBS
Formaldehyd-Lösung	37% CH <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O, 10-15% Methanol / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Permeabilisierungslösung	1% BSA + 0,2% TritonX-100 in 1x PBS
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories, Kalifornien, USA
Waschlösung 1	1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
Waschlösung 2	0,5% Tween 20 in 1x PBS

**Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Koloniebildungsassay**

Name	Zusammensetzung / Hersteller
Coulter Isoton™ II Diluent	Beckmann Coulter™, Krefeld, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
70% Ethanol	Carl Roth GmbH, DE
Kristallviolett Färbelösung	0,1% in dH <sub>2</sub> O / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Olaparib (AZD2281), KU-0059436	PARP1-Inhibitor, 10 mM (1 ml in DMSO) / Selleckchem, München, DE
MK-8776 (SCH 900776)	CHK1-Inhibitor, 10mM (1 ml in DMSO) / Selleckchem, München, DE

## 2.1.4 Antikörper

**Tabelle 7: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Assay**

Antikörper	Hersteller / Nummer	Konzentration
Anti-Phospho-Histon H2AX (Ser139) Mouse IgG	Millipore Sigma, USA / #05-636	1:500 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
RPA (MA34) Mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology, USA / #sc-53496	1:600 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS

**Tabelle 8: Primäre Antikörper für Western Blot**

Antikörper	Hersteller / Nummer	Konzentration
BRCA1 Rabbit IgG	Cell Signaling Technology, USA / #9010	1:1000 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
BRCA2 Mouse IgG	Thermo Fisher Scientific, USA / #234403	1:500 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
CHK1 (2G1D5) Mouse IgG	Cell Signaling Technology, USA / #2360	1:750 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
FANCD2 (F117) Mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology, USA / #sc-20022	1:2000 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
HOP2 (PSMC3IP) Rabbit IgG	Proteintech, USA / #11339-1-AP	1:750 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
HSC 70 (B-6) Mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology, USA /	1:1000 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS

	#sc-7298	
PALB2 (79728) Rabbit IgG	Bethyl Laboratories, USA / #A301-246A	1:2000 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
RAD51 (Ab-1) Rabbit IgG	Millipore Sigma, USA / #PC130	1:1000 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
RAD54L Mouse IgG	Abcam, Cambridge, UK / #ab11055	1:1000 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS

**Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Assay**

Antikörper	Hersteller	Konzentration
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG	Cell Signaling Technology, USA / #4412	1:1000 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG	Thermo Fisher Scientific, USA / #A11005	1:1000 in 1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS

**Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Western Blot**

Antikörper	Hersteller	Konzentration
IRDye® 680RD Goat Anti-Mouse IgG	Li-cor® Biosciences, USA / #926-68070	1:7500 in 4% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
IRDye® 800CW Goat Anti-Mouse IgG	Li-cor® Biosciences, USA / #926-32210	1:7500 in 4% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
IRDye® 680RD Goat Anti-Rabbit IgG	Li-cor® Biosciences, USA / #926-68071	1:7500 in 4% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS
IRDye® 800CW Goat Anti-Rabbit IgG	Li-cor® Biosciences, USA / #926-32211	1:7500 in 4% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS

## 2.1.5 Größenstandards für Proteine

**Tabelle 11: Größenstandards für Western Blot-Proteine**

Bezeichnung	Zusammensetzung / Hersteller	Beschreibung
Ladepuffer Magicmark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 mM DTT, 17,4% Glycerin, 3% SDS, 0,025% Bromphenolblau / Thermo Scientific	Standardbanden werden nach Detektion mit dem Sekundärantikörper auf der Membran sichtbar.

Ladepuffer Seebue™ Plus2 Pre-Stained Protein Standard	Invitrogen, Tris-HCl, Formamide, SDS, Phenolrot / Thermo Scientific	Standardbanden sind im Gel und direkt nach dem Transfer auf der Membran sichtbar.
---	---	---

### 2.1.6 Geräte

**Tabelle 12: Geräte (verwendet am UKE in Hamburg)**

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav (Evo® 45)	Mediatech, Norderstedt, DE
Blot-Kammer (Criterion Precast)	Bio-Rad, München, DE
Brutschrank (BB 16 CU)	Heraeus®, Hanau, DE
Eismaschine (FM-120DE-50)	Hoshizaki, Amsterdam, NE
Eppendorf BioPhotometer®	Eppendorf, Hamburg, DE
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC 1	Vakuumbrand, Wertheim, DE
Heizblock (Thermostat 5320)	Eppendorf, Hamburg, DE
Laborschüttler	Edmund Bühler GmbH, DE
Magnetrührer (Ikamag™ Ret)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE
Mikroskop (Carl Zeiss™ Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, DE
Odyssey® CLX Imaging System	Li-cor® Biosciences, USA
Pipetten (Eppendorf® Research® plus) (0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe (Pipetboy Acu 2)	Integra Biosciences, Zizers, CHE
Präzisionswaage (PCB)	Kern & Sohn GmbH, DE
Reinstwasseranlage Milli-Q® Advantage	Millipore, Schwalbach am Taunus, DE
Röntgenröhre RS225	Gulmay Medical, Krefeld, DE
Sterile Werkbank (HeraSafe®)	Heraeus®, Hanau, DE
Stickstofftank	Custom BioGenic System, USA
Tischzentrifuge (Microfuge® R)	Beckman Coulter™, Krefeld, DE
Tischzentrifuge (Sprout® Mini-Zentrifuge)	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Vakuumpumpe (Oerlikon Leybold Vacuum)	Leybold GmbH, Pfäffikon, CHE
Vortexer (Vortex-Genie® 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wärmeschrank (Modell 400)	Memmert, Schwabach, DE
Wasserbad (Wd19/D3)	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, DE
Zellzähler (Coulter Counter Z2™)	Beckmann Coulter™, Krefeld, DE
Zentrifuge (Mega Star 3.0 / 3.0R)	Avantor®, VWR International GmbH, DE

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien (verwendet am UKE in Hamburg)**

Name	Hersteller
Coulter-Counter Gefäß (25 ml)	Beckmann Coulter™, Krefeld, DE
Criterion™ Tris-HCL Gel, 4-15 %	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Eppendorf Safe Lock Tubes (2 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Erlenmeyerkolben (1000 ml, 2000 ml)	Carl Roth GmbH, DE
Handschuhe, Nitril, Gr. S	Ansell, Yarra City, AUS
Kulturflaschen (T-25, T-75)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Messzylinder (250 ml, 500 ml)	Carl Roth GmbH, DE
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1250 µl)	Greiner Bio One, Kremsmünster, AUT
Safeguard™ Filter Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Schraubröhre (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Serologische Pipette, steril (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Uvette® (220 - 1600 nm)	Eppendorf, Hamburg, DE
Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well)	Sarstedt, Nümbrecht, DE

### 2.1.8 Auswertungsprogramme

**Tabelle 14: Auswertungsprogramme**

Name	Hersteller / Entwickler
Adobe Lightroom® 4.0	Adobe Inc., Kalifornien, USA
Axiovision Rel 4.7	Carl Zeiss, Jena, DE
Graphpad Prism Version 9.1.2	Graphpad Software Inc., USA
Image J	National Institutes of Health, USA
Image Studio™	Li-cor® Biosciences, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturhaltung

Zunächst erfolgte die Herstellung des Nährmediums der adhärenenten, exponentiell wachsenden HNSCC-Zellklone mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS). Beschriftete 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen

(T-25) wurden mit jeweils 5 ml Nährmedium gefüllt und mit ca.  $1,0 \times 10^5$  Zellen pro Flasche besät. Anschließend wurden die Zellklone bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit im Inkubator bis zur Verwendung im Rahmen von *in vitro* Experimenten oder Passagierung in Kultur gehalten. Bei der Bedeckung von 70-80% des Flaschenbodens mit Zellen konnte eine optimale Konfluenz beobachtet werden. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde zunächst das vorhandene Medium in den Kulturflaschen unter sterilen Bedingungen abgesaugt und der Zellrasen mit vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung (1x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS) gewaschen. Um die adhärenen Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen und in Suspension zu bringen, erfolgte die Zugabe von 1-2 ml Trypsin-EDTA-Lösung. Hierdurch kommt es zur Spaltung extrazellulärer Proteine durch Endopeptidasen im Trypsin. Nach einer 2-5-minütigen Inkubation bei 37° wurde das vollständige Ablösen der Zellen mikroskopisch beurteilt. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Nährmedium resuspendiert, quantifiziert und in verschiedener Verdünnung zur Fortsetzung der Kultivierung in neue Flaschen überführt.

Um bei zu dichtem Zellwachstum Kontaktinhibitionen mit konsekutiver Proliferationshemmung der Zellen zu vermeiden, wurden die Kulturen bei einer Konfluenz von >80% auf weitere Kulturflaschen aufgeteilt und subkultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte demnach ein bis zwei Mal wöchentlich.

### **2.2.2 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Zellzähler (Coulter Counter Z2™) der Firma Beckmann Coulter™. Nach dem Ablösen der kultivierten Zellen vom Flaschenboden, wurden die zu quantifizierenden Zellen mit 5 ml Nährmedium suspendiert und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Hieraus wurden 200 µl Zellsuspension pro Reaktionsgefäß entnommen und in ein spezielles 25 ml Zählgefäß pipettiert. Nach Zugabe von ca. 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Coulter ISOTON™ II Diluent) erfolgte die Aspiration der Zellsuspension durch den Zellzähler mit anschließender Angabe von Zellzahl, Zellkonzentration pro ml und Zellgrößenverteilungen. Da somit die Konzentration lebender Zellen pro ml in der Ausgangssuspension bekannt war, konnten je nach Bedarf entsprechende Verdünnungen angesetzt oder das Zellwachstum dokumentiert werden.

### 2.2.3 Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Ermittlung des Zellwachstums der HNSCC-Zellklone wurden für den Zeitraum von 10 Tagen pro Zellklon 14 (inkl. Doppelbestimmung) 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (T-25) je 1,0 x 10<sup>5</sup> Zellen in 5 ml Nährmedium ausgelegt. Die Zellzahl an Tag 1 wurde durch die initial ausgelegte Zellzahl von 1,0 x 10<sup>5</sup> Zellen definiert. Nach 24 h erfolgte die erste Zählung von zwei Zellkulturflaschen pro Zellklon. Hierfür wurde zunächst das Nährmedium unter sterilen Bedingungen abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin-EDTA-Lösung gelöst und die Zellzahl bestimmt. Dieses Prozedere erfolgte 5-mal bis zum 10. Tag. Alle Zellen befanden sich im gleichen Stadium der Passagierung.

Aus den ermittelten Zellzahlen wurde nach Berechnung der **Wachstumsrate  $\mu$**  der durchschnittliche Zeitraum, in dem eine Zellklon-Population ihre Zellzahl verdoppelt (**Verdopplungszeit  $t_d$** ), zwischen Tag 1 und Tag 10 mit folgenden Formeln kalkuliert:

$$\text{Wachstumsrate } \mu \text{ [h}^{-1}\text{]} = \frac{\ln (\text{Zellzahl zum Zeitpunkt } t_2 / \text{Zellzahl zum Zeitpunkt } t_1)}{\text{Zeitpunkt } t_2 \text{ [h]} - \text{Zeitpunkt } t_1 \text{ [h]}}$$
$$\text{Verdopplungszeit } t_d \text{ [h]} = \frac{\ln (2)}{\mu}$$

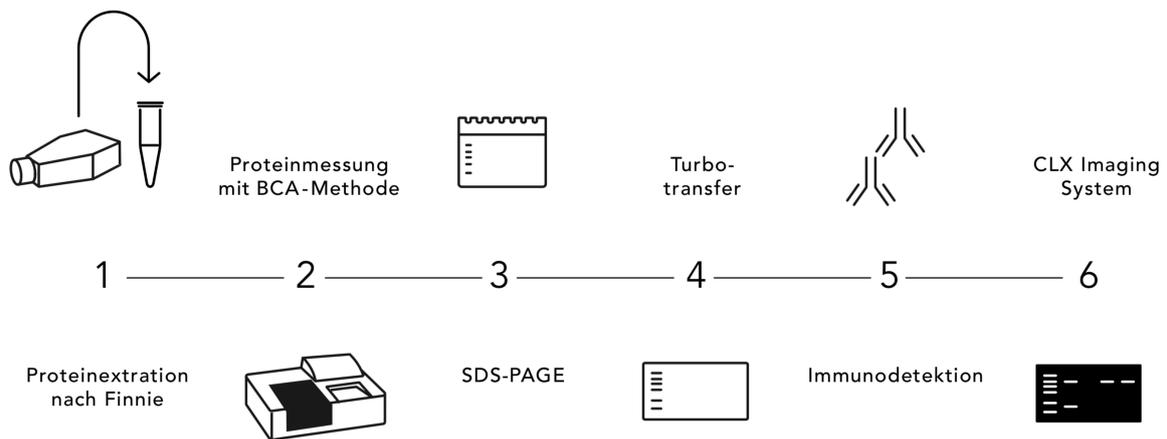
Die Verdopplungszeit  $t_d$  entspricht der Proliferationsrate der untersuchten Zellklone und wurde zum Vergleich des Wachstumsverhaltens der Wildtyp- und Knockout-Klone gegen- und untereinander verwendet.

### 2.2.4 Analyse der Proteinexpression von HR-Proteinen

Die Analyse der Expression von HR-Proteinen erfolgte mittels Western Blot. Diese molekularbiologische Methode ist eine der Bedeutsamsten zum Nachweis und der Quantifizierung von Zielproteinen sowie posttranslationalen Proteinmodifikationen (Mishra et al., 2017). Das mehrstufige Verfahren umfasst die Probenvorbereitung in Form eines Proteinextraktionsverfahrens aus den Zellen mit anschließender Messung der Proteinkonzentration mit der Bicinchoninsäure-Methode.

Hiernach folgt das Auftrennen der Proteine im elektrischen Feld nach Größe auf Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel durch Elektrophorese (SDS-PAGE) und

das Transferieren aufgetrennter Proteine auf eine feste Trägermembran, das sogenannte „Blotting“. Nach der Beschichtung der Membran mit spezifischen Antikörpern werden die zu detektierenden Proteine mit einem quantitativem Detektionssystem sichtbar gemacht, quantifiziert und analysiert. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte dieses Verfahrens näher beschrieben.



**Abbildung 2.2: Ablauf Western-Blot**

### Proteinextraktion nach Finnie

Für die Isolierung von Proteinen aus den Zellklonen wurde die Methode nach Finnie eingesetzt (Finnie et al., 1995). Nach Absaugung des Nährmediums, Waschen des Zellrasens mit PBS und Lösen der Zellen mit Trypsin wurden diese in 10 ml PBS mit 10% FCS in ein 15 ml Reaktionsgefäß aufgenommen und zur Prävention von Proteolyseprozessen auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min mit 1200 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde erneut mit 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das gewaschene Zellsediment mit 1 ml eiskaltem PBS versetzt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Das Zellgemisch wurde erneut auf gleiche Weise zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Volumen des Zellsediments wurde geschätzt (zwischen 20-80 µL) und im Verhältnis von 1:1 mit Lysepuffer (146 µl Puffer A, 10 µl PMSF und 100 µl Glycerol) versetzt und resuspendiert. Anschließend wurde das Zellgemisch abwechselnd für jeweils 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann für 1 min im 37 °C warmen Wasserbad aufgewärmt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Es folgte ein erneutes Zentrifugieren für 10 min bei 11.000 rpm und 4 °C und das

Abnehmen und Überführen des proteinhaltigen Überstands in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß. An dieser Stelle konnten die gesammelten Proben mit dem Proteinextrakt bei -80°C gelagert werden.

### **Proteinmessung mit Bicinchoninsäure-Methode**

Für das Quantifizierungsverfahren wurde die Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Methode) angewendet. Diese beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der zweiwertige Kupferionen durch Peptidbindungen reduziert werden und einen violetten Farbstoffkomplex mit der kolorimetrischen Reagenz Bicinchoninsäure (BCA) bilden, welcher Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert. Jene Absorption steigt im Messbereich zwischen 20 und 2.000 µg/ml mit der Proteinkonzentration linear an.

Zunächst wurden 2 µl der zuvor extrahierten Proteinmenge abgenommen und mit 48 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O versetzt. Als Kontrollprobe wurden anstelle des Proteinextraktes 2 µl Extraktionspuffer verwendet. Die Proben wurden mit 1 ml Farbreagenz versetzt, das zuvor aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz B angesetzt wurde. Die Proben wurden gemischt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung der Proben und Überführung in Küvetten wurde die Extinktion bei 562 nm innerhalb von 5-10 min im Photometer gemessen. Mithilfe der Eichreihe mit BSA-Verdünnungsreihen war eine Berechnung der Proteinkonzentration der Proben möglich.

### **SDS-PAGE und Western Blot**

Zur Vorbereitung der Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde das Tris-HCl-Polyacrylamid-Gradienten-Gel (4-15%) nach Entnahme des Kamms in destilliertem Wasser gespült und in die Gelkammer eingesetzt. Die Pufferreservoirs der Kammer wurden mit Laufpuffer aufgefüllt, die Geltaschen mehrmals gespült und Luftblasen am unteren Gelrand entfernt.

Anschließend wurden jeweils 40 µg Protein pro Zellklon mit 5x Laemmli-Puffer und bidestilliertem H<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 15 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach dem kurzen Anzentrifugieren der gut gemischten Proben wurden die Proteine für 5 min bei 100°C in einem Heizblock denaturiert und anschließend erneut für wenige Sekunden bei ca. 10.000 rpm zentrifugiert. Die gesamten Volumina der einzelnen Probengemische konnten nun in die Geltaschen pipettiert werden. Drei Geltaschen wurden mit Protein-Größenstandards beladen (Seebue™ Plus2 Pre-

Stained Protein Standard und Magicmark™ XP Western Protein Standard) und in alle restlichen Taschen wurde 5x Probenpuffer pipettiert (siehe Tabelle 15: Pipettierschema Western Blot). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Schale mit Eis für 10 min bei 100 V (Sammelphase) und für 85 min bei 200 V (Trennphase).

**Tabelle 15: Pipettierschema Western Blot**

<b>Probe</b>	<b>See <i>blue</i></b>	<b>WT 1</b>	<b>WT 2</b>	<b>WT 3</b>	<b>KO 1</b>	<b>KO 2</b>	<b>KO 3</b>	<b><i>Magic mark</i></b>	<b>See <i>blue</i></b>
<b>Proteinmenge (in µl)</b>	5,0	4,0	4,1	4,5	6,2	5,8	7,5	3,0	5,0
<b>5x Laemmli (in µl)</b>	-	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	-
<b>Bidest. H<sub>2</sub>O (in µl)</b>	-	8,0	7,9	7,5	5,8	6,2	4,5	9,0	-

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran zu transferieren, wurde das Trans-Blot-Turbo-Transfer-System (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Hierbei wird senkrecht zum Polyacrylamid-Gel ein elektrisches Feld angelegt, wodurch ein Elektrotransfer der Proteine vom Gel auf die Trägermembran generiert wird. Zunächst wurden die zugehörigen Kassetten mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O gespült und die Trägermembran kurz in Methanol eingelegt, um dessen hydrophobe Eigenschaften zu reduzieren. Anschließend wurden zwei Filterpapiere, die Membran und das Gel einzeln in 5x-Transblot-Puffer gewaschen und das erste Filterpapier auf dem Boden einer Kassette ausgerollt. Überschüssige Pufferlösung wurde abgossen. Als nächstes wurde die Membran auf dem Filterpapier ausgerollt und das Gel auf dem Filter platziert. Danach folgte erneut eine Filterschicht. Nach erneutem Ausrollen der Flüssigkeit wurde die Kassette in das elektronische Transfer-System eingesetzt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran kurz mit 1x TBS gewaschen und zur Sättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen auf der Trägermembran mind. eine Stunde bei 4 °C in Blockierungslösung (10x TBS mit 5% BSA) blockiert.

Zur Detektion der transferierten Proteine erfolgte über Nacht die Inkubation mit dem in Blockierlösung angesetzten Erstantikörper unter Schwenken bei 4 °C (siehe Tabelle 8). Hiernach wurde die Membran mehrmals 10 min mit 1x TBS-T gewaschen, bevor die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde unter Schwenken bei

Raumtemperatur folgte (siehe Tabelle 10). Nach erneuten, analogen Waschvorgängen wurden die Proteine mit dem Odyssey® CLX Imaging System detektiert und mit dem Image Studio™ quantifiziert. Das Hintergrundrauschen wurde von der Software automatisch herausgerechnet und schließlich ein quantifiziertes Proteinsignal ausgegeben.

Die Ermittlung der Proteinexpression erfolgte mithilfe einer Ladekontrolle (HSC70). Hierdurch konnte die absolute Proteinmenge bestimmt werden, indem man die quantifizierten Proteinmengen auf das Proteinsignal der Ladekontrolle normalisierte.

$$\text{Absolute Proteinmenge} = \frac{\text{Quantifiziertes Proteinsignal}}{\text{Quantifiziertes HSC70 Signal}}$$

### 2.2.5 Erzeugung von DNA-Schäden

#### PARP1-Inhibition mit Olaparib

Die Poly (ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) ist ein Enzym, welches eine zentrale Rolle für die Reparatur von SSBs spielt. Olaparib hemmt die SSB Reparatur, indem es die Dissoziation von PARP1 von der Replikationsgabel verhindert und somit die Bindungsstellen für Basenexzisionsreparatur-Enzyme (BER) blockiert (Bochum et al., 2018). Durch die Kollision von Replikationsgabeln mit SSBs entstehen nun ein-endige DSBs, welche über die HR repariert werden. Bei HR-Defekten können PARP1-Inhibitoren hier den Effekt einer synthetischen Letalität erzielen (Bochum et al., 2018). Für die Zubereitung der Stammlösung (10 mM) wurden 5 mg Olaparib mit 1,15 ml DMSO versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Im Rahmen der Experimente wurde die Stammlösung 1:1000 mit DMSO verdünnt (100 µM).

#### CHK1-Inhibition mit MK8776

MK8776 ist ein spezifischer Inhibitor der Intra-S-Phase Kinase CHK1. Das Mediatorprotein der DNA-Schadensantwort CHK1 aktiviert Zellzyklus-Checkpoints in der S-Phase, stabilisiert Replikationsgabeln und fördert Reparaturwege wie die HR (Schulz et al., 2019; Sørensen et al., 2005). Dementsprechend kann der Inhibitor die zelluläre DNA-Reparaturkapazität einschränken. Die Stammlösung des Inhibitors (2 mM) wurde mit 5 mg MK8776 in 5,7 ml DMSO hergestellt und anschließend für die Versuche 1:10 in DMSO verdünnt.

### **Ionisierende Strahlung**

Die biologische Wirkung ionisierender Strahlen resultiert in DNA-Schäden, welche man sich therapeutisch zu Nutze machen kann. 1 Gy ionisierende Strahlung induziert bis zu 4000 DNA-Basenschäden, 1000 SSBs und bis zu 40 DSBs (Borrego-Soto et al., 2015). Die Bestrahlung erfolgte mit einer technischen Gulmay-Medical-Röntgenröhre (RS225) bei einem Röhrenstrom von 15 mA, einer Röhrenspannung von 200 kV und bei ca. 24°C. Zur Aufhärtung der Strahlen wurde ein 0,5 mm starker Kupferfilter und ein 0,8 mm starker Berylliumfilter verwendet. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit bei einem Tischabstand von 266 mm zur Strahlungsquelle und einer Dosisrate von 2 Gy/min. Im Rahmen der  $\gamma$ -H2AX- und RPA-Immunfluoreszenz-Assays sowie der radiobiologischen Koloniebildungsassays wurden die Zellklone entsprechend der Dosisleistung und gewünschter Strahlendosis 1-4 min bestrahlt.

### **2.2.6 Analyse des zellulären Überlebens im Koloniebildungstest**

#### **Behandlung, Fixierung und Färbung**

Mit dem Koloniebildungstest wurde das klonogene Überleben der Zellen nach verschiedenen DNA-Schädigungen ermittelt. Die DNA-Schädigungen erfolgten mittels ionisierender Bestrahlung und paralleler PARP1-Inhibition mit Olaparib oder MK8776. Als Kontrollen dienten gänzlich unbehandelte Zellen und Zellen mit ionisierender Bestrahlung ohne parallele Beimpfung. Zunächst wurden 250-500 Zellen in jeweils eine Vertiefung der 6-Well Zellkulturplatten in je 1,5 ml Nährmedium ausgelegt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Beimpfung der Hälfte der Zellkulturplatten mit 1  $\mu$ M Olaparib aus einer zuvor erstellten 100  $\mu$ M Stocklösung (1:1000, 10 nM Stocklösung in DMSO) oder 2,5  $\mu$ M MK8776 (1:10, 2 nM Stocklösung in DMSO). Nach zweistündiger Inkubation erfolgte die ionisierende Bestrahlung mit 2, 4 oder 6 Gy und eine erneute Inkubation. Nach 72 Stunden wurden die unbehandelten und behandelten Zellkulturplatten aus dem Brutschrank entnommen, das alte Nährmedium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gespült und erneut mit 1,5 ml frischem Nährmedium versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 10-15 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich aus den überlebenden Zellen Kolonien auf dem Boden der Kulturplatten. Das Wachstum der Zellkolonien wurde ca. alle 3 Tage mikroskopisch kontrolliert. Nach 10-15 Tagen wurde das Nährmedium verworfen und die Zellen auf dem Boden der Zellkulturplatten für ca. 5 min mit 70%-igem Ethanol

fixiert und einige Stunden getrocknet. Anschließend erfolgte die Färbung mit 0,1%-igem Kristallviolett für ca. 5 min. Das Kristallviolett wurde dann abpipettiert, überschüssige Kristallviolett-Reste mit Leitungswasser vorsichtig abgewaschen und die Zellkulturplatten erneut getrocknet.

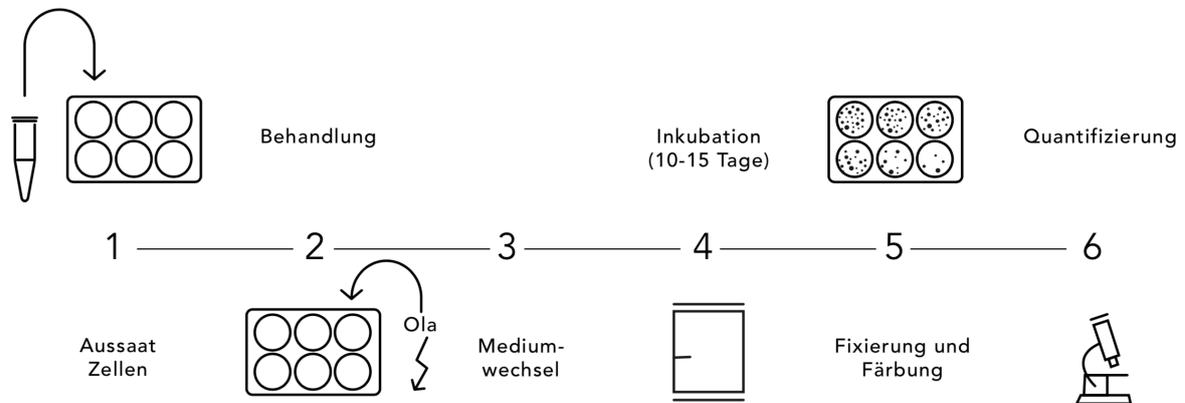


Abbildung 2.3: Ablauf Koloniebildungstest

### Quantitative Auswertung des Zellüberlebens

Die Koloniebildung wurde mithilfe eines Lampentisches und mikroskopisch per Auge analysiert. Hierbei wurden Kolonien, die mehr als 50 Zellen enthielten, quantifiziert. Um die Koloniebildungsfähigkeit bei unterschiedlichen Behandlungspunkten auszuwerten, wurde die Angehrate (Plattierungseffizienz oder Klonogenität, *plating-efficiency*, PE) der Zellen bestimmt.

$$\text{Plattierungseffizienz (PE)} = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Gesäte Zellzahl}}$$

Um nun das Überleben (*surviving-fraction*, SF) der Zellklone zu bestimmen, wurde die Plattierungseffizienz auf die unbehandelte Kontrolle normiert (Unkel et al., 2016).

$$\text{Überleben (SF)} = \frac{\text{Plattierungseffizienz (PE)}}{\text{Plattierungseffizienz (PE) unbehandelter Zellen}}$$

## **2.2.7 Nachweis von $\gamma$ -H2AX- und RPA Foci mit Immunfluoreszenz**

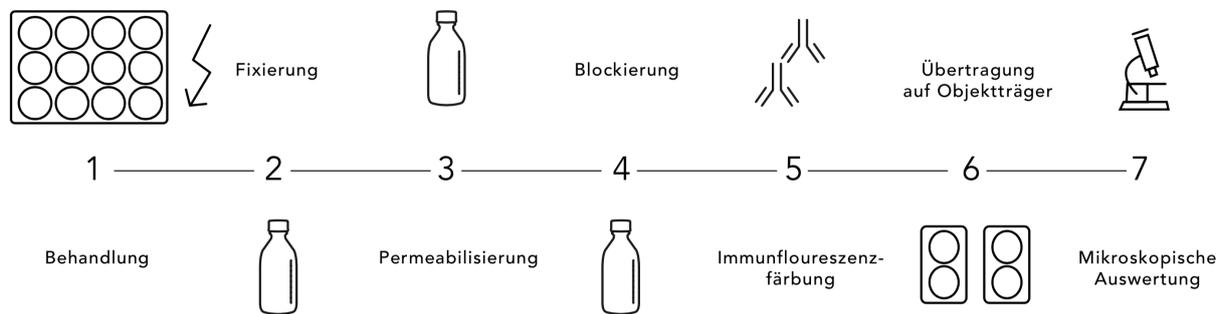
### **Behandlung, Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung**

Mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung können strahlungsinduzierte DSBs der DNA visualisiert und quantifiziert werden. Hierfür wurden in 12-Well Zellkulturplatten je 1 x 10<sup>5</sup> Zellen auf den in den Vertiefungen platzierten Deckgläschen ( $\varnothing$  15 mm) in 1 ml Medium bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturplatten mit 2 und 4 Gy bestrahlt und für weitere 24h inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 x PBS vorsichtig gewaschen. Die Fixierung erfolgte 15 min bei Raumtemperatur mit 2%-iger Formaldehyd-Lösung in 1x PBS und anschließenden je 10-minütigen Waschschritten mit 1x PBS. Nach Abpipettieren des Fixierungspuffers erfolgte die Permeabilisierung mit 1% BSA + 0,2% TritonX-100 in 1x PBS für ca. 10 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Abpipettieren wurden die Zellen mit Blockierungslösung (3% BSA in 1x PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend wurden die Deckgläschen aus den Vertiefungen der Platten mit der Zellseite nach unten auf gespannte Parafilm-Folie platziert und mit 50  $\mu$ l Antikörperlösung mit  $\gamma$ H2AX (Maus IgG, 1:500) und RPA (Maus IgG, 1:600) in Waschlösung 1 (1% BSA + 0,5% Tween 20 in 1x PBS) pro Deckgläschen für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Durch dreimaliges 10-minütiges Waschen mit Waschlösung 1 auf dem Schüttler wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Hiernach folgte die einstündige Inkubation auf gleiche Weise mit dem sekundären Antikörper (1:1000 Alexa Fluor® 488 und 1:1000 Alexa Fluor® 594 in Waschlösung 1) und DAPI-Lösung (1:1000) im Dunkeln in einer feuchten Kammer. Überschüssiger Zweitantikörper wurde durch viermaliges 10-minütiges Waschen mit PBS-T entfernt. Anschließend wurden die Deckgläschen auf je einen kleinen Tropfen Vectashield® Mounting Medium auf Objektträger platziert, mit einem Trockenblock die Feuchtigkeit reduziert, mit Nagellack versiegelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

### **Mikroskopische Auswertung**

Die fokalen Färbungen von  $\gamma$ H2AX und RPA wurden am Fluoreszenzmikroskop (Axiovision Observer Z1, Zeiss) mithilfe der Software Axiovision Rel. 4.7 visualisiert und quantitativ analysiert. Anhand der am Mikroskop erstellten Fotos wurden pro

Zellklon-Probe mindestens 100 intakte Zellkerne bei 1000-facher Vergrößerung per Auge ausgewertet und anschließend graphisch dargestellt.



**Abbildung 2.4: Ablauf Nachweis von Reparatur-Foci mittels Immunfluoreszenz**

### 2.2.8 Statistik und Auswertung

Die statistischen Analysen und graphischen Darstellungen gewonnener Daten erfolgten mit Graphpad Prism (Version 9.1.2). Die P-Werte wurden auf Basis des ungepaarten Student's t-Tests ermittelt (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bedeutung von Oct4 A für zelluläre Eigenschaften der UTSCC5-Klone

##### 3.1.1 Einfluss von Oct4 A auf die Proliferation

Da Oct4 A als Tumorstammzelltranskriptionsfaktor neben der potenziellen Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen das Zellwachstum und die Zellproliferation reguliert (Ruan et al., 2019) und Wachstumsverzögerungen im Zusammenhang mit HR-Defizienz stehen könnten (Y. Zhou et al., 2018), wurde überprüft, ob die Oct4 A Depletion einen Einfluss auf das *in vitro* Proliferationsverhalten der Zellklone hat. Hierfür wurden Wachstumskurven von unbehandelten Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen erstellt und anschließend aus zugrunde liegenden Daten die Proliferationsraten in Form der Verdopplungszeit in Stunden berechnet.

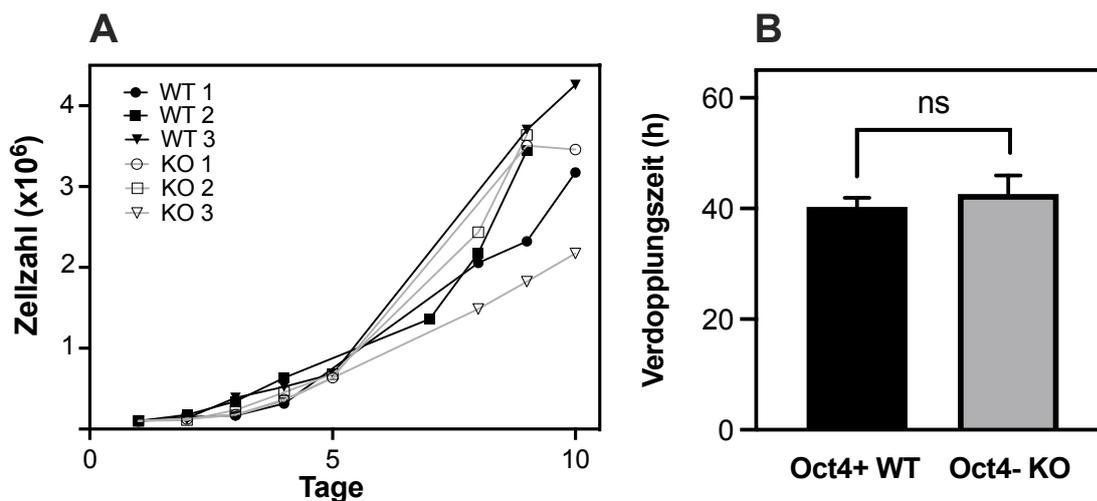


Tabelle 16: Verdopplungszeit von Oct4 A WT- und KO-Klonen

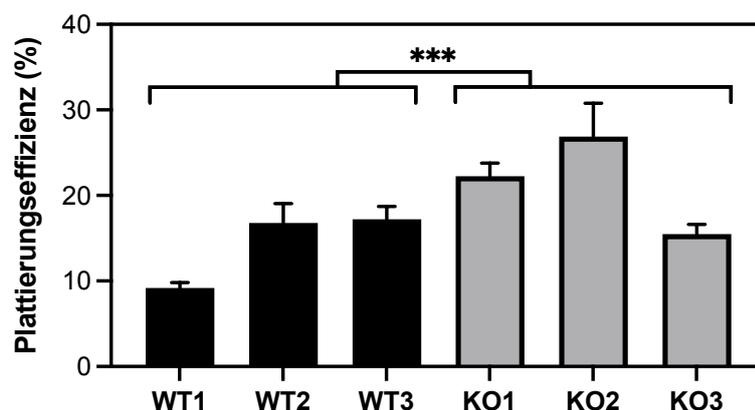
Oct4 A Wildtyp-Klone	WT 1	WT 2	WT 3
Verdopplungszeit [h]	43,29	37,60	39,91
Oct4 A Knockout-Klone	KO 1	KO 2	KO 3
Verdopplungszeit [h]	42,25	37,07	48,63

**Abbildung 3.1: Wachstumskurven von Oct4 A WT- und KO-Klonen.** (A) Wachstumskurven der Zellklone. Es wurden  $1,0 \times 10^5$  Zellen ausgelegt und an bis zu 10 aufeinanderfolgenden Tagen die Zellzahl bestimmt. (B) Die Verdopplungszeit in Stunden (h) der zusammengefassten WT- (schwarz) und KO-Klone (grau) ist aus zwei unabhängigen Einfachbestimmungen  $\pm$  SEM sowohl graphisch als auch tabellarisch dargestellt und statistisch mittels ungepaartem Student's t-Test analysiert.

Abb. 3.1 zeigt das Wachstumsverhalten aller UTSCC5-Zellkone mit einer Inkubationszeit von 9 bzw. 10 Tagen in graphischer (Abb. 3.1 A, B) und tabellarischer Form. Alle Klone wiesen einen insgesamt ähnlichen Wachstumsverlauf auf: zu beobachten war eine anfängliche Anlaufphase, die sogenannte „lag-Phase“ (Assanga & Luján, 2013), bis zum 4. Inkubationstag mit anschließender logarithmischer Wachstumsphase bis zum 9. bzw. 10. Tag. Zellklon KO1 trat bereits am 9. Inkubationstag in die stationäre Phase des Zellwachstums ein (Assanga & Luján, 2013). Die Verdopplungszeiten der Wildtyp-Klone betragen 43,29 h für WT1; 37,60 h für WT2; 39,91 h für WT3 (Mittelwert (MW): 40,27 h) und die der Knockout-Klone 42,25 h für KO1; 37,07 h für KO2 und 48,63 h für KO3 (MW: 42,65 h). Zusammenfassend konnten keine signifikanten Unterschiede der *in vitro* Proliferationsraten zwischen Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen beobachtet werden (p-Wert: 0,5575).

### 3.1.2 Einfluss von Oct4 A auf die Klonogenität

Zur weiteren Charakterisierung unbehandelter Zellklone wurde der Einfluss eines Oct4 A Knockouts auf die Angehrate (Plattierungseffizienz PE, Klonogenität) mittels Koloniebildungstests beobachtet. Die Bestimmung der Klonogenität ist eine Methode, um das zelluläre Überleben reproduktiver Zellen *in vitro* zu quantifizieren und so ihr proliferatives Potential beurteilen zu können (Brix et al., 2020; Wadkin et al., 2019). Außerdem liefert die Bestimmung der Angehrate Hinweise auf mögliche Unterschiede im TSZ-Phänotyp (Lagadec et al., 2012).

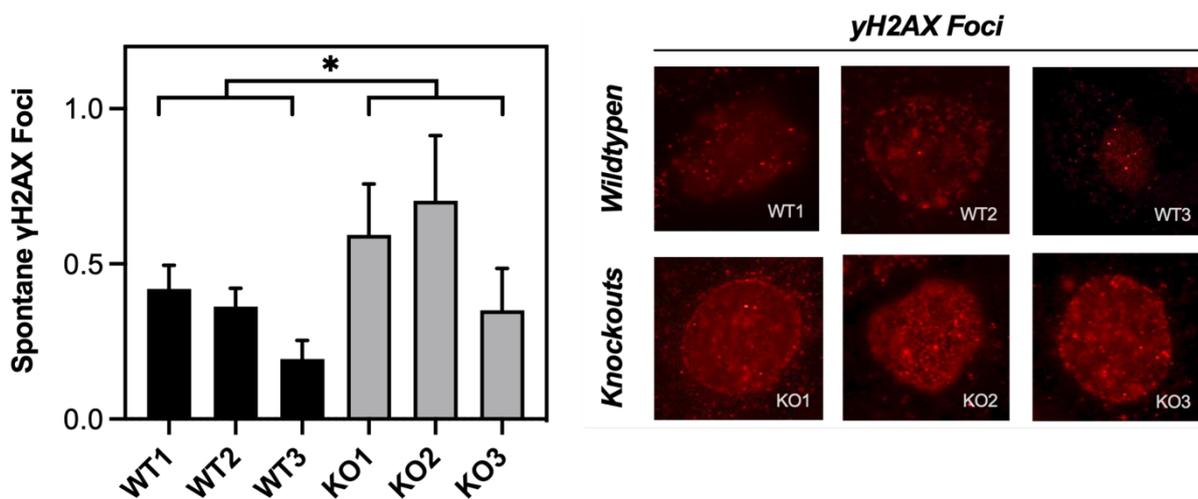


**Abbildung 3.2: Klonogenität von Oct4 A WT- und KO-Klonen.** Die Plattierungseffizienz (%) der Oct4 A WT- (schwarz) und KO-Klone (grau) wurde im Koloniebildungstest ermittelt. Es wurden 250-500 Zellen ausgelegt, nach 10-15 Tagen fixiert, gefärbt und Anzahl der Kolonien bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Sechsfachbestimmungen  $\pm$  SEM. Statistisch signifikant: \*\*\*  $p < 0,001$  (ungepaarter Student's t-Test).

Abb. 3.2 zeigt die einzelnen Angehraten der Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klone. Die Plattierungseffizienzen aller Zellklone streuten zwischen 5,0 % (bei WT1) und 49,5 % (bei KO2). Die Mittelwerte betrugen bei den Wildtyp-Klonen 14,58 % und bei den Oct4 A Knockout-Klonen 22,05 %. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Oct4 A Knockout-Klone insgesamt mit einer Differenz von  $7,468 \pm 1,988$  eine signifikant höhere Angehraten aufwiesen als die Wildtyp-Klone (p-Wert: 0,0003).

### 3.1.3 Einfluss von Oct4 A auf die Entstehung endogener DNA-Schäden

Da die HR bereits durch endogene DNA-Schäden aktiviert werden kann (Tubbs & Nussenzweig, 2017), wurden spontane DNA-Doppelstrangbrüche unbehandelter Zellklone mittels fluoreszenzgefärbten  $\gamma$ H2AX-Foci quantifiziert und zwischen den Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen verglichen.



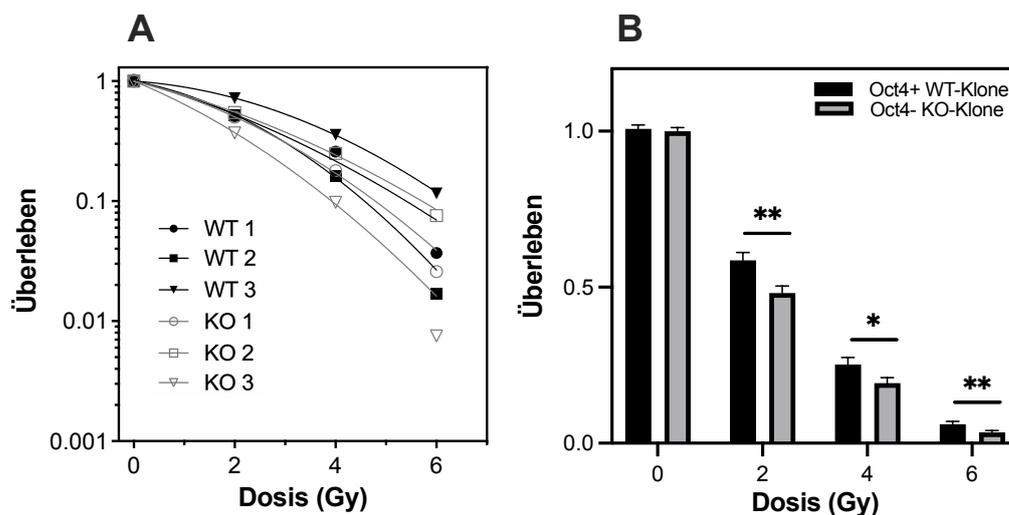
**Abbildung 3.3: Höhere Anzahl endogener  $\gamma$ H2AX-Foci in Oct4 A KO-Zellen.** Exponentiell wachsende WT- (schwarz) und KO-Klone (grau) wurden nach einer Inkubationszeit von 36 h immunzytochemisch mit entsprechenden Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern gefärbt. Dargestellt ist die Quantifizierung spontaner  $\gamma$ H2AX-Foci einer Zelle eines Experimentes. Fehler sind Mittelwerte + SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: \*  $p < 0,05$  (Student's t-Test). Rechts: exemplarische Bilder der  $\gamma$ H2AX-Foci Immunfluoreszenzaufnahmen.

Abb. 3.3 zeigt die spontanen  $\gamma$ H2AX-Foci der einzelnen unbehandelten Klone mit beispielhaften Immunfluoreszenzaufnahmen. Im Vergleich der Zellklone zeigten KO2 (MW: 0,70) und KO1 (MW: 0,60) die höchste Anzahl spontaner  $\gamma$ H2AX-Foci, gefolgt von WT1 (MW: 0,42); WT2 (MW: 0,36) und KO3 (MW: 0,35). Zellklon WT3 (MW: 0,19) wies mit der geringsten  $\gamma$ H2AX-Foci Anzahl die wenigsten spontanen DNA-

Doppelstrangbrüche auf. Zusammenfassend war die Anzahl spontaner  $\gamma$ H2AX-Foci bei den Oct4 A Knockout-Klonen (MW:0,55) signifikant höher im Vergleich zu den Wildtyp-Klonen (MW: 0,33) mit  $0,2171 \pm 0,1022$  (p-Wert: 0,0341).

### 3.1.4 Einfluss von Oct4 A auf die Radiosensitivität

Oct4 A trägt über verschiedene molekulare Mechanismen zu Strahlenresistenz und Tumorprogression bei (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021; Schulz et al., 2019). Um zu überprüfen, ob der in der UTSCC5-Zelllinie vermehrt exprimierte Tumorstammzelltranskriptionsfaktor Oct4 A Auswirkungen auf die Radiosensitivität hat, wurde das zelluläre Überleben in Koloniebildungstests nach verschiedenen Bestrahlungsdosen (2, 4 und 6 Gy) analysiert. Als Vergleichsgruppe dienten Zellen mit einem Oct4 A Knockout.



**Abbildung 3.4: Erhöhte Strahlensensitivität in Oct4 A KO-Klonen.** Die Zellen der WT- (schwarz) und KO-Klone (grau) wurden ausplattiert, bestrahlt (2,4 und 6 Gy), fixiert, gefärbt und nach 10-15 Tagen die Kolonien quantifiziert. **(A)** Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Strahlendosis der Zellklone. **(B)** Vergleich der Radiosensitivität von zusammengefassten WT- und KO-Klonen mittels ungepaartem Student's t-Test. Es handelt sich um Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM. Zur Normierung dienten die unbehandelten Kontrollen. Statistisch signifikante Abweichungen: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Abb. 3.4 stellt das zelluläre Überleben aller UTSCC5-Klone (A) und den direkten Vergleich der Strahlenempfindlichkeit von Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen dar (B). Aus Abb. 3.4 A werden heterogene Strahlenempfindlichkeiten der Zellklone ersichtlich: der strahlenresistenteste Klon war WT3 (MW SF6: 0,12), gefolgt von KO2

(MW SF6: 0,10), WT1 (MW SF6: 0,05), KO1 (MW SF6: 0,03), WT2 (MW SF6: 0,02) und dem strahlenempfindlichsten Klon KO3 (MW SF6: 0,01). Abb. 3.4 B verdeutlicht die signifikanten Unterschiede der Strahlensensibilität bei ansteigender Strahlendosis (2, 4 und 6 Gy) zwischen zusammengefassten Überlebensraten (SF) von Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen. Bei allen drei Strahlendosen waren Wildtypen strahlenresistenter als die Knockout-Klone: WT MW SF2: 0,59 > KO MW SF2: 0,48 (p-Wert: 0,0028); WT MW SF4: 0,25 > KO MW SF4: 0,19 (p-Wert: 0,0385) und WT MW SF6: 0,07 > KO MW SF6: 0,02 (p-Wert: 0,0150). Zusammenfassend ist zu beobachten, dass trotz Heterogenität innerhalb der Wildtyp- und Knockout-Klongruppen die Knockout-Klone insgesamt eine signifikant höhere Strahlensensitivität aufwiesen als Wildtyp-Klone.

### 3.1.5 Zusammenfassung 1

Um erste Hinweise für regulatorische Funktionen des Transkriptionsfaktors Oct4 A in TSZ des HNSCC zu erlangen, wurden zunächst grundlegende Charakteristika von Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen untersucht. Hierfür erfolgte die Analyse des Proliferationsverhaltens, der Klonogenität, der Strahlensensibilität und endogener DNA-Schädigung in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen ( $\gamma$ H2AX).

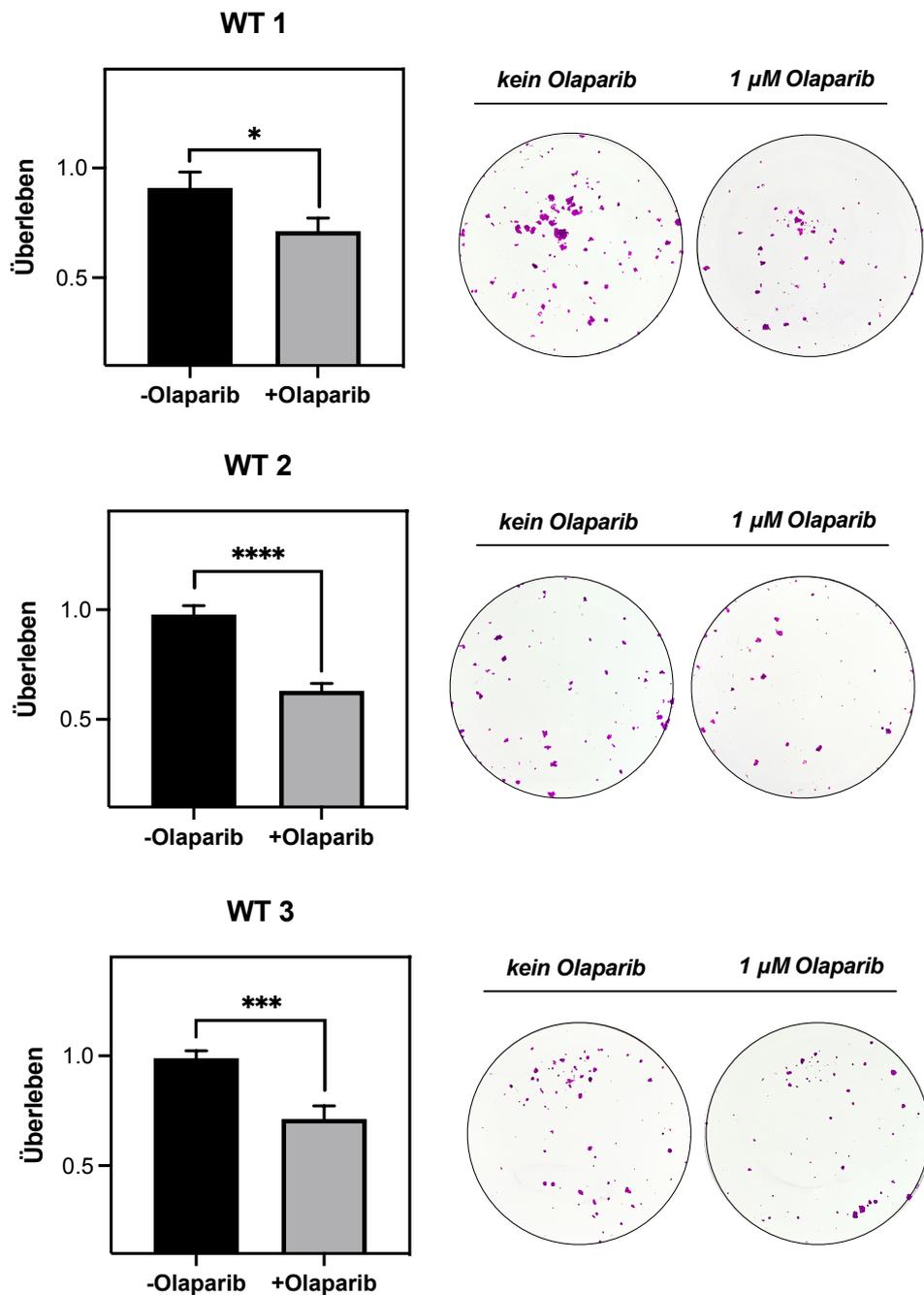
Die *in vitro* Proliferationsraten der Klongruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede (p-Wert: 0,5575), jedoch wiesen die Oct4 A Knockout-Klone eine signifikant höhere Angehrate auf (p-Wert: 0,0003). Weiterhin wurden Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit sowohl innerhalb der Klongruppen als auch zwischen den Wildtyp- und Knockout-Klonen beobachtet. Die Gruppe der Knockout-Klone zeigte insgesamt eine signifikant höhere Radiosensitivität (p-Werte: 0,0028; 0,0385; 0,0150). Die endogene DNA-Schädigung hinsichtlich spontaner  $\gamma$ H2AX-Foci unterschied sich ebenfalls: Knockout-Klone zeigten insgesamt signifikant mehr Foci als Wildtyp-Klone (p-Wert: 0,0341).

Auf der Basis gewonnener Erkenntnisse galt es, die HR-Kapazität beider Klongruppen auf verschiedenen Versuchsebenen zu analysieren.

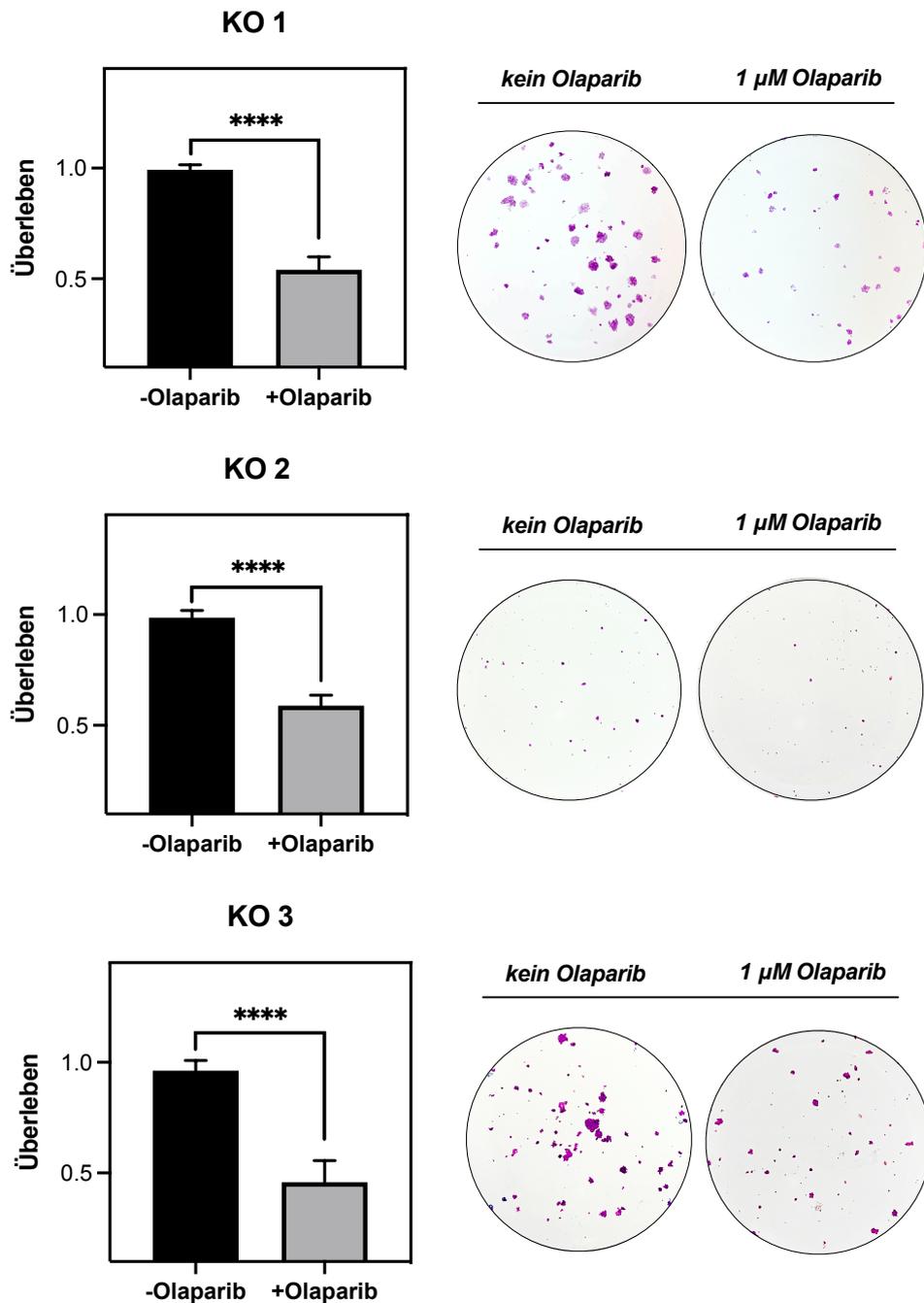
### 3.2 Einfluss von Oct4 A auf die HR in UTSCC5-Klonen

#### 3.2.1 Zelluläres Überleben nach PARP1-Inhibition

Um eine bereits ohne exogene Schädigung potenziell gesteigerte DNA-Schadensantwort in Oct4-Klonen zu evaluieren, wurden Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klone mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib (1  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurden das Wachstum im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen mittels Koloniebildungstests untersucht.



**Abbildung 3.5: Vermindert zelluläres Überleben nach PARP1-Inhibition in Oct4 A WT-Klonen.** Bestimmung des zellulären Überlebens mittels Koloniebildungstests. Es wurden 250-500 Zellen ausplattiert, nach 24 h für 72 h mit 1  $\mu\text{M}$  Olaparib behandelt (grau) und nach 10-15 fixiert, gefärbt und quantifiziert. Unbehandelte Klone dienten als normierende Kontrollen (schwarz). Die Darstellung erfolgte aus Mittelwerten der sechs-fach Bestimmungen dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (ungepaarter Student's t-Test). Rechts: Exemplarische Bilder fixierter und gefärbter Kolonien auf 6-Well-Platten mit und ohne 1  $\mu\text{M}$  Olaparib.

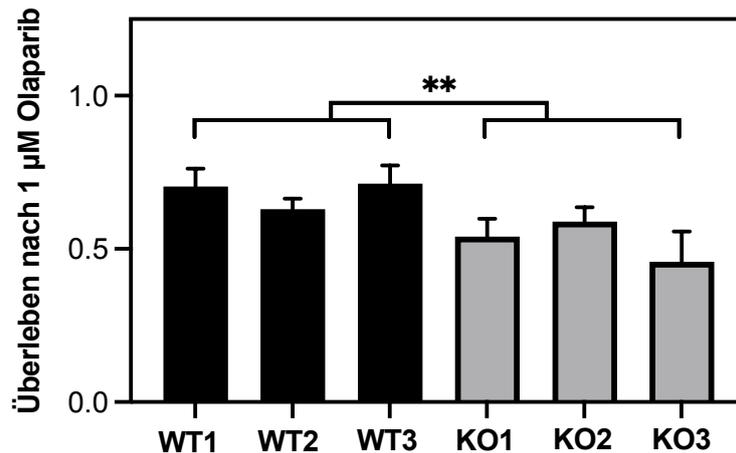


### **Abbildung 3.6: Vermindert zelluläres Überleben nach PARP1-Inhibition in Oct4 A KO-Klonen.**

Die Beobachtung des zellulären Überlebens nach Behandlung erfolgte mittels Koloniebildungstests. Es wurden 250 Zellen ausplattiert und nach 24 h für 72 h mit 1  $\mu\text{M}$  Olaparib behandelt (grau). Nach 10-15 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien fixiert, gefärbt und quantifiziert. Unbehandelte Klone dienten als normierende Kontrollen (schwarz). Die Darstellung erfolgte aus Mittelwerten der sechs-fach Bestimmungen dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (ungepaarter Student's t-Test). Rechts: Exemplarische Bilder fixierter und gefärbter Kolonien auf 6-Well-Platten mit und ohne Olaparib.

Abb. 3.5 zeigt das Wachstum der drei Oct4 A Wildtyp-Klone nach der Behandlung mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib (1  $\mu\text{M}$ ). Unbehandelte Klone dienten hierbei als Kontrollen. Sowohl bei Klon WT1, WT2 als auch WT3 konnten signifikante Unterschiede im zellulären Überleben nach Olaparib-Behandlung beobachtet werden: WT2 zeigte die signifikanteste Reduktion der Klonogenität nach Behandlung mit einer PE von  $0,63 \pm 0,03$  ( $p$ -Wert:  $< 0,0001$ ), gefolgt von WT3 mit einer PE von  $0,71 \pm 0,06$  ( $p$ -Wert:  $0,0006$ ) und WT1 mit der PE von  $0,70 \pm 0,06$  ( $p$ -Wert:  $0,0344$ ). Die exemplarischen Bilder der fixierten und anschließend gefärbten Zellkolonien unterstützen diese Ergebnisse mit sichtbarer Reduktion der Kolonieanzahlen nach PARP1-Inhibition in allen Wildtyp-Klonen. Zusammenfassend zeigten alle drei Oct4 A Wildtyp-Klone eine signifikante Reduktion des zellulären Überlebens nach Olaparib-Behandlung.

Abb. 3.6 zeigt die Klonogenität der Oct4 A Knockout-Klone nach der Behandlung mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib (1  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Auch die Knockout-Klone zeigten eine signifikante Reduktion der Klonogenität nach PARP1-Inhibition: KO3 erwies sich als Olaparib-sensitivster Klon mit einer PE von  $0,46 \pm 0,01$  ( $p$ -Wert:  $< 0,0001$ ). KO1 zeigte eine signifikant reduzierte PE von  $0,54 \pm 0,06$  ( $p$ -Wert:  $< 0,0001$ ) und KO2 eine PE von  $0,59 \pm 0,05$  ( $p$ -Wert:  $< 0,0001$ ). Die Fotos der exemplarischen Koloniebildungstests deuten unterstützend auf die statistisch signifikante Olaparib-Sensitivität der Knockout-Klone hin. Zusammenfassend zeigten alle drei Oct4 A Knockout-Klone eine signifikante Reduktion des Wachstums im Koloniebildungstest nach PARP1-Inhibition mit Olaparib.

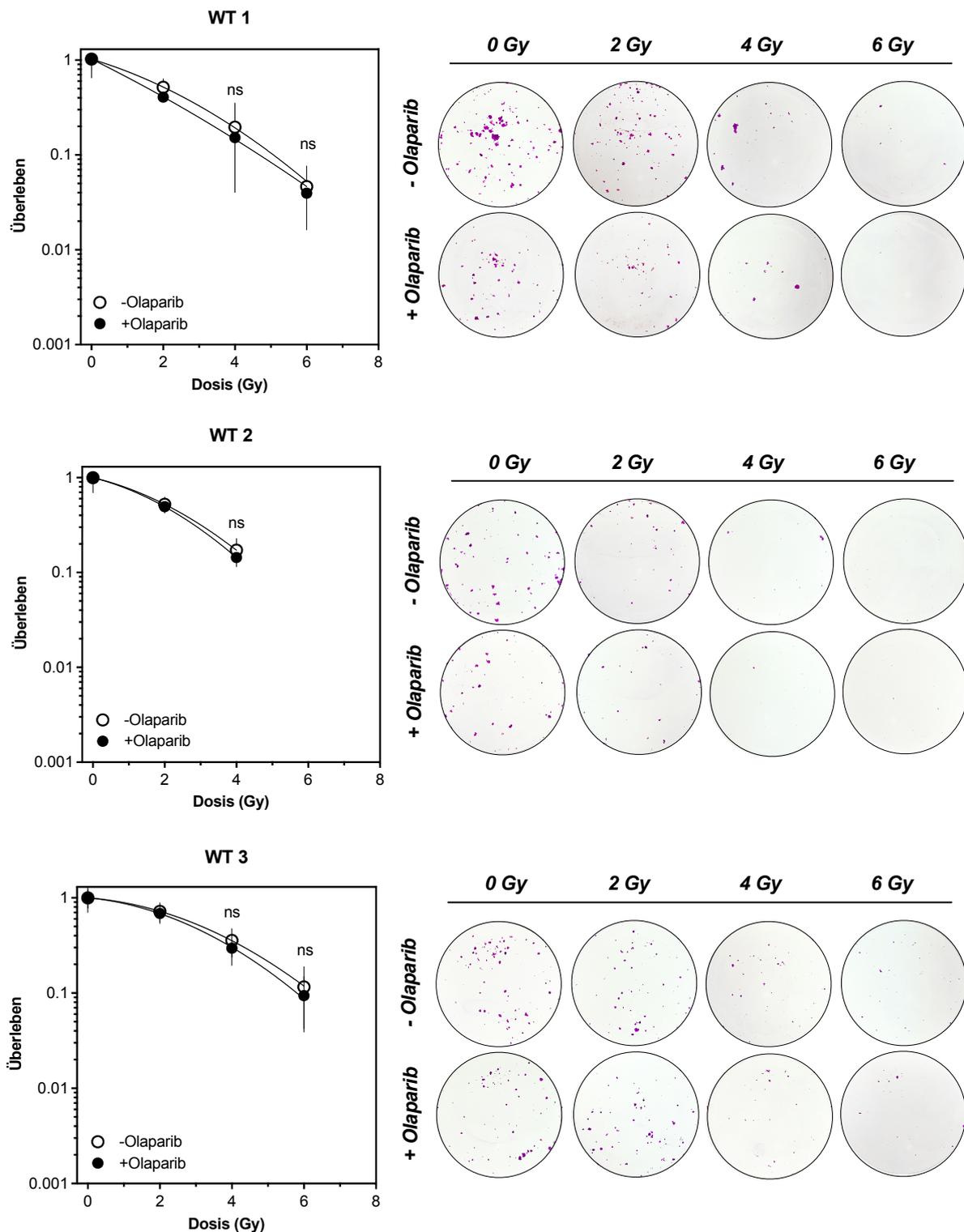


**Abbildung 3.7: Stärkere Verminderung des zellulären Überlebens in Oct4 A KO-Klonen nach PARP1-Inhibition.** Die Zellen der WT- (schwarz) und KO-Klone (grau) wurden ausplattiert, mit 1 µM Olaparib behandelt und nach 10-15 Tagen fixiert, gefärbt und quantifiziert. Unbehandelte Klone dienen als normierende Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte aus sechs-fach Bestimmungen dreier unabhängiger Experimente ± SEM. Für die statistische Analyse wurden die WT- und KO-Klone zusammengefasst. Statistisch signifikante Abweichungen: \*\* p < 0,01 (Student's t-Test)

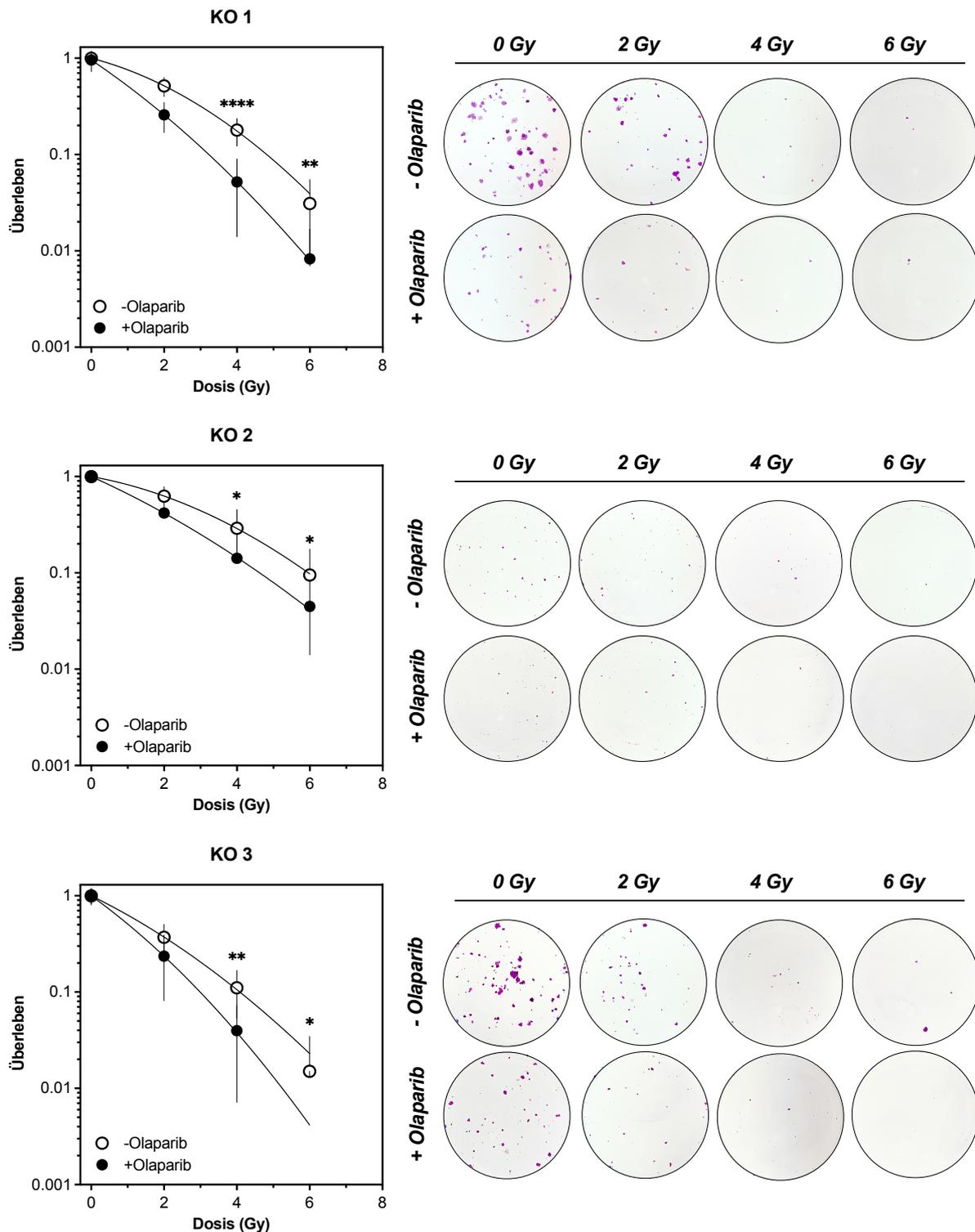
Um die Sensitivität der beiden Klengruppen zu vergleichen, wurde die Koloniebildungsfähigkeit nach Olaparib-Behandlung von Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen zusammen in der Abb. 3.7 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass alle drei Knockout-Klone ein deutlich geringeres Wachstum (PE KO1:  $0,54 \pm 0,06$ ; PE KO2  $0,59 \pm 0,05$ ; PE KO3  $0,46 \pm 0,01$ ) aufwiesen als die Wildtyp-Klone (PE WT1  $0,70 \pm 0,06$ ; PE WT2  $0,63 \pm 0,03$ ; PE WT3  $0,71 \pm 0,06$ ). Zusammenfassend lässt sich beobachten, dass Oct4 A Knockout-Klone deutlich sensibler auf PARP1-Inhibition reagierten (MW PE KO1-3:  $0,55 \pm 0,04$ ) als Oct4 A Wildtyp-Klone (MW PE WT1-3:  $0,68 \pm 0,03$ ) (p-Wert: 0,0040).

### 3.2.2 Einfluss PARP1-Inhibition auf die Radiosensitivität

Die erhöhte Empfindlichkeit nach PARP1-Inhibition in Oct4 A Knockout-Zellen deutet auf einen möglichen Defekt der Homologen Rekombination hin. Deshalb wurde geprüft, ob sich dies ebenfalls in der Strahlenempfindlichkeit in Kombination mit PARP1-Inhibition abbildet. Hierfür wurden Koloniebildungstests mit Zellen beider Klengruppen mit 1 µM Olaparib behandelt und anschließend mit ansteigender Dosis (2, 4 und 6 Gy) bestrahlt. Als Kontrollen dienten bestrahlte Zellen ohne Olaparib-Beimpfung.



**Abbildung 3.8: Keine Modulation der Strahlenempfindlichkeit durch PARP1-Inhibition in Oct4 A WT-Klonen.** Die Beobachtung des klonogenen Überlebens erfolgte mittels Koloniebildungstests. Exponentiell wachsende WT-Klone wurden mit 250-500 Zellen ausplattiert, nach 24 h mit 1  $\mu$ M Olaparib beimpft und nach 2 h mit ansteigender Dosis (2,4 und 6 Gy) bestrahlt. Nach 10-15 Tagen wurden geformte Kolonien fixiert, gefärbt und quantifiziert. Zur Normierung diente die bestrahlte Kontrolle. Aufgetragen sind die Mittelwerte halblogarithmisch von drei unabhängigen Experimenten. Rechts: Exemplarische Bilder fixierter und gefärbter Kolonien auf 6-Well-Platten.



**Abbildung 3.9: Strahlensensibilisierung durch PARP1-Inhibition in Oct4 A KO-Klonen.** Klonogenes Überleben nach Bestrahlung unter PARP1-Inhibition wurde mittels Koloniebildungstests ermittelt. 250 exponentiell wachsende Zellen wurden ausplattiert, am nach 24 h mit 1  $\mu$ M Olaparib behandelt und 2 h danach mit ansteigender Dosis (2,4 und 6 Gy) bestrahlt. 10-14 Tage später wurden die Zellen fixiert, gefärbt und Kolonien quantifiziert. Zur Normierung diente die bestrahlte Kontrolle. Aufgetragen sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Abweichungen: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001 (ungepaarter Student's t-Test). Rechts: Exemplarische Bilder fixierter und gefärbter Kolonien auf 6-Well-Platten.

Abb. 3.8 zeigt den Einfluss des PARP1-Inhibitors Olaparib auf die Strahlenempfindlichkeit von Oct4 A Wildtyp-Klonen. Hierfür wurde das zelluläre Überleben der Klone nach Bestrahlung sowie nach Kombinationsbehandlung mit Olaparib und anschließender Bestrahlung quantifiziert und die Dosis-Effekt-Kurven verglichen. Zur Ermittlung der Signifikanzwerte wurden die Dosispunkte 4 Gy und 6 Gy analysiert. Bei allen Oct4 A Wildtyp-Klonen ist mit ansteigender Strahlendosis ein zunehmend steiler Abfall der Überlebensfraktion zu beobachten. Es wurde kein radiosensibilisierender Effekt der Olaparib-Behandlung in Zellen mit funktionalem Oct4 A beobachtet: Klon WT1 wies sowohl bei Dosispunkt 4 Gy (p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,3930) als auch bei 6 Gy (p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,7974) keine signifikanten Unterschiede des zellulären Überlebens zwischen bestrahlten und kombiniert-behandelten Zellen auf (Vgl. Tab. 17). Ähnliches Wachstumsverhalten nach Kombinationsbehandlung zeigte der Klon WT3 bei beiden analysierten Dosispunkten (p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,1370, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,3677) (Vgl. Tab. 17). Klon WT2 ließ sich ebenfalls beim Dosispunkt 4 Gy nicht durch Olaparib sensibilisieren (p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,5435) und wies bei der Bestrahlungsdosis von 6 Gy nur noch vereinzelte bis keine Zellkolonien auf (Vgl. Tab. 17).

Die rechts gezeigten, exemplarischen Fotos gefärbter Zellkolonien in 6-Well-Platten zeigen zum einen eine Radiosensitivität der Wildtyp-Klone und zum anderen den nur geringen Radiosensibilisierungseffekt einer Kombinationsbehandlung mit Olaparib. Zusammenfassend konnte bei keinem der Oct4 A Wildtyp-Klone ein signifikanter Radiosensibilisierungseffekt durch PARP1-Inhibition mittels Olaparib beobachtet werden (p-Werte<sub>4Gy</sub>: 0,3930; 0,5435; 0,1370, p-Werte<sub>6Gy</sub>: 0,7974; 0,3677).

Abb. 3.9 zeigt die für Oct4 A Knockout-Klone analog zu den Wildtyp-Klonen ermittelten Werte. Alle Knockout-Klone wiesen mit ansteigender Strahlendosis einen zunehmend steileren Abfall der Überlebensfraktion auf. Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Klonen zeigten sich jedoch in den radiosensibilisierenden Effekten durch Olaparib in den analysierten Dosispunkten 4 Gy und 6 Gy: Klon KO1 wies mit der höchsten Signifikanz ein geringeres klonogenes Überleben nach der Kombinationsbehandlung mit Olaparib auf (p-Wert<sub>4Gy</sub>: < 0,0001, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,0020) (Vgl. Tab. 17). Auch Klone KO2 (p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,0109, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,0380) und KO3 (p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,0073, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,0351) erwiesen sich als Olaparib-sensitive Knockout-Klone (Vgl. Tab. 17).

Die exemplarischen Fotos der gewachsenen Kolonien im Koloniebildungsassay nach verschiedenen Behandlungsstufen unterstützen die bisherigen Ergebnisse: es zeigte

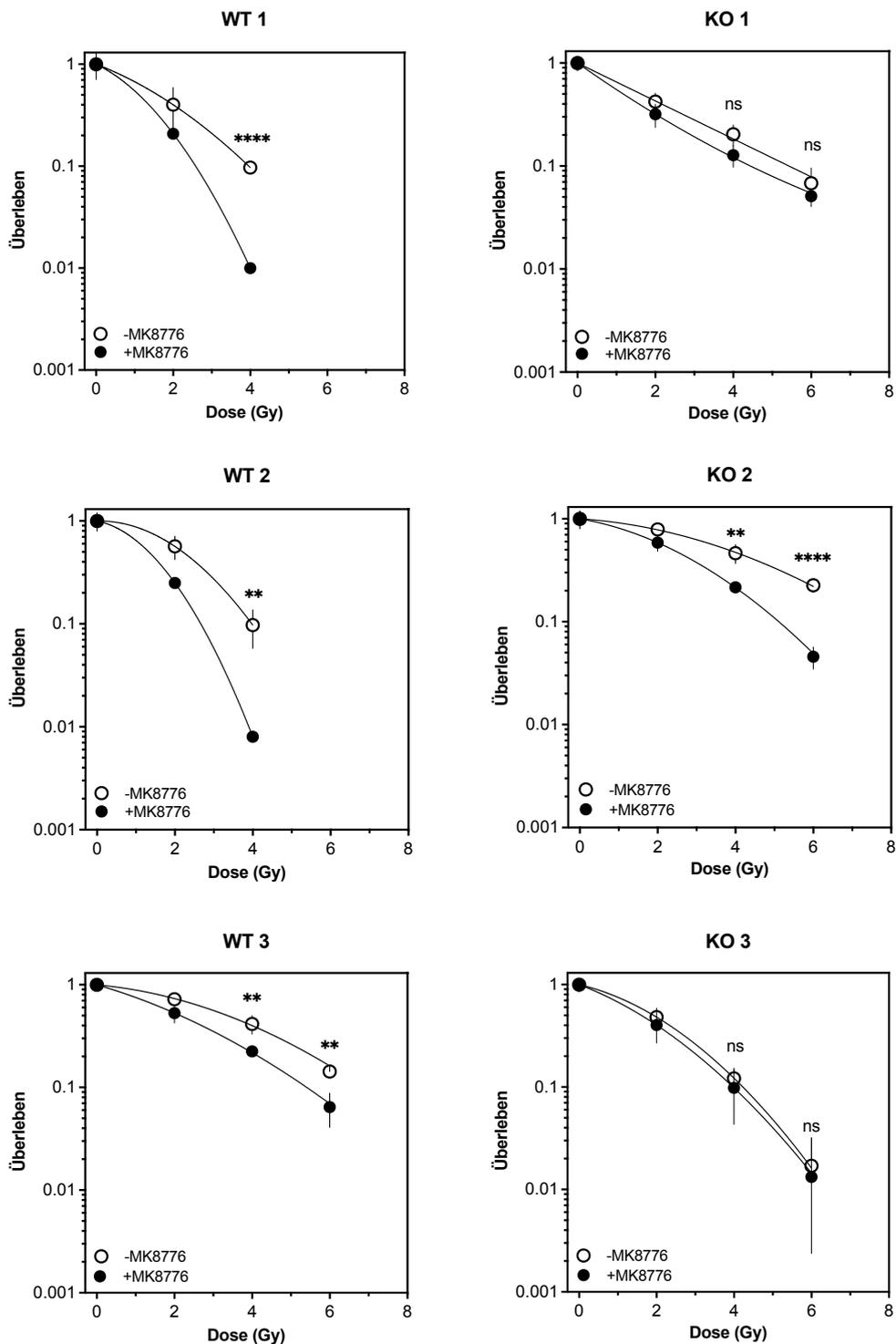
sich eine starke Radiosensibilisierung mit bereits sehr geringen Koloniezahlen beim Dosispunkt von 4 Gy ohne Olaparib-Behandlung (Vgl. Abb. 3.3) bei allen Knockout-Klonen und ein deutlicher Radiosensibilisierungseffekt durch Olaparib. Zusammenfassend zeigte sich bei allen Oct4 A Knockout-Klonen eine signifikant erhöhte Strahlenempfindlichkeit bei den analysierten Dosispunkten 4 Gy und 6 Gy nach PARP1-Inhibition mittels Olaparib (p-Werte<sub>4Gy</sub>: < 0,0001; 0,0109; 0,0073, p-Werte<sub>6Gy</sub>: 0,0020; 0,0380; 0,0351).

**Tabelle 17: Statistische Analyse Koloniebildungsassays mit Olaparib**

	<b>WT 1</b>	<b>WT 2</b>	<b>WT 3</b>	<b>KO 1</b>	<b>KO 2</b>	<b>KO 3</b>
<b>SF 4 Gy</b> MW ± SEM	0,196 ± 0,038	0,172 ± 0,020	0,357 ± 0,030	0,180 ± 0,014	0,290 ± 0,038	0,115 ± 0,018
<b>SF 4 Gy + Ola</b> MW ± SEM	0,152 ± 0,033	0,144 ± 0,031	0,296 ± 0,026	0,052 ± 0,011	0,142 ± 0,036	0,040 ± 0,012
<b>p-Wert</b>	<i>0,3930</i>	<i>0,5435</i>	<i>0,1370</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>0,0109</i>	<i>0,0073</i>
<b>SF 6 Gy</b> MW ± SEM	0,047 ± 0,010	x	0,116 ± 0,020	0,031 ± 0,001	0,096 ± 0,017	0,015 ± 0,006
<b>SF 6 Gy + Ola</b> MW ± SEM	0,040 ± 0,021	x	0,094 ± 0,014	0,008 ± 0,002	0,045 ± 0,015	0,000 ± 0,000
<b>p-Wert</b>	<i>0,7974</i>	<i>x</i>	<i>0,3677</i>	<i>0,0020</i>	<i>0,0380</i>	<i>0,0351</i>

### 3.2.3 Einfluss CHK1-Inhibition auf die Radiosensitivität

Es wurde ebenfalls überprüft, ob sich der Knockout von Oct4 A auf die Inhibition der durch CHK1 vermittelten DNA Schadensantwort auswirkt. Hierfür wurde die potenzielle Radiosensibilisierung im klonogenen Überlebenstest untersucht. Die exponentiell wachsenden Zellen mit und ohne Oct4 A Knockout wurden 2 Stunden mit 2,5 µM des CHK1-Inhibitors MK8776 inkubiert und anschließend mit 2, 4 und 6 Gy bestrahlt.



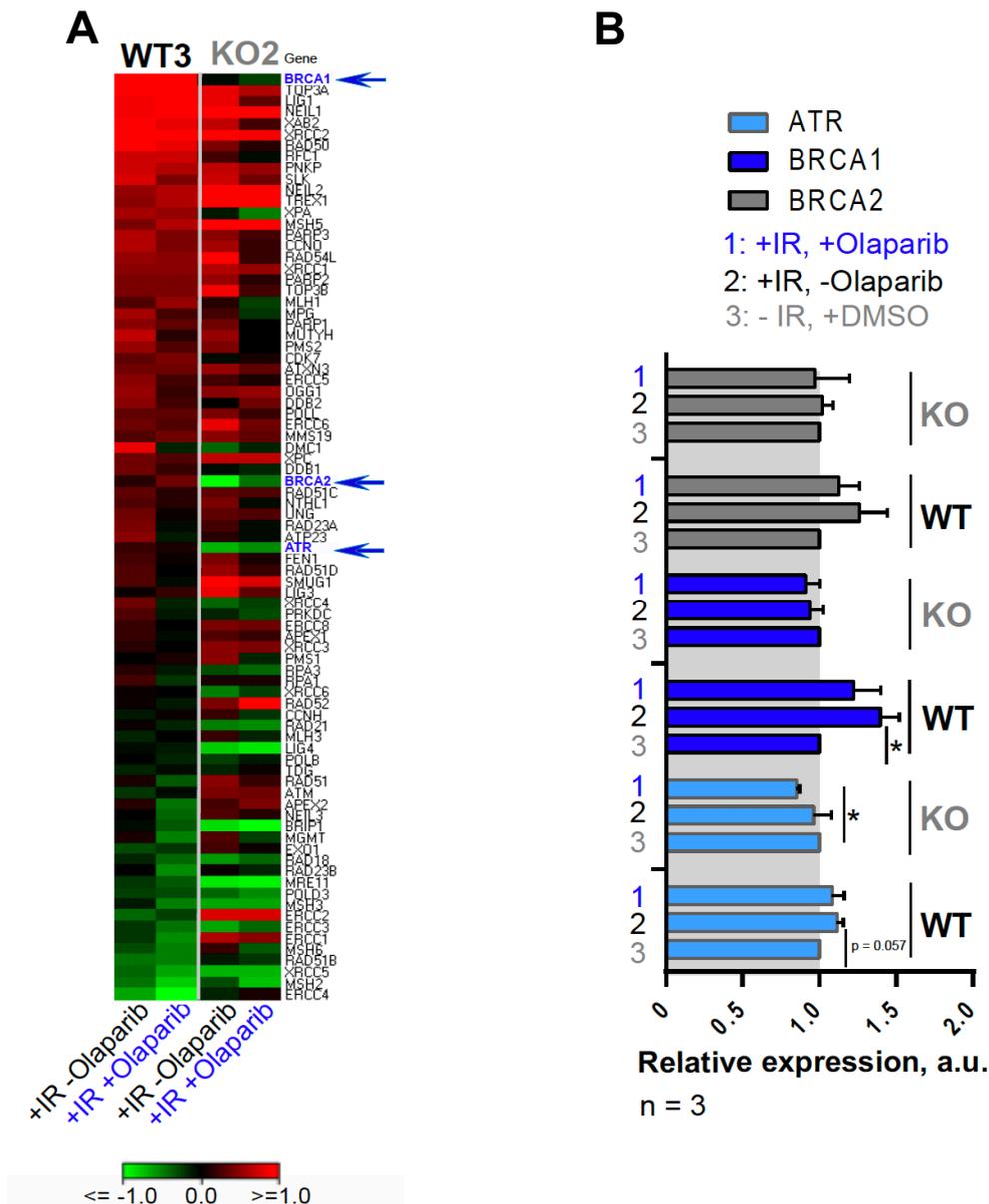
**Abbildung 3.10: Ein Effekt der CHK1-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit in Oct4 A WT-Klonen.** Klonogenes Überleben nach Behandlung mit CHK1-Inhibitor MK8776 und anschließender Bestrahlung wurde mittels Koloniebildungstests ermittelt. 250 und 500 exponentiell wachsende Zellen wurden ausplattiert, 24 h danach mit 2,5  $\mu$ M MK8776 inkubiert und 2 h später mit ansteigender Dosis (2,4 und 6 Gy) bestrahlt. Nach 10-14 Tagen wurden die Kolonien fixiert, gefärbt und ausgezählt. Zur Normierung dienen bestrahlte Kontrollen. Aufgetragen sind die Mittelwerte zweier Triplikate unterschiedlicher Zellzahl eines Experiments. Statistisch signifikante Abweichungen: \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001 (ungepaarter Student's t-Test).

Die Abb. 3.10 zeigt den Effekt von CHK1-Inhibition mit MK8776 auf die Strahlenempfindlichkeit in Zellen mit aktivem Oct4 A im Vergleich zu Oct4 A Knockout-Zellen. Analog zur PARP1-Inhibition konnte man einen mit ansteigender Bestrahlungsdosis zunehmenden Abfall des Überlebens in beiden Klengruppen beobachten. In Oct4 A Wildtyp-Klonen wurde zudem ein signifikanter Radiosensibilisierungseffekt durch CHK1-Inhibition sichtbar: Klon WT1 zeigte die stärkste Strahlensensibilisierung durch CHK1-Inhibition mit nur geringen Überlebensraten nach 4 Gy (p-Wert<sub>4Gy</sub>: < 0,0001) und vereinzelt bis keinen nachweisbaren Kolonien nach 6 Gy. Auch Wildtyp-Klone WT2 und WT3 zeigten signifikante Radiosensibilisierungen durch den CHK1 Inhibitor (p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,0010 und p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,0070, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,0020). Die Knockout-Klone zeigten dagegen nur einen geringen, meist nicht signifikanten Effekt der CHK1-Inhibition auf das Überleben: Klon KO1 und KO3 wiesen keine signifikanten Unterschiede des zellulären Überlebens zwischen bestrahlten und kombiniert-behandelten Zellen mit MK8776 auf (p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,0595, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,1616 und p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,4561, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,7965), während Klon KO2 signifikant radiosensibilisiert werden konnte (p-Wert<sub>4Gy</sub>: 0,0011, p-Wert<sub>6Gy</sub>: < 0,0001). Zusammenfassend konnte vor allem bei den Oct4 A Wildtyp-Klonen eine signifikante Sensibilisierung durch den CHK1-Inhibitor MK8776 erzielt werden (p-Werte<sub>4Gy</sub>: < 0,0001; 0,0010; 0,0070, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,0020).

### 3.2.4 Expression von HR-relevanten Genen und Proteinen

Die beobachtete erhöhte Radiosensibilität durch PARP1-Inhibition deutet ebenfalls auf einen HR-Mangel in Oct4 A Knockout-Klonen hin. Um einen möglichen Zusammenhang der Reparatur durch HR und der Oct4-Depletion weiter zu untersuchen, wurden Daten und Abbildungen aus der gemeinsam verfassten und von Nathansen et. al. publizierten Arbeit herangezogen (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021).

Hier wurde die Expression von 83 ausgewählten DNA-Reparaturgenen in jeweils einem repräsentativen Oct4 A Wildtyp- (WT3) und Knockout-Klon (KO2) nach alleiniger Bestrahlung und in Kombinationsbehandlung mit Olaparib mittels RT<sup>2</sup>-Profiler-PCR-Array und quantitativer Echtzeit-PCR analysiert.

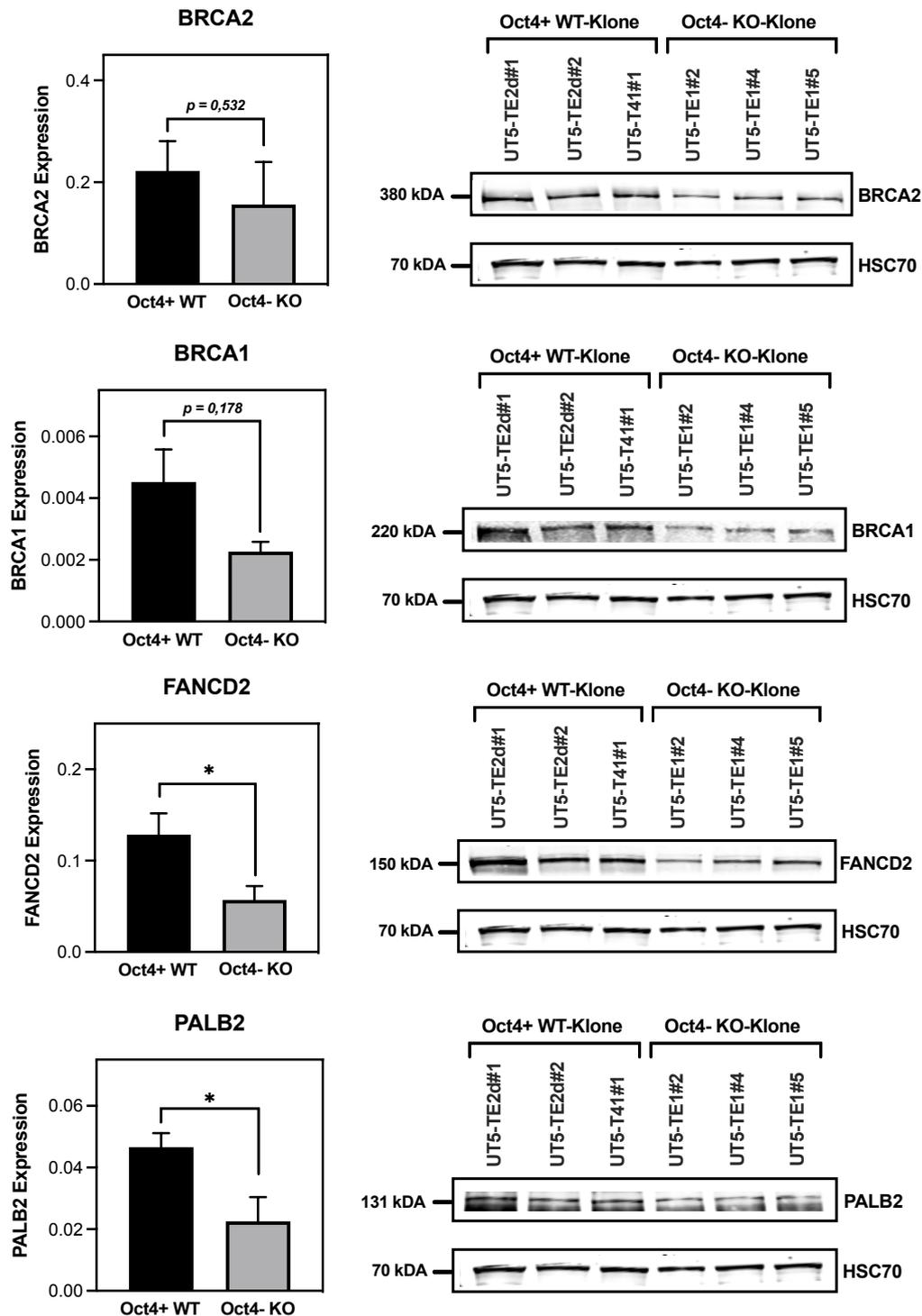


**Abbildung 3.11: Höhere Expression von HR-Genen in Oct4 A WT-Klonen nach Kombinationsbehandlung mit Olaparib und Bestrahlung. (A)** Die Expression von 83 Genen der DNA-Reparatur wurde mittels RT<sup>2</sup>-Profiler-PCR-Array in repräsentativen Oct4 A KO2 und WT3 Klonen analysiert. Nach zweistündiger Behandlung der Zellklone mit 1 µM Olaparib wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt und 24 h später gesammelt und quantifiziert. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Eine DMSO-behandelte Kontrolle wurde für die Normierung genutzt. **(B)** Validierung der RT<sup>2</sup>-Profiler-PCR-Array-Ergebnisse für ausgewählte HR-Gene (ATR-, BRCA1- und BRCA2) mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR). Dargestellt sind Daten dreier unabhängiger Experimente. Statistisch signifikante Abweichungen: \* p < 0,05.

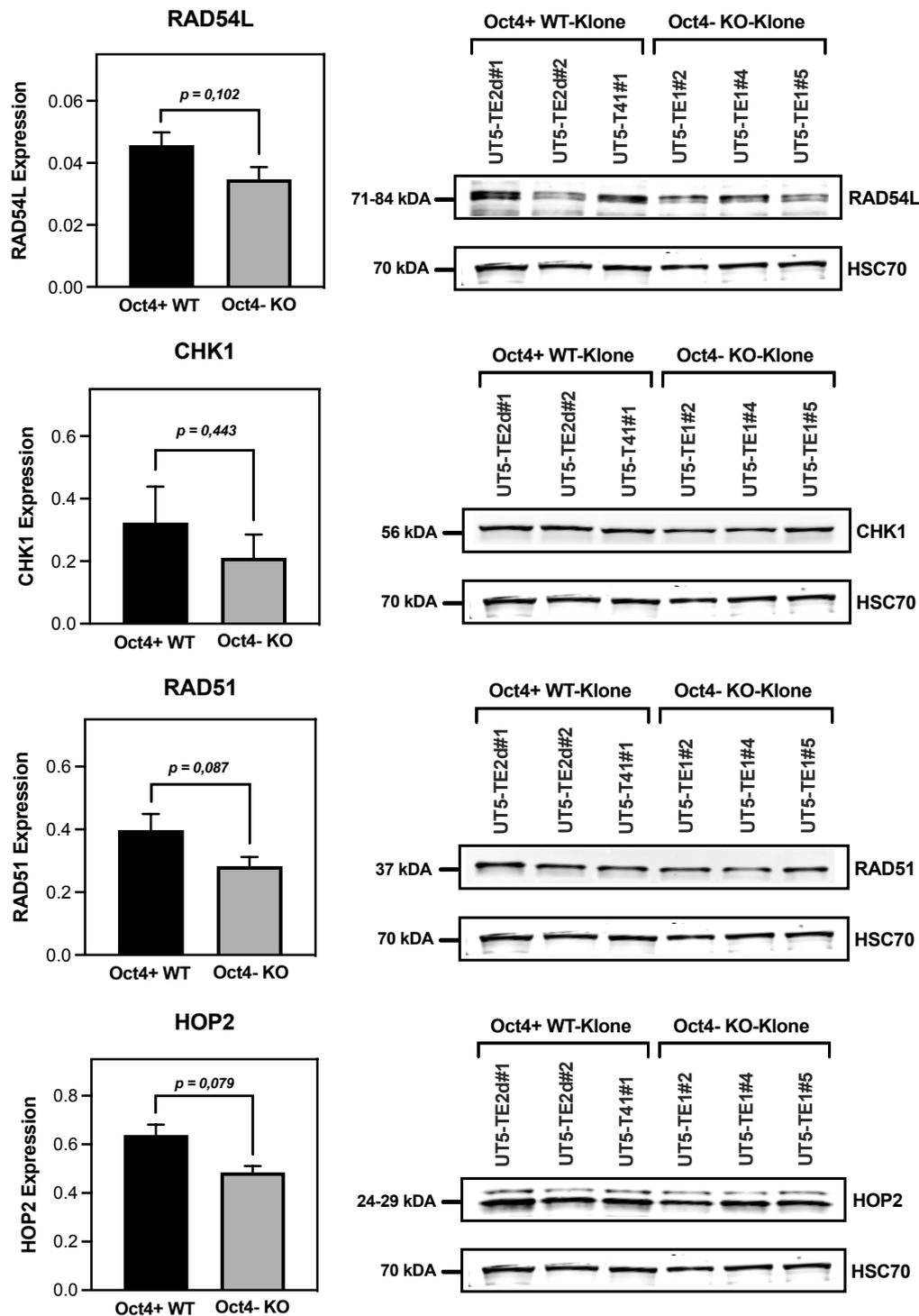
**(A), (B)** Abbildungen entnommen aus (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021).

Abb. 3.11 A stellt die Expression der untersuchten DNA-Reparaturgene in einer sogenannten „Heatmap“ mit einer Farbcodierung dar: hierbei zeigt die Farbe Grün (inkl. Farbabstufungen:  $\leq -1,0$  bis  $0,0$ ) eine reduzierte Genexpression und Rot (inkl. Farbabstufungen:  $0,0$  bis  $\geq 1,0$ ) eine verstärkte Expression der analysierten Gene an. Sichtbar wird hier, dass vor allem im Wildtyp-Klon alleinige Bestrahlung zu einer erhöhten Expression der meisten untersuchten DNA-Reparaturgene führte. Im Oct4 A Knockout-Klon hingegen war eine vergleichsweise geringere Aktivierung von HR-Genen zu beobachten. Nach Kombinationsbehandlung mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib wurde sowohl beim Wildtyp- als auch beim Knockout-Klon eine verminderte Expression von DNA-Reparaturgenen sichtbar. Der größte Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Klon in der Genexpression, sowohl nach alleiniger Bestrahlung als auch nach Kombinationsbehandlung, konnte bei den DNA-Reparaturgenen ATR, BRCA1 und BRCA2 beobachtet werden. Um dies zu validieren, wurden die genannten Gene mittels qPCR durch Fluoreszenz-Messungen quantifiziert und die relative Genexpression bestimmt. Hierbei zeigte sich für das HR-Gen BRCA2 trotz sichtbarer Tendenz keine signifikante Expressionserhöhung beim Wildtyp-Klon nach Bestrahlung oder Kombinationsbehandlung mit Olaparib und auch keine relevante verminderte Expression beim Knockout-Klon. Beim HR-Gen BRCA1 konnte beim Wildtyp-Klon ein signifikanter Anstieg der Expression nach Bestrahlung ( $p$ -Wert:  $p < 0,050$ ) beobachtet werden, jedoch keine signifikante Veränderung im Knockout-Klon nach Behandlungen. Nach Analyse des DNA-Reparaturgens ATR zeigte sich beim Wildtyp-Klon mit starker Tendenz ( $p$ -Wert:  $0,057$ ) ein Anstieg der Expression nach alleiniger Bestrahlung und ein signifikant erniedrigtes Expressionsniveau nach Kombinationsbehandlung beim Knockout-Klon ( $p$ -Wert:  $p < 0,05$ ). Zusammenfassend wird in Abb. 3.9 A, B ein Unterschied in der Expression von an der DNA-Schadensantwort und der Homologen Rekombination beteiligten Genen sichtbar: der untersuchte Oct4 A Knockout-Klon wies mehrheitlich niedrigere Expressionsniveaus auf als der Oct4 A Wildtyp-Klon. Die größten Expressionsdifferenzen zeigten sich in den DNA-Reparaturgenen ATR, BRCA1 und BRCA2.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors Oct4 auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurde in allen unbehandelten Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen mittels Western Blot die Expression folgender Reparaturproteine ermittelt: BRCA2, BRCA1, FANCD2, PALB2, RAD54L, CHK1, RAD51 und HOP2.



**Abbildung 3.12: Höhere Expression der HR-Proteine BRCA2, BRCA1, FANCD2 und PALB2 in Oct4<sup>+</sup> WT-Klonen.** Gesamtzellextrakte exponentieller Zellen wurden hergestellt, 40 µg elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Membran übertragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern. HSC70 diente als Ladekontrolle. Graphisch wurden jeweils die WT- (schwarz) und KO-Klone (grau) gegenübergestellt. Dargestellt sind die exemplarischen Membranen aus einem Experiment. Fehler sind Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: \*  $p < 0,05$  (ungepaarter Student's t-Test). Rechts: Abbildung Western Blots aus einem exemplarischen Experiment.



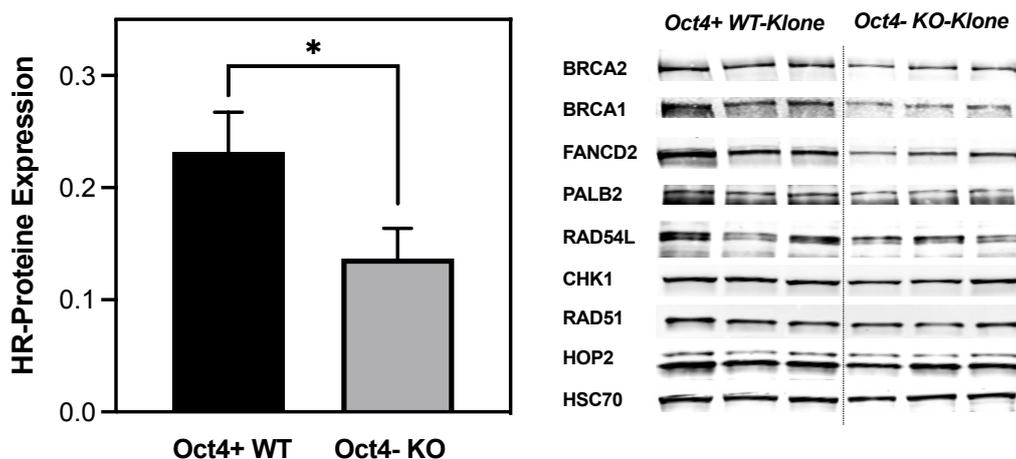
**Abbildung 3.13: Höhere Expression der HR-Proteine RAD54L, CHK1, RAD51 und HOP2 in Oct4 A WT-Klonen.** 40 µg Gesamtzellextrakt exponentiell wachsender Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Membran übertragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern. HSC70 diente als Ladekontrolle. Graphisch wurden jeweils die WT- (schwarz) und KO-Klone (grau) gegenübergestellt. Dargestellt sind die exemplarischen Membranen aus einem Experiment. Fehler sind Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test. Rechts: Abbildung Western Blots aus einem exemplarischen Experiment.

Abb. 3.12 zeigt die Proteinexpression von BRCA2, BRCA1, FANCD2 und PALB2. Rechts sind unterstützend zur Quantifizierung exemplarische Western Blots abgebildet. Die Expressionen der HR-Proteine BRCA2 (WT  $0,222 \pm 0,058$ , KO  $0,156 \pm 0,084$ ) und BRCA1 (WT  $0,005 \pm 0,001$ ; KO  $0,002 \pm 0,000$ ) zeigten nicht signifikante, höhere Proteinmengen in Oct4 A Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den Knockout-Klonen (p-Wert: 0,5320; p-Wert: 0,1776). Ein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression unbehandelter Klone zeigte sich für FANCD2: die Wildtyp-Klone ( $0,128 \pm 0,023$ ) exprimierten signifikant mehr FANCD2 Proteine als die Knockout-Klone ( $0,057 \pm 0,015$ ) (p-Wert: 0,0335). Bei der Messung des HR-Proteins PALB2, welches Interaktionen wichtiger Proteine der Homologen Rekombination vermittelt (Wu et al., 2020), konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression in Wildtyp-Klonen ( $0,047 \pm 0,005$ ) im Vergleich zu Knockout-Klonen ( $0,023 \pm 0,008$ ) ermittelt werden (p-Wert: 0,0265). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die DNA-Reparaturproteine BRCA2 und BRCA1 in der Proteinexpression zwischen Oct4 A Wildtyp und Oct4 A Knockout-Klonen nicht signifikant unterschieden, jedoch tendenziell bei Wildtyp-Klonen erhöht waren. Das HR-Interaktionsprotein PALB2 und das FA-Protein FANCD2 waren in Oct4 A Wildtyp-Klonen signifikant höher exprimiert als in Oct4 A Knockout-Klonen.

Abb. 3.13 stellt die Expression der ebenfalls an der HR beteiligten Proteine RAD54L, CHK1, RAD51 und HOP2 dar. Auch hier sind rechts exemplarische Western Blots der jeweiligen analysierten Proteine abgebildet. Das HR-Protein RAD54L wies keine signifikanten Differenzen in der Expression auf, jedoch waren eher erhöhte Proteinmengen in Wildtyp-Klonen erkennbar. Das Expressionsniveau von CHK1, welches durch ATR phosphoryliert wird (Sørensen et al., 2005), zeigte ebenfalls nur einen nicht signifikanten Trend zu einer höheren Expression in Oct4 A Wildtyp-Klonen ( $0,324 \pm 0,115$ ) im Vergleich zu Knockout-Klonen ( $0,211 \pm 0,074$ ) (p-Wert: 0,4426). Auch RAD51, welches den Strangaustausch während der Homologen Rekombination koordiniert, war mit einer nicht signifikanten Tendenz (p-Wert: 0,0874) in Wildtypen ( $0,398 \pm 0,051$ ) stärker exprimiert als in Knockout-Klonen ( $0,283 \pm 0,030$ ). Derselbe Trend zeigte sich für das an der HR beteiligte Protein HOP2: hier war eine erhöhte Proteinmenge bei Wildtyp-Klonen ( $0,638 \pm 0,043$ ) im Gegensatz zu Knockout-Klonen ( $0,485 \pm 0,027$ ) erkennbar (p-Wert: 0,0799). Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der Proteinmengen in unbehandelten Klone eine tendenziell erhöhte

Proteinexpressionen der HR-Proteine RAD54L, CHK1, RAD51 und HOP in den Oct4 A Wildtyp-Klonen im Vergleich zu Oct4 A Knockout-Klonen.

Um die Differenzen der Expression von allen untersuchten DNA-Reparatur-Proteinen in Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen zu quantifizieren, wurden im Folgenden die normierten Proteinmengen der analysierten Proteine (BRCA2, BRCA1, FANCD2, PALB2, RAD54L, CHK1, RAD51 und HOP2) in den Klongruppen zusammengefasst.

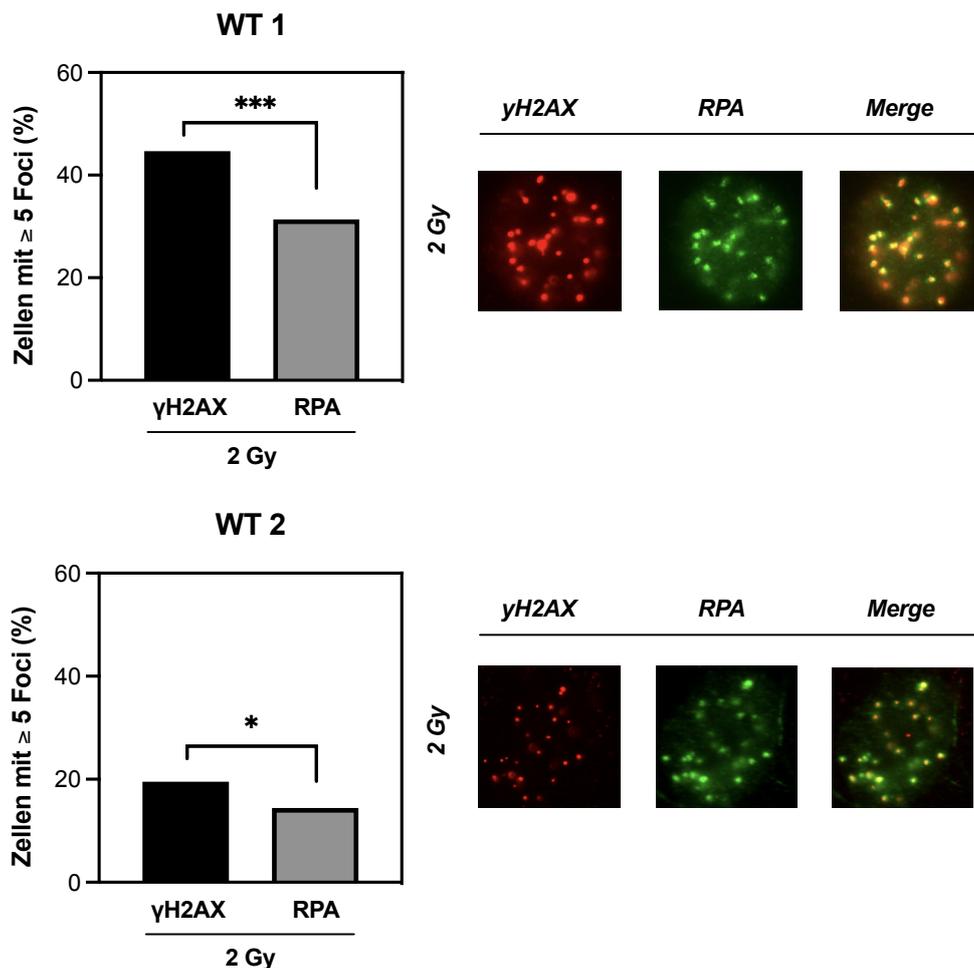


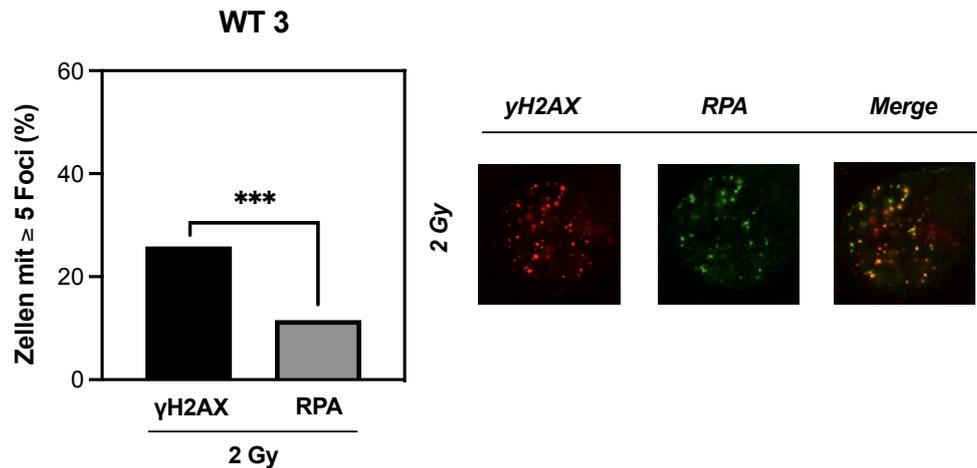
**Abbildung 3.14: Höhere Expression von HR-Proteinen (BRCA2, BRCA1, FANCD2, PALB2, RAD54L, CHK1, RAD51, HOP2) in Oct4 A WT-Klonen.** Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert. Graphisch wurden alle elektrophoretisch aufgetrennten und immunologisch detektierten HR-Proteine für die WT- (schwarz) und KO-Klone (grau) zusammengefasst. HSC70 diente als normierende Ladekontrolle. Dargestellt ist die Quantifizierung zweier unabhängiger Experimente ± SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: \*  $p < 0,05$  (ungepaarter Student's t-Test). Rechts: Abbildung Western Blot-Banden aus einem Experiment.

Abb. 3.14 verdeutlicht, dass die Klone der Wildtypen, mit erhöhter Expression des Transkriptionsfaktors Oct4 A (Schulz et al., 2019), signifikant mehr DNA-Reparatur-Proteine exprimierten ( $0,232 \pm 0,035$ ) als Knockout-Klone, in denen Oct4 A-depletiert wurde und somit eine potenzielle HR-Defizienz aufwiesen ( $0,137 \pm 0,027$ ) ( $p$ -Wert: 0,0351). Zusammenfassend konnte mittels Western Blot bei Oct4 A Wildtyp-Klonen im Vergleich zu Oct4 A Knockout-Klonen eine erhöhte Expression aller untersuchten HR-relevanten DNA-Reparatur-Proteine beobachtet werden.

### 3.2.5 Auswirkungen des Oct4 A Knockouts auf die Bildung von $\gamma$ H2AX- und RPA Foci-Bildung nach exogener DNA-Schädigung

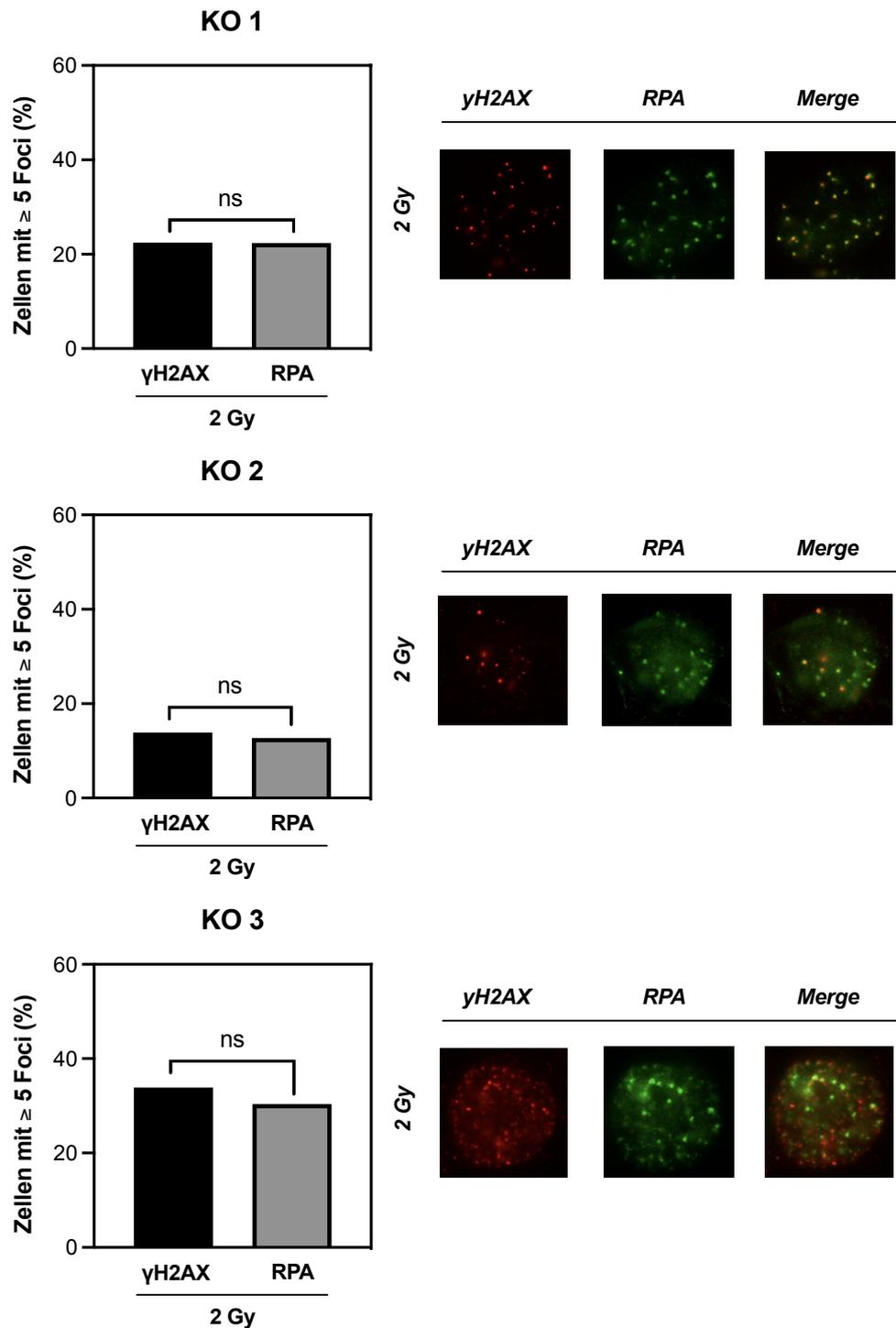
Abschließend wurde untersucht, welche Bedeutung Oct4 A für die Reparatur von DSBs (H2AX) und SSBs (RPA) nach Bestrahlung hat. Hiermit können über die Quantifizierung replikationsassoziiierter DSBs indirekt Rückschlüsse auf die Aktivität von DNA-Reparaturvorgängen in der S-Phase des Zellzyklus gezogen werden, in welcher die HR eine übergeordnete Rolle spielt (Santos et al., 2020). Phosphorylierte  $\gamma$ H2AX-Foci dienten als Marker von DNA-Doppelstrangbrüchen in allen Phasen des Zellzyklus und RPA-Foci als Marker einzelsträngiger DNA, welche v.a. im Rahmen blockierter Replikationsgabeln während der S-Phase des Zellzyklus vorliegt (Blackford & Jackson, 2017; Huang & Zhou, 2020). Um also das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktor Oct4 A und der Homologen Rekombination letztlich zu unterstreichen, wurden DNA-Schäden nach Bestrahlung in Form von  $\gamma$ H2AX- und RPA Foci-Bildung quantifiziert und verglichen.





**Abbildung 3.15: Differenz zwischen  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci in WT-Klonen nach Bestrahlung.** Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und für 24 h inkubiert. Anschließend folgte die Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern (Darstellung  $\gamma$ H2AX-Foci in schwarz und RPA-Foci in grau). Zur Normierung diente die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind die relativen Werte eines Experimentes. Fehler sind Mittelwerte + SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Student's t-Test). Rechts: exemplarische Bilder der Foci Immunfluoreszenzaufnahmen.

Abb. 3.15 zeigt quantifizierte  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci in Wildtyp-Klonen nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy. Verglichen wurde der prozentuale Anteil der Zellen, welche eine Foci-Anzahl von  $\geq 5$  aufwiesen. Sichtbar wird hier, dass zunächst im Wildtyp-Klon WT1 mit 44,70 % signifikant mehr  $\gamma$ H2AX-Foci als RPA-Foci mit 31,8 % markiert wurden ( $p$ -Wert: 0,0002). Auch Wildtyp-Klon WT2 zeigte mit 19,55 % mehr  $\gamma$ H2AX-Foci als RPA-Foci mit 14,40 % ( $p$ -Wert: 0,0464). Im Wildtyp-Klon WT3 konnte man ebenfalls eine signifikante Differenz zwischen  $\gamma$ H2AX-Foci mit 25,86% und RPA-Foci mit 11,57 % beobachten ( $p$ -Wert: 0,0008). In den rechten, exemplarischen Immunfluoreszenzaufnahmen sind die jeweiligen  $\gamma$ H2AX-Foci, RPA-Foci und deren Überlappung (*Merge*) abgebildet. Auch hier erkennt man Differenzen zwischen  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci bei allen Wildtyp-Klonen. Zusammenfassend konnte in Abb. 3.15 gezeigt werden, dass bei allen drei Oct4 A Wildtyp-Klonen eine signifikante Differenz zwischen immunfluoreszenzgefärbten  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci nach Bestrahlung beobachtet wurde.



**Abbildung 3.16: Keine Differenz zwischen  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci in WT-Klonen nach Bestrahlung.** Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und für 24 h inkubiert. Anschließend folgte die Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern (Darstellung  $\gamma$ H2AX-Foci in schwarz und RPA-Foci in grau). Zur Normierung diente die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind die relativen Werte eines Experimentes. Fehler sind Mittelwerte + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test. Rechts: exemplarische Bilder der Foci Immunfluoreszenzaufnahmen.

Abb. 3.16 stellt analog zur Abb. 3.15  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci in Knockout-Klonen nach Bestrahlung mit 2 Gy dar. Sichtbar wird hier, dass im Knockout-Klon KO1 zwischen der Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci mit 22,46 % und RPA-Foci mit 22,40 % kein signifikanter Unterschied bestand (p-Wert: 0,9418). Auch beim Klon KO2 zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen  $\gamma$ H2AX-Foci mit 13,87 % und RPA-Foci mit 12,71 % (p-Wert: 0,6023). Bei Knockout-Klon KO3 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen  $\gamma$ H2AX-Foci mit 33,88 % und RPA-Foci mit 30,39 % beobachtet werden (p-Wert: 0,1667). In allen drei Knockout-Klonen wurde also eine Kolokalisation der Marker  $\gamma$ H2AX und RPA sichtbar. Auch hier unterstützen rechts aufgeführte exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen die sich nahezu deckende Anzahl von  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci. Zusammenfassend wiesen alle Oct4 A Knockout-Klone ähnliche, sich nicht signifikant unterscheidende  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci und damit eine Kolokalisation beider Marker nach Bestrahlung auf.

### 3.2.6 Zusammenfassung 2

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Beitrags von Oct4 und der Oct4-verwandten Gensignatur zur HNSCC-Radioresistenz über die Regulierung der homologen Rekombination im Rahmen der DNA-Reparatur. Außerdem soll ein potenziell strahlensensibilisierender Effekt eines PARP1-Inhibitors bei den möglicherweise HR-defizienten Oct4-Klonen untersucht werden. Hierfür wurde das klonogene Überleben nach PARP1-Inhibition mit Olaparib ohne und mit anschließender Bestrahlung beobachtet, eine Radiosensibilisierung durch CHK1-Inhibition getestet, die Expression von HR-relevanten Genen und Proteinen analysiert und die  $\gamma$ H2AX- und RPA Foci-Bildung nach exogener DNA-Schädigung quantifiziert.

Nach alleiniger PARP1-Inhibition mit Olaparib zeigten sowohl alle Oct4 A Wildtyp-Klone als auch die Oct4 A Knockout-Klone eine signifikante Reduktion der Angehraten im Koloniebildungstest. Es konnte jedoch ebenfalls festgestellt werden, dass Knockout-Klone mit geringeren Angehraten insgesamt sensitiver auf PARP1-Inhibition reagierten als Wildtyp-Klone mit vergleichsweise höheren Angehraten (p-Wert: 0,0040). Im Bestrahlungskontext zeigte sich im Gegensatz zu den Wildtyp-Klonen (p-Werte<sub>4Gy</sub>: 0,3930; 0,5435; 0,1370, p-Werte<sub>6Gy</sub>: 0,7974; 0,3677) bei allen Oct4 A Knockout-Klonen eine signifikant erhöhte Strahlenempfindlichkeit bei den analysierten Dosispunkten 4 Gy und 6 Gy nach PARP1-Inhibition mittels Olaparib (p-Werte<sub>4Gy</sub>: < 0,0001; 0,0109; 0,0073, p-Werte<sub>6Gy</sub>: 0,0020; 0,0380; 0,0351).

Als Ergänzung zur Testung der Reparaturaktivität und Charakterisierung der Oct4 A-Klone wurden erste Hinweise hinsichtlich einer Radiosensibilisierung durch CHK1-Inhibition gesammelt. Hierbei zeigte sich vor allem bei den Oct4 A Wildtyp-Klonen eine signifikante Sensibilisierung durch den CHK1-Inhibitor MK8776 (p-Werte<sub>4Gy</sub>: < 0,0001; 0,0010; 0,0070, p-Wert<sub>6Gy</sub>: 0,0020).

Nach Analyse der Expression von DNA-Reparaturgenen wurde sichtbar, dass der untersuchte Oct4 A Wildtyp-Klon mehr erhöhte Expressionsniveaus aufwies als der Oct4 A Knockout-Klon. Die größten Differenzen in der Expression zwischen den Klongruppen zeigten sich in den Genen BRCA1, BRCA2 und ATR. Auf Proteinebene wurden signifikant erhöhte Expressionen von PALB2 und FANCD2 in Oct4 A Wildtyp-Klonen beobachtet (p-Werte: 0,0265; 0,0335). Die Proteine HOP2, RAD51, RAD54L und BRCA1 zeigten ebenfalls tendenziell erhöhte Expressionslevels in Wildtyp-Klonen (p-Werte: 0,0799; 0,0874; 0,1018; 0,1776). Die zusammengefassten, mittels Western Blot untersuchten DNA-Reparatur-Proteine innerhalb der Klongruppen, wiesen in Oct4 A Wildtyp-Klonen im Vergleich zu Oct4 A Knockout-Klonen eine signifikant erhöhte Expression auf (p-Wert: 0,0351).

Zuletzt konnte bei den Oct4 A Wildtyp-Klonen eine signifikante Differenz zwischen immunfluoreszenzgefärbten  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci nach Bestrahlung beobachtet werden (p-Werte: 0,0002; 0,0464; 0,0008). Oct4 A Knockout-Klone hingegen wiesen eine Kolokalisation von  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci nach Bestrahlung auf (p-Werte: 0,9418; 0,6023; 0,1667).

## 4 Diskussion

Das Ziel der Arbeit war, den Einfluss von Oct4 A auf die HR-vermittelten DNA-Reparaturmechanismen und daraus folgende Radioresistenz in TSZ des HNSCC zu untersuchen. Dieser TSZ-Resistenzmechanismus könnte zukünftig für individuelle postoperative Therapiekonzepte des HNSCCs angezielt werden und Oct4 A als Biomarker zur Patientenstratifizierung und Therapieauswahl dienen. Hierfür sollte zunächst gezeigt werden, dass aufgrund einer potenziellen HR-Defizienz in Oct4 A-depletierten HNSCC-Zellen eine PARP1-Inhibition mit Olaparib zusammen mit Radiotherapie einen synthetischen Letalitätseffekt *in vitro* erzielen kann. Ergänzend wurden Hinweise für Radiosensibilisierungseffekte durch CHK1-Inhibition gesammelt. Anschließend wurde der direkte Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor Oct4 A und der Aktivierung HR-vermittelter DNA-Reparaturmechanismen in HNSCC-Tumorstammzellpopulationen auf molekularer Ebene weiter untersucht.

Bisherige Erkenntnisse beschreiben den Transkriptionsfaktor Oct4 A als potenziellen Biomarker für TSZ des HNSCC, welcher über TSZ-Mechanismen wie Selbsterneuerungskapazität und Pluripotenz zur Strahlenresistenz beiträgt (Koo et al., 2015; Major et al., 2013; Mohiuddin et al., 2020; Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Außerdem ist bekannt, dass eine verstärkte HR-Kapazität einen weiteren bedeutsamen intrinsischen Radioresistenzmechanismus von TSZ darstellt und somit eine therapeutische Angriffsfläche für Kombinationstherapien bieten kann (Schulz et al., 2019; Wurster et al., 2016). Bisher ist unklar, welche Rolle der TSZ-Transkriptionsfaktor Oct4 A bei der Aktivierung von HR-Prozessen spielt und ob er als potenzieller Biomarker für Therapieerfolg sowie für die Eignung von Kombinationstherapien im Rahmen postoperativer Radiotherapie dienen kann.

### 4.1 Einfluss von Oct4 A auf Zellproliferation und endogene DNA-Schäden

#### **Oct4 A-unabhängiges Zellwachstum und Oct4-abhängige Klonogenität**

Zunächst wurde der Einfluss von Oct4 A auf das Wachstumsverhalten *in vitro* und die zelluläre Angehrate im Rahmen von Koloniebildungstests der Klongruppen untersucht und verglichen, um das proliferative Potenzial zu bewerten (Ruan et al., 2019). Hierbei zeigten sich insgesamt zwischen Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten (Vgl. Abb. 3.1 A, B). Auch die

Wachstumsphasen zeigten bei den Klongruppen ähnliche Verläufe (Vgl. Abb. 3.1 A). Entgegen der Erwartung konnte daher kein eindeutiger Effekt von Oct4 A auf das proliferative Potenzial der Klone beobachtet werden. Mehrere Studien stellten dagegen fest, dass das Ausschalten des Oct4 A-Gens unter anderem durch Aktivierung des Zellzyklusarrests und Apoptose mit einer Verzögerung des Zellwachstums sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verbunden ist und Oct4 A über die Aktivierung bestimmter assoziierter Zielgene zur Zellproliferation beiträgt (Ruan et al., 2019; Ventelä et al., 2015; Y. Zhou et al., 2018). Diese widersprüchlichen Erkenntnisse lassen sich auf nicht identische Passagezeiten, Anzahl der untersuchten Klone sowie die potenzielle Adaptation an einen persistierenden Gen-Knockout durch verstärkte Überlebensstrategien anhand transkriptioneller Anpassungsreaktionen der Oct4 A Knockout-Klone zurückführen (Brix et al., 2020; Prince et al., 2007). Die möglichen Anpassungsmechanismen nach Oct4 A-Gen-Knockout könnten Modulationen alternativer Signalwege, Hochregulierung Oct4 A-verwandter Gene, globale Chromatin-Reorganisation und Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster an kompensierenden Genloci umfassen (El-Brolosy & Stainier, 2017).

Auch die beobachteten Angehrten der Zellklone in Koloniebildungstests stimmten nicht mit den theoretischen, bereits beschriebenen Wachstumseigenschaften von Oct4 A-exprimierenden TSZ überein: Oct4 A Knockout-Klone zeigten insgesamt eine signifikant höhere Klonogenität als die Oct4 A Wildtyp-Klone (Vgl. Abb. 3.2). Diese Beobachtung lässt sich zum einen ebenfalls auf potenzielle Anpassungsmechanismen der Oct4 A-depletierten Klone zurückführen und könnte zum anderen durch veränderte Ausprägungen des als zelluläre Kooperation beschriebenen Phänomens, bei der lösliche Faktoren das Wachstum der reproduktiven Zelle beeinflussen, erklärt werden (Brix et al., 2020).

### **Reduzierte endogene Schäden in Oct4 A Wildtyp-Klonen**

Die Untersuchung spontaner endogener DNA-Schäden sollte erste Hinweise für eine eingeschränkte HR-Kapazität bei Oct4 A-Depletion liefern. Endogene DNA-Schäden entstehen unter anderem durch chemische Instabilität wie oxidative Schäden durch Stoffwechselaktivitäten oder Depurinierung und Replikationsfehler (Kuo Linda J. & Yang Li-Xi, 2008; Tanaka et al., 2006). Während eines Zellzyklus entstehen schätzungsweise 5000 endogene SSBs, von denen ca. 1% durch unzureichende Reparatur mit konsekutiver Entstehung eines Kollapses von Replikationsgabeln in

DSBs umgewandelt werden. Entstandene ein-endige DSBs aktivieren die HR, welche als Hauptweg für die Reparatur endogener DSBs beschrieben wird (Vilenchik & Knudson, 2003). In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen zeigten die Oct4 A Knockout-Klone eine signifikant höhere Anzahl endogener DSBs, welche mittels  $\gamma$ H2AX-Foci detektiert wurden (Vgl. Abb. 3.3). Diese Beobachtung indiziert eine defiziente HR in Oct4 A-depletierten Zellen.

Eine weitere interessante Erkenntnis ergab sich aus der Beobachtung der Klonogenität (Vgl. Abb. 3.2) und der endogenen DSBs (Vgl. Abb. 3.3) in den Klongruppen. Bei den Oct4 A Wildtyp-Klonen war ein entgegengesetztes Verhalten von Klonogenität und endogener DNA-Schädigung erkennbar: der Klon WT1 mit der geringsten Klonogenität enthielt die meisten spontanen DSBs, während der am besten anwachsende Klon WT3 die geringste Anzahl endogener DSBs aufwies. Bei den Knockout-Klonen hingegen verhielten sich Klonogenität und endogene DNA-Schädigung gleich: z.B. zeigt Klon KO2 sowohl das größte proliferative Potential als auch die meisten endogenen DSBs. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis dafür sein, dass die in Abschnitt 4.1. beschriebene höhere Klonogenität bei Oct4 A Knockout-Klonen im Gegensatz zu den Wildtypen nicht im Zusammenhang mit einer erhöhten HR-Kapazität steht, sondern möglicherweise auf andere Anpassungsmechanismen an die Ausschaltung des Oct4 A Gens zurückzuführen ist.

## **4.2 Bedeutung der Oct4 A-Expression für die zelluläre Radiosensitivität**

### **Erhöhte Strahlenresistenz bei Oct4 A-Expression**

Da die Strahlentherapie eine bedeutsame Rolle in Therapiekonzepten vom HNSCC darstellt, ist es klinisch relevant, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die zu Radioresistenzen führen (Ventelä et al., 2015). In vielen Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass TSZ zu den tumorigenen Zellpopulationen zählen und mit einem großen Anteil zu Therapieresistenzen beitragen (Vgl. Abschnitt 1.2.2.) (Baumann et al., 2008; Schulz et al., 2019; Ventelä et al., 2015). Als Grundlage für Untersuchungen molekularer Mechanismen hinsichtlich Modulationen der HR-Kapazität sollte zunächst geprüft werden, ob die hierfür verwendeten Zellklone der Zelllinie UTSCC5 Oct4 A-abhängige Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Heterogenität in der Radiosensitivität innerhalb der Wildtyp- und Knockout-Klongruppen beobachtet werden, jedoch wiesen die Oct4 A Wildtypen insgesamt eine signifikant höhere Strahlenresistenz auf (Vgl. Abb. 3.4 B).

Der signifikante Unterschied zwischen den Klongruppen wurde maßgeblich durch den radioresistentesten Klon WT3 und den radiosensitivsten Klon KO3 bestimmt. Interessanterweise wiesen die Klone WT3 und KO3 bei Untersuchung der Klonogenität ähnliche Angehraten auf (Vgl. Abb. 3.2) und zeigten innerhalb der jeweiligen Klongruppen die geringsten endogenen DNA-Schäden (Vgl. Abb. 3.3). Letztere Beobachtungen sprechen für eine ähnliche phänotypische Varianz und damit gute Vergleichbarkeit der Klone (Kagohara et al., 2020), was die Bedeutsamkeit des Unterschieds in der Radioresistenz unterstreicht. Die erhöhte Strahlenresistenz bei Oct4 A-Expression könnte auf eine gesteigerte Aktivierung von HR-Faktoren durch den Transkriptionsfaktor nach exogener DNA-Schädigung zurückzuführen sein, die den TSZ die Reparatur strahlenassoziierter DSBs erleichtern (Schulz et al., 2019). Diese Annahme bestätigend, zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression zahlreicher HR-Gene sowie HR-Schlüsselproteine in den Oct4 A-Wildtypen sowie deren geringere Empfindlichkeit auf PARP1-Inhibition. Auch in anderen experimentellen Arbeiten konnte die Expression von Oct4 mit erhöhter Strahlenresistenz in HNSCC-Zelllinien in Verbindung gebracht werden (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021; Ventelä et al., 2015). Nathansen et al. (2021) konnten zudem im Rahmen einer retrospektiven, monozentrischen Studie (n=167) feststellen, dass eine Patientengruppe mit niedriger Oct4-Expression im Vergleich zu einer Gruppe mit intermediärer Expression von Oct4 eine signifikant bessere lokoregionale Kontrolle nach Radiochemotherapie aufwies, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Die beobachteten Unterschiede der Strahlensensibilität innerhalb der Klongruppen könnten unter anderem durch klonogene Variationen in Form von genetischen und epigenetischen Heterogenitäten zu erklären sein (Kagohara et al., 2020). Außerdem können auch im Kontext der Strahlenempfindlichkeit zuvor beschriebene zelluläre Anpassungsmechanismen der Knockout-Klone durch lange Kultivierungszeiten einen Einfluss haben.

### **4.3 Synthetischer Letalitätseffekt durch PARP1-Inhibition bei Oct4 A-Knockout**

PARP1-Inhibitoren stellen einen Meilenstein für neue, zielgerichtete Tumortherapien entsprechend einem synthetisch letalen Ansatz dar. *In vitro* Studien konnten bereits zeigen, dass HR-defiziente HNSCC-Zellen eine Sensitivität auf PARP1-Inhibition aufweisen (Glorieux et al., 2017). Diese präklinischen Ergebnisse werden aktuell in

mehreren klinischen Studien im HNSCC-Bereich geprüft (Glorieux et al., 2017). In dieser Arbeit wurde die Oct4 A-abhängige Sensitivität auf PARP1-Inhibition getestet, um sowohl indirekte Hinweise auf einen HR-Defekt bei Oct4 A-Depletion zu erlangen, als auch den Einsatz von Oct4 A als potenziellen Biomarker für eine Therapie mit PARP1-Inhibition zu prüfen (Hoppe et al., 2018).

### **Oct4 A-abhängige Empfindlichkeit auf alleinige PARP1-Inhibition**

Zunächst wurden beide Klongruppen in unbehandelter Form mit Olaparib behandelt. Wie in Abschnitt 4.1. beschrieben, ist die HR bereits im unbestrahlten Zustand durch endogenen DNA-Stress wie chemische Instabilität oder Replikationsstress aktiv (Kuo Linda J. & Yang Li-Xi, 2008; Saleh-Gohari et al., 2005). Eine alleinige Olaparib-Behandlung könnte folglich auch ohne weitere exogene Schädigungsquellen der DNA dazu beitragen, HR-Kapazitäten bewerten zu können.

Mittels Koloniebildungstests konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle Klone mit geringeren Angehraten auf eine Olaparib-Behandlung reagierten (Vgl. Abb. 3.5, 3.6). Jedoch konnte auch beobachtet werden, dass Oct4 A Knockout-Klone mit geringeren Angehraten insgesamt signifikant sensitiver auf PARP1-Inhibition mit Olaparib reagierten als Oct4 A Wildtyp-Klone (Vgl. Abb. 3.7). Die Beobachtung, dass alle Klone, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, sensitiv auf alleinige Olaparib-Behandlung reagierten, kann unter anderem auf das in mehreren Arbeiten beschriebene PARP-Trapping zurückzuführen sein (Hopkins et al., 2019; Jannetti et al., 2020; Murai et al., 2014). Hierbei kommt es durch das Halten von PARP am DNA-Strang zur Bildung eines PARP-DNA-Komplexes, welcher zum Zusammenbrechen von Replikationsgabeln, Blockierung von Replikationsneustarts und Zytotoxizität führen kann (Bryant et al., 2009; Pommier et al., 2016). *In vitro* Daten von Hopkins et al. (2019) konnten zeigen, dass sich die Toxizität von PARP-Trapping sowohl in Tumorzellen mit als auch ohne HR-Defekt zeigte und somit nicht auf Krebszellen mit HR-Mangel beschränkt ist (Hopkins et al., 2019). Dennoch könnte die noch stärkere Sensitivität von Oct4 A Knockout-Klonen auf eine Olaparib-Monotherapie zusätzlich auf den Effekt der erhöhten genomischen Instabilität nach PARP1-Hemmung zurückgeführt werden, welche bei HR-Defizienz über eine vermehrt aktivierte DNA-Reparatur durch NHEJ entsteht. Der signifikante Unterschied zwischen der Empfindlichkeit auf PARP1-Inhibition zwischen beiden untersuchten Gruppen könnte

also trotz genereller Toxizität der Monotherapie auf eine eingeschränkte HR in Oct4 A Knockout-Klonen hinweisen.

### **Erhöhte Strahlensensibilität durch PARP1-Inhibition bei Oct4 A-Knockout**

Eine Strahlensensibilisierung durch PARP1-Inhibitor bei Oct4 A Knockout-Klonen ist ein funktioneller Hinweis auf einen Zusammenhang von Oct4 A und HR-Aktivität (Hoppe et al., 2018; Schulz et al., 2019; Wurster et al., 2016). Wie bereits beschrieben, bewirkt eine PARP1-Inhibition in Gegenwart von DNA-Schäden, z.B. verursacht durch ionisierende Strahlung, eine Inaktivierung der SSB Reparatur und damit die konsekutive Entstehung von replikationsassoziierten DSBs in der S-Phase, die für Zellen mit HR-Mangel letal sind (Harper et al., 2010; Keung, Wu, & Vadgama, 2019; Wurster et al., 2016). Dieser Effekt des Funktionsverlusts zweier zellulärer Mechanismen wird auch als Synthetische Letalität bezeichnet (Hopkins et al., 2019; Hoppe et al., 2018; Jannetti et al., 2020).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei keinem der Oct4 A Wildtyp-Klone ein signifikanter Radiosensibilisierungseffekt durch PARP1-Inhibition beobachtet werden, während alle Oct4 A Knockout-Klone eine signifikant erhöhte Strahlenempfindlichkeit nach PARP1-Inhibition zeigten (Vgl. Abb. 3.8, 3.9). Da in HPV-negativen HNSCC-Zellen eine Strahlensensibilisierung durch Olaparib mit einem HR-Mangel korreliert, weisen die hier vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Expression von Oct4 A mit einer intakten HR-Aktivität einhergeht und im Gegensatz dazu ein Knockout von Oct4 A auf einen HR-Defekt hinweist (Y. Zhou et al., 2018). Außerdem wird gezeigt, dass eine PARP1-Inhibition bei Oct4 A Knockout einen synthetischen Letalitätseffekt erzielen kann. Die Erkenntnisse könnten auf eine gute Wirksamkeit eines PARP1-Inhibitors in Kombination mit Bestrahlungstherapie bei Patientinnen und Patienten mit niedriger Oct4 A-Expression hinweisen. Im Einklang mit den Ergebnissen konnten Wurster et al. (2016) feststellen, dass die Radiosensibilisierung von HNSCC-Zelllinien durch PARP1-Inhibition von der HR-Aktivität abhängt (Wurster et al., 2016). Auch Dickreuter et al. (2016) beobachteten eine verstärkte Radiosensibilisierung durch die Akkumulation von DSBs bei HPV-negativen HNSCC-Zelllinien durch Olaparib-Behandlung (Dickreuter et al., 2016). Zudem berichteten Venere et al. (2013) signifikante Radiosensibilisierungseffekte durch Olaparib in Glioblastom-Stammzellen *in vitro*, welche neben Unterdrückung der Selbsterneuerung und Wachstumsinhibition auf eine deutliche Erhöhung von DNA-Schäden zurückzuführen war (Venere et al.,

2014). Auch eine *in vivo* Behandlung mit Olaparib schwächte die strahleninduzierte Anreicherung von tumorfördernden Glioblastomzellen ab und hemmte den zentralen TSZ-Phänotyp der Tumoringenieurung (Venere et al., 2014). In der Klinik konnte der PARP1-Inhibitor Olaparib bisher bei einigen HR-eingeschränkten Tumorarten wie dem Ovarial-, Mamma- und dem Prostatakarzinom erfolgreich eingesetzt werden (Rose et al., 2020). Andere Arbeiten konnten jedoch feststellen, dass Tumorzellen auch HR-unabhängig auf PARP1-Inhibitoren reagieren können (Glorieux et al., 2017; Michelena et al., 2018). In diesen Fällen handelt es sich um Tumorzellen mit hohem oxidativen und replikativen Stresslevel. Ein weiterer Grund für eine Strahlensensibilisierung der Oct4 A Knockout-Klone durch Olaparib könnte die Bildung S-Phasen-spezifischer Chromosomenschäden, wie z. B. radiale Chromosomen sein, die bei der Umwandlung von SSBs in DSBs vermehrt entstehen (Schulz et al., 2019; Wurster et al., 2016).

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine HR-Kompetenz bei Oct4 A-Expression hin, die zu einer geringeren Sensitivität auf PARP1-Inhibition und damit zu keiner signifikanten Radiosensibilisierung führt und bei einem Einsatz mit weiteren zielgerichteten Therapien kombiniert werden müsste. Es gibt also erste Hinweise darauf, dass Oct4 A als Biomarker für die Patientenauswahl für den Einsatz von PARP-Inhibitoren dienen könnte.

#### **4.4 Hinweis auf Radiosensibilisierung durch CHK1-Inhibition bei Oct4 A-Expression**

Das Mediatorprotein CHK1 fördert die HR, aktiviert Zellzyklus-Kontrollpunkte, sorgt für die Aktivierung der DNA-Replikation und die Stabilisierung von Replikationsgabeln (Schulz et al., 2019; Sørensen et al., 2005). In der gemeinsam veröffentlichten Arbeit mit Nathansen et al. (2021) konnte bereits eine erhöhte CHK1-Expression in Oct4 A-exprimierenden Zellklonen beobachtet und als ein potenzieller Regulationsmechanismus durch Oct4 A identifiziert werden (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). In dieser Arbeit wurde ergänzend gezeigt, dass vor allem bei den Oct4 A Wildtyp-Klonen eine Strahlensensibilisierung durch den CHK1-Inhibitor MK8776 erzielt werden könnte (Vgl. Abb. 3.10). Diese Beobachtung der möglicherweise erhöhten Anfälligkeit der Oct4 A Wildtyp-Klone auf CHK1-Inhibition könnte einer verstärkten Expression von CHK1 durch Oct4 A zugrundeliegen. In einer anderen Arbeit konnte bereits durch CHK1-Inhibition eine Radiosensibilisierung von HNSCC-Tumorzellen erzielt werden (Zeng et al., 2017). Auch im NSCLC verkleinerte die Behandlung mit

einem CHK1-Inhibitor die Anzahl von TSZ (Bartucci et al., 2012). Oct4 A Knockout-Klone hingegen reagierten weniger stark auf eine CHK1-Inhibition. Gründe hierfür könnten kompensatorisch verstärkte, alternative Reparaturwege sein, die trotz CHK1-Inhibition aktiv sind. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass CHK1 ein entscheidender Regulationspunkt des Transkriptionsfaktors Oct4 A sein könnte und Oct4 A-exprimierende, radioresistentere HNSCC-Tumore potenziell sensibel auf eine CHK1-Therapie reagieren könnten. Der limitierende Faktor der vorliegenden Erkenntnisse ist die geringe Wiederholungszahl des Experiments, weshalb die Ergebnisse nur erste Hinweise darstellen und zukünftig intensiver analysiert werden müssten.

### **4.5 Aktivierung HR-vermittelter DNA-Reparaturmechanismen durch Oct4 A**

#### **Erhöhte Genexpression von ATR, BRCA1 und BRCA2 bei Oct4 A Wildtypen**

Nach Beobachtung des funktionellen HR-Defizits bei Oct4 A Knockout durch erhöhte Empfindlichkeit auf PARP1-Inhibition und einer möglichen Anfälligkeit von Oct4 A Wildtyp-Klonen auf CHK1-Inhibition, wurde die potenzielle HR-Kapazität auf Ebene der Genexpression analysiert. Hierfür wurde die Expression von 83 DNA-Reparaturgenen in einem stellvertretenden Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klon untersucht.

Aus den gemeinsam mit Nathansen et al. (2021) publizierten Ergebnissen wird ersichtlich, dass der analysierte Oct4 A Wildtyp-Klon höhere Expressionsniveaus von HR-Genen aufwies als der Oct4 A Knockout-Klon (Vgl. Abb. 3.11 A). Die deutlichsten Expressionsunterschiede zeigten sich in den DNA-Reparaturgenen ATR, BRCA1 und BRCA2, welche anschließend mittels qPCR analysiert wurden (Vgl. Abb. 3.11 B).

Hierbei konnte zunächst beim Wildtyp-Klon mit deutlicher Tendenz ein Anstieg der ATR-Expression nach Bestrahlung beobachtet werden. Im Kontrast dazu zeigte der Knockout-Klon ein signifikant niedrigeres ATR-Expressionsniveau nach Kombinationsbehandlung. Die beim Wildtyp-Klon erhöhte Genexpression der Proteinkinase ATR, welche für die Regulation des Zellzyklusarrests und für die Initiierung der DNA-Reparatur zuständig ist, weist auf eine verstärkte DNA-Reparatur von TSZ mit Oct 4 A-Expression hin (Buisson et al., 2017; Schulz et al., 2019; Zou & Elledge, 2003). Diese Erkenntnisse unterstützend, beschreiben Schulz et al. (2019) in ihrer Arbeit, dass bei TSZ des Glioblastoms und des Kolonkarzinoms, welche eine Toleranz gegenüber Replikationsstress aufweisen, eine stärkere konsekutive HR-

Aktivierung durch ATR, ATM und CHK1 in der S-Phase erfolgt (Schulz et al., 2019). Außerdem stellten Buisson et al. (2017) im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen fest, dass ATR nach DNA-Schädigung die Interaktion von BRCA1 und PALB2 verstärkt und somit für die notwendige Akkumulation von PALB2, dem Vermittlerprotein der HR, an DSBs erforderlich ist (Buisson et al., 2017). Die verminderte ATR-Expression nach Kombinationsbehandlung beim Knockout-Klon weist dementsprechend auf eine eingeschränkte DNA-Schadensantwort oder verstärkte Aktivierung alternativer Reparaturwege nach exogener DNA-Schädigung bei Oct4 A Knockout hin.

Weiterhin konnte beim HR-Gen BRCA1 im Oct4 A Wildtyp-Klon ein signifikanter Anstieg der Expression nach Bestrahlung beobachtet werden, jedoch keine signifikante Veränderung im Knockout-Klon. Auch beim BRCA2-Gen konnten beim Wildtyp-Klon Tendenzen erhöhter Expression nach Bestrahlung vermutet werden. Die erhöhte BRCA1-Expression nach Bestrahlung bei Oct4-A-Expression bestätigt den Zusammenhang des Transkriptionsfaktors mit einer verstärkten HR-Aktivierung. Im Kontrast hierzu belegt eine unveränderte Expression der beobachteten HR-Gene BRCA1 und BRCA2 nach DNA-Schädigung bei Oct4 A-Knockout eine eingeschränkte HR-Aktivität. BRCA1 ist ein bedeutsames HR-Gen, dessen kodiertes Protein eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von weiteren HR-Reparaturproteinen spielt. Es ist bekannt, dass das HR-Gen BRCA1 für eine Verschiebung einer p53-abhängigen apoptotischen Zellantwort hinzu Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur mitverantwortlich ist. Eine Überexpression von BRCA1 fördert also einen reversiblen Wachstumsstop, welcher bei exogener DNA-Schädigung zu Resistenzen beitragen könnte (MacLachlan et al., 2002; Nathansen, Meyer, et al., 2021). Auch andere Arbeiten konnten bereits von erhöhten BRCA1-Expressionen in radioresistenten Tumorzellen berichten. Lui et al. (2020) untersuchten eine radioresistente, Oct4-überexprimierende HNSCC-Zelllinie und Xenotransplantate auf zugrundeliegende Radioresistenzmechanismen. Hierbei konnten erhöhte BRCA1-, sowie BRCA2-Expressionen beobachtet werden (Koo et al., 2015; Liu et al., 2020). Desweiteren stellten Balbous et al. (2016) bei TSZ des Glioblastoms eine Hochregulation von HR-Genen, insbesondere von RAD51, BRCA1 und BRCA2 fest, die zu verminderter DNA-Schädigung nach Bestrahlung führte (Balbous et al., 2016).

Die Auswahl der stellvertretenden Klone erfolgte gemäß der geringsten klonalen Variation und somit einer Ähnlichkeit der phänotypischen Varianz der Klone. Sowohl der Oct4 A Wildtyp-Klon WT3 als auch der Oct4 A Knockout-Klon KO2 konnten

innerhalb ihrer Klongruppen das größte proliferative Potential, gemessen an der Plattierungseffizienz, aufweisen (Vgl. Abb. 3.2). Außerdem zeigen beide Stellvertreter-Klone das ähnlichste Verhalten in der Radiosensitivität (Vgl. Abb. 3.4). Die vergleichsweise geringeren phänotypischen Differenzen bestärken also die beobachteten signifikanten Unterschiede in der HR-Expression.

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine Oct4 A-abhängige HR-Regulation nach DNA-Schädigung hin, welche u.a. durch eine direkte oder indirekte Aktivierung von ATR, BRCA1 und BRCA2 vermittelt wird.

### **Oct4 A-abhängige Expression von HR-Proteinen ohne Behandlung**

Da Veränderungen auf Proteinebene in Quantität und Lokalisation aktuelle zelluläre Prozesse abbilden, können sie auch als Momentaufnahme der HR-Aktivität verstanden werden (Hoppe et al., 2018). Deshalb wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors Oct4 A auf die Expression wichtiger HR-Proteine in unbehandelten HNSCC-Zellen untersucht. Bereits im unbehandelten Zustand entwickeln TSZ aufgrund von spontanem Replikationsstress adaptive Mechanismen u.a. in Form einer vermehrt aktivierten DNA-Schadensantwort um ihre Genomintegrität und Selbsterneuerungskapazitäten aufrechtzuerhalten (Carruthers et al., 2018; Nathansen, Meyer, et al., 2021; Schulz et al., 2019). Eine Beobachtung unbehandelter Klone ermöglicht demnach, die HR-Aktivität ohne zusätzliche Einflüsse exogener Therapien, wie z.B. eine Akkumulation von TSZ nach Bestrahlung, zu bewerten (Schulz et al., 2019). Die Auswahl der untersuchten Proteine umfasst wichtige Schlüsselproteine auf verschiedenen Ebenen der HR und der HR-Aktivierung.

Hierbei zeigte sich zunächst, dass die HR-Schlüsselproteine BRCA1 und BRCA2 bei den Oct4 A Wildtypen tendenziell erhöht exprimiert waren, jedoch nicht signifikant (Vgl. Abb. 3.12). Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, tragen sowohl BRCA1 als auch BRCA2 entscheidend zur Einleitung der HR bei, indem sie weitere HR-Faktoren rekrutieren und die Bindung an die DNA-Bruchstelle initiieren (Boulton, 2006). Einige zuvor aufgeführte Arbeiten konnten den Zusammenhang zwischen Therapieresistenz von TSZ und erhöhten BRCA1- und BRCA2-Expressionen auf genomischer Ebene bereits belegen. Dass die vorliegenden Ergebnisse nicht signifikant waren, kann zudem auf die Anzahl der durchgeführten unabhängigen Experimente und auf kompensatorische Anpassungsmechanismen durch persistierenden Gen-Knockout zurückzuführen sein.

Weiterhin konnte eine signifikant erhöhte Expression des HR-Interaktionsproteins PALB2 und des FA-Proteins FANCD2 in Oct4 A Wildtyp-Klonen im Gegensatz zu Oct4 A Knockout-Klonen gezeigt werden. Diese Beobachtungen unterstützten ebenfalls die Hypothese einer eingeschränkten HR-Aktivität bei Oct4 A Depletion. Das FA-Protein FANCD2 ist ein Faktor, der für die mit der HR interagierenden Interstrand-Crosslink-Reparatur (ICL-Reparatur) essentiell ist und eine bedeutsame Rolle bei der Koordination von Prozessen der DNA-Schadensantwort und effizienter Reparatur von DNA-Schäden, u.a. durch HR, spielt (Nathansen, Meyer, et al., 2021; Schulz et al., 2019). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigend, konnten Bertrand et al. (2014) eine Überexpression von FA-Proteinen in ALDH1-positiven TSZ beobachten (Bertrand et al., 2014). Interessanterweise wurde im klinischen Kontext mehrfach beschrieben, dass Personen mit Defekten der FA-Gene häufig HNSCC-Tumore entwickeln, die im Vergleich zu sporadischen Tumoren erhöhte TSZ-Zahlen aufweisen (Carruthers et al., 2015; Schulz et al., 2019). Das in Oct4 A Wildtyp-Klonen signifikant vermehrt exprimierte Interaktionsprotein PALB2 ist ein weiteres HR-Schlüsselprotein, das zur gesteigerten HR-Aktivität bei Oct4 A-Expression beitragen könnte. PALB2 interagiert direkt mit HR-Protein RAD51 und verstärkt dessen Stranginvasionsaktivität (Wu et al., 2020). Bekannte PALB2-Mutationen in anderen Tumorerkrankungen wie Mamma-, Pankreas und Ovarialkarzinom unterstützen die Bedeutsamkeit des HR-Proteins für die zelluläre Genomintegrität (Wu et al., 2020).

Zuletzt zeigten die Untersuchungen nicht signifikante, jedoch tendenziell erhöhte Expressionen der HR-Proteine RAD54L, CHK1, RAD51 und HOP in den Oct4 A Wildtyp-Klonen im Vergleich zu Oct4 A Knockout-Klonen. Auch das tendenziell erhöhte Reparaturprotein RAD54L in Oct4 A Wildtyp-Klonen fördert über eine Interaktion mit RAD51 die Stranginvasion während der HR (Pezza et al., 2014). Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen stellten Nathansen et al. (2021) bei der Analyse von HNSCC-Tumorgewebe eine erhöhte Expression von RAD54L im Vergleich zu gesundem Gewebe fest (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Außerdem wurde mittels Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) nachgewiesen, dass der Transkriptionsfaktor Oct4 A in pluripotenten embryonalen NCCIT-Karzinomzellen an eine Promotorregion des RAD54L-Gens bindet und das HR-Gen somit direkt reguliert (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Dass die vorliegenden Ergebnisse nicht signifikant waren, kann auf die geringe Anzahl der zweifach durchgeführten unabhängigen Experimente (n=2) zurückzuführen sein.

Das bedeutsame Mediatorprotein CHK1 war in den Oct4 A Wildtypen nicht signifikant erhöht, dennoch war eine Tendenz erkennbar (Schulz et al., 2019; Sørensen et al., 2005). Vereinbar mit dieser Beobachtung zeigten Nathansen et al. (2021) eine Herunterregulierung des CHK1-Gens in Oct4 A Knockout-Klonen sowie eine Koexpression mit den HR-Genen RAD54L und HOP2. Außerdem konnte auch im CHK1-Gen eine Oct4 A-bindende Promotorregion detektiert werden (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). In einer weiteren Arbeit wurde über eine Korrelation von CHK1 und Oct4-Proteinexpression im Kontext von Radioresistenz beim Zervixkarzinom (Rachmadi et al., 2019) berichtet. Diese Beobachtungen unterstützen die zuvor untersuchte Radiosensibilisierung von Oct4 A-exprimierenden Klonen durch CHK1-Inhibition (Vgl. Abb. 3.10) und deuten damit auf eine potenzielle direkte Regulation von CHK1 durch den Transkriptionsfaktor Oct4 A hin, die zur Radioresistenz im HNSCC beitragen könnte. Die fehlende Signifikanz könnte auf zu geringe Experimentwiederholungen, Anpassungsmechanismen der Knockout-Klone und vergleichsweise verminderte Differenzen der HR-Aktivität im unbehandelten Zustand zurückzuführen sein.

Auch RAD51, das den DNA-Strangaustausch koordiniert und durch HOP2 und RAD54L stimuliert wird, war in Oct4 A Wildtyp-Klonen tendenziell erhöht. Diese Beobachtung unterstützend konnte auch in TSZ des Glioblastoms eine erhöhte HR-Aktivität durch eine RAD51-Hochregulierung gezeigt werden (Balbous et al., 2016).

Die tendenziell erhöhte Oct4 A-abhängige Proteinexpression von HOP2 trägt ebenfalls über Beteiligung an der DNA-Stranginvasion durch RAD51-Stimulation zu erhöhter HR-Aktivität bei (Peng et al., 2013; Pezza et al., 2014). Nathansen et al. (2021) konnten das HR-Protein HOP2 neben RAD54L und CHK1 als direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors Oct4 A identifizieren (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Peng et al. konnten außerdem zeigen, dass HOP2 in frühen Stadien der Stammzellendifferenzierung hochreguliert ist und Zellen mit mutierten HOP2 eine geringere Differenzierungskapazität aufweisen (Peng et al., 2013). Oct4 A stellt demnach einen potenziellen Regulator des HOP2-Gens in HNSCC-TSZ dar und trägt damit möglicherweise zur Radioresistenz bei.

Zusammenfassend konnte bei Oct4 A Wildtyp-Klonen im Vergleich zu Oct4 A Knockout-Klonen im unbehandelten Zustand eine insgesamt erhöhte Expression von HR-Proteinen beobachtet werden (Vgl. Abb. 3.14). Es ist davon auszugehen, dass nach einer exogenen DNA-Schädigung in Form von Bestrahlungstherapie eine noch

stärkere Schadensantwort zu beobachten wäre (Carruthers et al., 2018). Trotz zum Teil nur tendenziell erhöhter Proteinexpressionen und demnach geringfügiger Ungleichgewichte, könnten die beobachteten Unterschiede ausreichend sein, um die Reparaturkapazität der gesamten HR-Maschinerie zu beeinflussen (Wurster et al., 2016). Die Ergebnisse weisen also darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor Oct4 A in direkter und indirekter Weise mit HR-Genen interagiert und so entscheidend zur HNSCC-Radioresistenz beiträgt.

### **Kolokalisation von $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci bei Oct4 A Knockout**

Um zuletzt indirekt den Zusammenhang zwischen Oct4 A-Expression und HR zu untersuchen, wurden Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klone bestrahlt und anschließend nach 24 Stunden  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci parallel in beiden untersuchten Gruppen markiert und analysiert. Grundlage für diese Untersuchung ist die Annahme, dass die Kolokalisation von  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci nach Bestrahlung auf ein-endige, replikationsassoziierte DNA-Schäden und damit auf eine verminderte HR-Aktivität hinweist (Gagou et al., 2010; Harper et al., 2010). Die H2AX-Phosphorylierung an Serin 139 ( $\gamma$ H2AX) ist ein sensibler Marker für DNA-Schäden in Form von DSBs, welche im Kontext von Bestrahlungstherapie durch die ionisierende Strahlung direkt induziert werden (offene DSBs), sich innerhalb DNA-Cluster-Schäden präsentieren (DSB-Cluster) oder nach gescheitertem Neustart blockierter Replikationsgabeln in der S-Phase entstehen (replikationsassoziierte DSBs) (Gagou et al., 2010; Harper et al., 2010; Huang & Zhou, 2020; Ivashkevich et al., 2011). Die letztgenannte Entstehungsart von DSBs ist neben der Phosphorylierung von H2AX, im Gegensatz zu anderen DSB-Ursprüngen, stets mit RPA-Foci assoziiert. Das RPA-Protein bindet einzelsträngige DNA-Überhänge, die durch das Weiterlaufen des Helikasekomplexes während blockierter Replikationsgabeln entstehen, und aktiviert über ATR Claspin und CHK1, wodurch unter anderem die HR initiiert wird (Gagou et al., 2010; Harper et al., 2010). Da also der Neustart sowie Stabilisierung blockierter Replikationsgabeln maßgeblich durch HR-Faktoren gefördert wird und entstandene replikationsassoziierte DSBs hauptsächlich durch HR repariert werden, stellen replikationsassoziierte DSBs indirekte Marker der HR-Kapazität dar (Harper et al., 2010; Meyer et al., 2020; Saintigny et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wird bei den vermutlich HR-profizienten Oct4 A Wildtyp-Klonen eine signifikante Differenz zwischen  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci nach Bestrahlung

sichtbar (Vgl. Abb. 3.15). Bei allen Oct4 A Knockout-Klonen hingegen wurden vergleichbare, sich nicht signifikant unterscheidende  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci und damit eine Kollokalisierung beider Proteine beobachtet (Vgl. Abb. 3.16). Wie oben beschrieben, weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine verminderte HR-Aktivität bei Oct4 A-Knockout hin, da diese Klone scheinbar ausschließlich replikationsassoziierte DSBs nicht reparierten. Bei den Oct4 A Wildtyp-Klonen wurde sichtbar, dass die markierten DSBs neben den geringeren, effektiver reparierten replikationsassoziierten DSBs auch aus direkten Schäden durch die ionisierende Strahlung entstanden sind, welche nicht zwingend durch die HR repariert werden. Diese Ergebnisse unterstützend, konnten auch Meyer et al. (2020) bei HR-defizienten, therapiesensitiven Zellen des Mammakarzinoms erhöhte Level von Replikationsstress mithilfe einer parallelen Markierung von  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci nach Behandlung nachweisen (Meyer et al., 2020). Zudem stimmt die zuvor gewonnene Erkenntnis einer erhöhten CHK1-Expression durch direkte Oct4 A-Interaktion in Wildtyp-Klonen mit der geringeren Anzahl replikationsassoziiierter DSBs überein, da CHK1 mittels Einleitung eines S-Phase-Arrests und HR-Aktivierung über RAD51 und BRCA2 maßgeblich am Schutz vor Zusammenbruch von Replikationsgabeln beteiligt ist (Vgl. Abb. 3.13) (Gagou et al., 2010; Meyer et al., 2020). Bei CHK1-depletierten, HR-defizienten Zellen des Kolonkarzinoms konnten Gagou et al. (2010) ebenfalls eine Kollokalisierung von  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci beobachten, was den komplexen Zusammenhang zwischen replikationsassoziierten DNA-Schäden und einem HR-Defekt mit u.a. verminderter CHK1-Expression bestätigt (Gagou et al., 2010). Die vermehrt nicht replikationsassoziierten mit  $\gamma$ H2AX markierten DSBs in Oct4 A Wildtyp-Klonen könnten auf direkte Strahlenschäden, wie offene DSBs ohne RPA-Dekoration, beispielsweise in der G1-Phase, oder Cluster-Schäden, zurückzuführen sein. Ein Grund hierfür könnten individuelle zelluläre Anpassungsstrategien der Knockout-Klone auf der Ebene anderer DNA-Reparaturwege darstellen. Zum Beispiel können offene DSBs zum größten Teil durch NHEJ und seltener durch HR repariert werden (Harper et al., 2010). Dieser Reparaturweg könnte eventuell bei Oct4 A Knockout-Klonen kompensatorisch verstärkt aktiviert sein. Zudem könnten die Knockout-Klone eine effektivere BER im Rahmen direkter Strahlenschäden aufweisen. Dies würde mit der zuvor beobachteten stärkeren Sensitivität auf PARP1-Inhibition kongruieren, da das Enzym PARP1 DNA-SSBs erkennt und bindet und an der BER beteiligt ist (Vgl. Abb. 3.9) (Harper et al., 2010). Ein limitierender Faktor der indirekten HR-

Kapazitätsmessung dieses Experiments ist die Unkenntnis über vorliegende DNA-Schäden zu mehreren Zeitpunkten nach Behandlung und die unzureichende Wiederholung des Experiments. Dennoch wurden in einem Durchgang des Experiments bis zu 150 Zellen in den jeweiligen Klonen analysiert.

### 4.6 Zusammenfassung und klinischer Bezug

Eine hohe Radioresistenz der HNSCC-Tumore gilt als bedeutsamer Faktor bei den bisher unzureichenden Therapieerfolgen des sechsthäufigsten Karzinoms weltweit (Ventelä et al., 2015). Mehrere Arbeiten konnten bereits die Expression des TSZ-Transkriptionsfaktors Oct4 im HNSCC mit einem schlechten Tumordifferenzierungsgrad, Aggressivität und verringertem Patientenüberleben nach Strahlentherapie in Verbindung bringen, jedoch sind zugrundeliegende molekulare Mechanismen bisher wenig untersucht (Koo et al., 2015; Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021; Ventelä et al., 2015). Das Ziel dieser Arbeit war es, den Beitrag der Isoform A des TSZ-Transkriptionsfaktors Oct4 zur HNSCC-Radioresistenz extensiv zu untersuchen. Hierbei lag der Fokus auf der Beobachtung einer HR-Regulation durch den Transkriptionsfaktor als entscheidenden Resistenzmechanismus und potenziellen Angriffspunkt für Strahlensensibilisierung, da bereits bekannt ist, dass eine verstärkt aktivierte HR in TSZ zu weniger replikationsassoziierten DNA-Schäden, chromosomaler Stabilität und Therapieresistenzen führen kann (Nathansen, Meyer, et al., 2021; Schulz et al., 2019).

Hierbei konnten bis auf leichte Tendenzen eines schnelleren Wachstums bei Oct4 A Wildtyp-Klonen keine eindeutigen Oct4 A-abhängigen Unterschiede im proliferativen Potenzial der Klone beobachtet werden (Vgl. Abb. 3.1). Entgegen der Erwartungen zeigten Oct4 A Knockout-Klone insgesamt eine signifikant höhere Klonogenität als die Oct4 A Wildtyp-Klone, was mit kompensatorischen Überlebensmechanismen im Rahmen der Zellkultivierung zu erklären sein könnte (Vgl. Abb. 3.2). Weiterhin konnte bei Untersuchung endogener DNA-Schäden nach Oct4 A Knockout eine signifikant höhere Anzahl endogener, mit  $\gamma$ H2AX markierter DSBs gezeigt werden, welche unter anderem aus Replikationsstress resultieren und demnach auf eine eingeschränkte HR in Oct4 A-depletierten, unbehandelten Zellen hinweisen könnten (Vgl. Abb. 3.3) (Kuo Linda J. & Yang Li-Xi, 2008; Tanaka et al., 2006). Als Grundlage für weitere Untersuchungen wurde die *in vitro* Radiosensibilität der HNSCC-Klone untersucht. Innerhalb der Klongruppen konnte hierbei eine auf klonale Varianz zurückzuführende

Heterogenität gezeigt werden, jedoch zeigten Oct4 A Knockout-Zellen insgesamt eine signifikant höhere Strahlenempfindlichkeit (Vgl. Abb. 3.4 B). Diese Ergebnisse weisen auf eine Notwendigkeit von Kombinationstherapien bei HNSCC-Patientinnen und Patienten mit Oct4 A-Expression hin.

Da eine fehlende Radiosensibilisierung nach PARP1-Inhibition auf eine intakte bzw. hochregulierte HR hinweist, dienen Koloniebildungstests mit Olaparib-Behandlung als indirekte Analyse der Oct4 A-abhängigen HR-Kapazität (Jannetti et al., 2020; Keung et al., 2019). Bereits die alleinige Behandlung durch PARP1-Inhibition zeigte für Oct4 A Knockout-Klone eine deutlich höhere Sensibilität im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen (Vgl. Abb. 3.7). Bei kombinierter PARP1-Inhibition mit Bestrahlung zeigten die Oct4 A-depletierten Zellklone ebenfalls eine signifikante Radiosensibilisierung entsprechend eines synthetischen Letalitätseffekts durch Olaparib (Vgl. Abb. 3.9). Die Expression des TSZ-Transkriptionsfaktors Oct4 A könnte demnach als ein potenzieller, orientierender Biomarker für den Einsatz von PARP-Inhibitoren dienen: während bei HNSCC-Patientinnen und Patienten mit verminderter Oct4 A-Expression die Bestrahlungswirkung durch PARP-Inhibition verstärkt werden könnte, würden bei Patientinnen und Patienten mit vermehrter bzw. intermediärer Oct4 A-Expression, welche mit einer verminderten lokoregionalen Tumorkontrolle nach Radiochemotherapie assoziiert ist, nicht von einer Therapie mit Olaparib profitieren (Vgl. Abb. 3.8). Hier gilt es weitere Kombinationstherapien, wie z.B. CHK1-Inhibitoren mit Bestrahlungstherapie (und ggf. PARP-Inhibition) intensiver zu analysieren (Vgl. Abb. 3.10) (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021; van Harten et al., 2019).

Bei der Untersuchung der HR-Kapazität auf der Ebene der Genexpression von 83 DNA-Reparaturgenen konnten bei einem stellvertretenden Oct4 A Wildtyp-Klon insgesamt höhere Expressionsniveaus von HR-Genen beobachtet werden (Vgl. Abb. 3.11 A). Vor allem die Expression der Reparaturgene ATR und BRCA1 stiegen bei Oct4 A Wildtyp-Klonen nach Behandlung an, was auf eine starke Antwort auf Replikationsstress durch erhöhte HR-Kapazität bei Oct4-Expression hinweist und einer fehlenden Radiosensibilisierung durch PARP1-Inhibition entspricht. (Vgl. Abb. 3.8, 3.11 B). Anschließend konnte bei Oct4 A Wildtyp-Klonen insgesamt eine erhöhte Expression von HR-Proteinen beobachtet werden (Vgl. Abb. 3.14). Für die HR-Gene HOP2, RAD54L und CHK1 wurden in einer gemeinsamen Arbeit bereits Promotorregionen für direkte Interaktion mit Oct4 A beobachtet (Nathansen, Lukiyanchuk, et al., 2021). Außerdem zeigten FANCD2 und PALB2 signifikant erhöhte

Proteinexpressionen, die entweder auf direkter Geninteraktion beruhen oder indirekt stimuliert werden und zur HR-vermittelten Radioresistenz beitragen könnten. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer verstärkten HR-Aktivierung bei Oct4 A-Expression als möglichen Therapieresistenzmechanismus beim HNSCC. Außerdem bieten identifizierte HR-Gene und Proteine mögliche Angriffspunkte für radiosensibilisierende Kombinationstherapien wie z.B. eine CHK1-Inhibition bei Oct4 A-Expression.

Diese Beobachtungen bestätigend zeigten die Oct4 A Knockout-Klone nach Bestrahlung eine ausgeprägte Kolo-kalisation von  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci (Vgl. Abb. 3.16). Diese Beobachtung ist ein indirekter Hinweis auf eine höhere Menge ein-ender, replikationsassoziiertes DNA-Schäden bei Oct4 A-Depletion, die nicht durch HR repariert werden konnten und die Hypothese eines HR-Mangels bei Oct4 A-Knockout unterstützt. Weiterhin korrelierten aufgetretene RPA-Foci mit einer niedrigeren CHK1-Expression in beiden Klongruppen (Daten nicht gezeigt), was dem Mediatorprotein CHK1, dessen Gen direkt mit Oct4 A interagiert, die Rolle eines relevanten Regulationspunkts des TSZ-Transkriptionsfaktor Oct4 A zuschreibt und als Angriffspunkt für radiosensibilisierende Therapien angezielt werden könnte.

Zusammenfassend konnten folgende Zusammenhänge beobachtet und damit die Fragestellungen der Zielsetzung dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Oct4 A-exprimierende TSZ im HNSCC könnten über eine verstärkte HR-Aktivierung (über direkte oder indirekte Wirkungen auf BRCA1, PALB2, FANCD2, RAD51, RAD54L, HOP2 und CHK1) zur Therapieresistenz nach Bestrahlung beitragen.
2. HNSCC-Tumorzellen, die Oct4 A nicht oder im geringeren Maße exprimieren, könnten einen HR-Mangel aufweisen und auf der molekularen Grundlage eines synthetischen Letalitätseffekts durch PARP1-Inhibitor strahlensensibilisiert werden. Die Oct4 A-Expression könnte demnach als Biomarker für die Patientenauswahl für den Einsatz von PARP-Inhibitoren dienen.
3. Es gibt Hinweise dafür, dass HNSCC-Tumorzellen, die Oct4 A exprimieren, aufgrund einer erhöhten Koexpression von HR-Faktoren wie CHK1, RAD54L und HOP2 durch einen CHK1-Inhibitor strahlensensibilisiert werden könnten.

### 4.7 Ausblick

Um die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Hinweise auf eine Oct4 A-abhängige HR-Regulation in TSZ des HNSCC zu erweitern, müssten in zukünftigen Experimenten zunächst weitere *in vitro* Verfahren zur Analyse replikationsassoziierter HR-Funktionen durchgeführt werden. Hierfür eigneten sich beispielsweise ein Plasmid-Rekonstruktionsassay in Oct4 A Wildtyp- und Knockout-Klonen, welcher die Fähigkeit der DSB-Reparatur untersucht, sowie die Bestimmung von RAD51-Foci nach DNA-Schädigung, als funktionelle Marker für die HR (Hoppe et al., 2018; Saleh-Gohari et al., 2005). Zusätzlich könnte mithilfe des DNA-Fiber-Assays die HR-abhängige DNA-Replikationsprogression analysiert werden. Hinsichtlich der HR-Beurteilung auf Ebene der Proteinexpression könnten die aktivierten Formen der HR-Proteine untersucht werden. Zudem wäre es interessant, die Interaktion der Proteine BRCA1, PALB2, FANCD2, RAD54L, HOP2 und CHK1 in Oct4 A exprimierenden Zellklonen durch immunzytochemische Analysen zu untersuchen. Um die Aktivierung von HR-Faktoren durch den TSZ-Transkriptionsfaktor Oct4 A zu spezifizieren, wäre es notwendig, direkte oder indirekte Formen der Regulation zu untersuchen und Zeitverlaufsanalysen durchzuführen. Hierfür könnten mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) potenzielle Bindungsstellen auf den in der vorliegenden Arbeit identifizierten HR-Genen identifiziert werden, um therapeutische Angriffsziele zu definieren. Um die Bedeutung der TSZ im HNSCC für Radioresistenzen zu unterstreichen, könnten die TSZ mittels Durchflusszytometrie isoliert und anschließend mit oben genannten HR-Experimenten weiter charakterisiert werden.

Neben der Identifizierung molekularer Grundlagen der HNSCC-Radioresistenzen ist es für die Klinik bedeutsam, für HNSCC-Patientinnen und Patienten mit Oct4 A-Expression der Tumore radiosensibilisierende Kombinationstherapien zu untersuchen. Nach hier gewonnenen Erkenntnissen eignete sich hierfür die intensive Prüfung von CHK1- und ATR-Inhibitoren in Kombination mit Bestrahlung und ggf. PARP-Inhibition bei Oct4 A-Expression. Zudem könnten weiterführende Experimente die Wirksamkeit einer PARP-Inhibition bei Oct4 A-Mangel im HNSCC validieren, um die Funktion des Transkriptionsfaktors Oct4 A als Biomarker für PARP-Inhibitor-Therapien zu qualifizieren.

## 5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) verzeichnen eine geringe 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate mit einer hohen Rezidivrate durch Therapieversagen. Es ist bekannt, dass Tumorstammzellen (TSZ), die eine tumorigene Subpopulation von HNSCC-Tumoren darstellen und stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen, eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Therapieresistenzen spielen. Zu den bereits identifizierten Resistenzmechanismen der TSZ gehört eine erhöhte DNA-Reparatur u.a. durch verstärkt aktivierte Homologe Rekombination (HR). Zudem konnte bei den HNSCC-TSZ der Transkriptionsfaktor Oct4 A identifiziert werden, der zur Resistenzbildung beitragen könnte. Die Untersuchung des Zusammenhangs von Oct4-exprimierenden TSZ im HNSCC und HR-Kapazität im Kontext von Radioresistenz könnte dazu beitragen, TSZ-gerichtete Therapiekonzepte weiterzuentwickeln. Für die Experimente dienten mittels small-interfering RNA (siRNA) etablierte Oct4 A Knockout-Zellen und Wildtyp-Klone der HNSCC Zelllinie UTSCC5.

Als Zeichen einer Oct4 A-abhängigen HR-Aktivierung zeigten die strahlensensibleren Oct4 A Knockout-Klone zunächst höhere mittels  $\gamma$ H2AX-Foci quantifizierte endogene DNA-Schäden als Oct4 A Wildtyp-Klone. Weiterhin wiesen Zellen mit Oct4 A Knockout nach PCR-Analyse niedrigere Expressionsniveaus von Reparaturgenen nach Bestrahlung auf. Auch die mittels Western Blot quantifizierte Expression von HR-Proteinen wie BRCA1, PALB2, FANCD2, RAD51, RAD54L, HOP2 und CHK1 war bei Oct4 A Knockout-Klonen erniedrigt. In Koloniebildungsassays konnten HR-defiziente Oct4 A Knockout-Klone im Gegensatz zu Oct4 A Wildtyp-Klonen durch den synthetischen Letalitätseffekt durch PARP1-Inhibition strahlensensibilisiert werden. Zudem wurden ebenfalls in Koloniebildungsassays Hinweise einer Radiosensibilisierung durch CHK1-Inhibition bei Oct4 A-Expression gezeigt. Zuletzt wurde eine Kolo-kalisation von  $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci bei Oct4 A Knockout-Klonen beobachtet, was indirekt auf mehr replikationsassoziierte DNA-Schäden und damit eine eingeschränkte HR bei Oct4 A-Depletion hinweist.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass Oct4 A-exprimierende TSZ im HNSCC über eine verstärkte HR zur Therapieresistenz nach Bestrahlung beitragen könnten und HNSCC-TSZ mit geringer Oct4 A Expression durch den PARP1-Inhibitor Olaparib radiosensibilisiert werden können. Die Oct4 A Expression könnte demnach als Biomarker für die Patientenauswahl für einen Einsatz von PARP-Inhibitoren dienen.

### 5.1 Summary

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) record a low 5-year overall survival rate with a high recurrence rate due to treatment failure. Cancer stem cells (CSC), which represent a tumorigenic subpopulation of HNSCC tumors and have stem cell-like properties, are known to play a significant role in the development of therapy resistance. The resistance mechanisms of CSC that have already been identified include increased DNA repair through, among others, increased activated homologous recombination (HR). In addition, the transcription factor Oct4 A could be identified in HNSCC-CSC, which could contribute to the development of therapy resistance. The investigation of the association between Oct4-expressing CSC in HNSCC and HR capacity in the context of radioresistance could contribute to the further development of CSC-targeted therapy concepts. For the experiments, Oct4 A knockout cells established by siRNA and wild-type clones of the HNSCC cell line UTSCC5 were used.

As a sign of Oct4 A-dependent HR activation, the more radiosensitive Oct4 A knockout clones initially showed higher endogenous DNA damage quantified by  $\gamma$ H2AX foci than Oct4 A wild-type clones. Furthermore, cells with Oct4 A knockout showed lower expression levels of repair genes after irradiation according to PCR analysis. Western blot quantified expression of HR proteins such as BRCA1, PALB2, FANCD2, RAD51, RAD54L, HOP2 and CHK1 was also decreased in Oct4 A knockout clones. In colony formation assays, HR-deficient Oct4 A knockout clones could be radiosensitized by the synthetic lethality effect of PARP1 inhibition, in contrast to Oct4 A wild-type clones. In addition, evidence of radiosensitization by CHK1 inhibition upon Oct4 A expression was also shown in colony formation assays. Last, colocalisation of  $\gamma$ H2AX and RPA foci was observed in Oct4 A knockout clones, indirectly indicating more replication-associated DNA damage and thus limited HR upon Oct4 A depletion.

In summary, this dissertation demonstrates that Oct4 A-expressing CSC in HNSCC may contribute to treatment resistance after radiation via enhanced HR, and HNSCC CSC with low Oct4 A expression may be radiosensitized by PARP1 inhibition. Oct4 A expression could thus serve as a biomarker for patient selection for PARP inhibitor use.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ALDH1 .....	<i>Aldehyd Dehydrogenase 1</i>
AML.....	<i>Akute myeloische Leukämie</i>
ATM .....	<i>Ataxia telangiectasia-mutated</i>
ATR.....	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
BCA.....	<i>Bicinchoninsäure</i>
BER.....	<i>Basenexzisionsreparatur</i>
BIR .....	<i>Breakage-induced replication</i>
BRCA1 .....	<i>Breast cancer-1 protein</i>
BRCA2 .....	<i>Breast cancer-2 protein</i>
BSA.....	<i>Bovine serum albumine</i>
C .....	<i>Carboxy</i>
CDK .....	<i>Cyclin-abhängige Kinase</i>
CDX-2 .....	<i>Caudale-Homöobox-Protein 2</i>
ChIP .....	<i>Chromatin-Immünpräzipitation</i>
CHK1 .....	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHK2 .....	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CtIP.....	<i>CtBP-interacting protein</i>
D .....	<i>Displacement</i>
DDR .....	<i>DNA damage response</i>
dH <sub>2</sub> O .....	<i>Destilliertes H<sub>2</sub>O</i>
dHJ.....	<i>Double-Holliday Junction model</i>
<i>D-Loop</i> .....	<i>Displacement loop</i>
DMEM .....	<i>Dulbecco's Modified Eage's Medium</i>
DMSO .....	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA .....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DNA-PKcs.....	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
dNTP .....	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>
DPBS .....	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSB.....	<i>DNA double-strand break</i>
DTT .....	<i>Dithiothreitol</i>
EBV .....	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EDTA .....	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>

EGF	Epidermal-Growth-Factor
FA	Fanconi-Anämie
FANCD2	Fanconi-Anämie-Gruppe-D2-Protein
FKS	Fetales Kälberserum
H2AX	H2A histone family member X
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HJ	Holiday junction
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HOP2	Homologous-pairing protein 2
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Homologe Rekombination
HSC 70	Heat shock cognate 71 kDa protein
ICL	Interstrand-crosslink
IgG	Antikörper vom Typ Immunglobulin-G
KO	Knockout-Klon
MMR	Mismatch-Reparatur
MRN	Proteinkomplex aus MRE11, RAD50, NBS1
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
N	Amino
NaCl	Natriumchlorid
NaF0	Natriumfluorid
NCCIT	Modell-Zelllinie eines pluripotenten embryonalen Karzinoms
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Non-homologous end joining
NNH	Nasennebenhöhlen
Oct3	Octamer binding transcription factor 3
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
PALB2	Partner and localizer of BRCA-2
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
PE	Plating-efficiency

Pi3K .....	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PIK3CA .....	<i>hosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase</i>
PMSF .....	<i>Phenylmethylsulfonylfluorid</i>
POU5F1 .....	<i>Pit-Oct-Unc Class 5 Homeobox 1</i>
pRB .....	<i>Retinoblastom-Protein</i>
qPCR .....	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
RAD51 .....	<i>Radiation 51</i>
RAD54 .....	<i>Radiation 54</i>
RAD54L .....	<i>Radiation 54L</i>
ROS .....	<i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>
RPA.....	<i>Replikationsprotein A</i>
rpm.....	<i>Revolutions per minute</i>
RS.....	<i>Replikationsstress</i>
S .....	<i>Synthese</i>
SDS.....	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
SDSA .....	<i>Synthesis-dependent strand annealing</i>
SDS-PAGE .....	<i>Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel Elektrophorese</i>
SEM .....	<i>Standardfehler</i>
SF .....	<i>Surviving-fraction</i>
siRNA.....	<i>Small interfering RNA</i>
Sox-2.....	<i>Sex determining region Y (SRY)- box 2</i>
SSB.....	<i>DNA single-strand break</i>
ssDNA.....	<i>Single stranded DNA</i>
TBS.....	<i>Tris-buffered saline</i>
TP53 .....	<i>Tumorsuppressor-Gen des Protein p53</i>
TSZ .....	<i>Tumorstammzelle</i>
UTSCC5.....	<i>University of Turku-Squamosa Cell Cacinoma-5</i>
WT .....	<i>Wildtyp-Klon</i>
Y .....	<i>Gamma</i>
γH2AX.....	<i>Phosphorylated (γ) H2A histone family member</i>

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hals-Kopf-Region.....	1
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des TSZ-Plastizitätsmodells.....	6
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der TSZ-Strahlenresistenzmechanismen..	8
Abbildung 1.4: Strukturelle Darstellung des Oct4-Gens, mRNA-Isoformen und Proteinprodukte.....	11
Abbildung 1.5: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der HNSCC-Patientinnen und Patienten (n=119) mit unterschiedlichen Oct4-Expressionen.....	12
Abbildung 1.6: Strukturelle Darstellung der DNA-Schadensantwort auf Replikationsstress.....	15
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Homologen Rekombination. ....	16
Abbildung 2.1: Ablauf des Oct4 A-Knockouts (KO) in UTSCC5 Zellen.....	20
Abbildung 2.2: Ablauf Western-Blot.....	29
Abbildung 2.3: Ablauf Koloniebildungstest.....	34
Abbildung 2.4: Ablauf Nachweis von Reparatur-Foci mittels Immunfluoreszenz.....	36
Abbildung 3.1: Wachstumskurven von Oct4 A WT- und KO-Klonen.....	37
Abbildung 3.2: Klonogenität von Oct4 A WT- und KO-Klonen.....	38
Abbildung 3.3: Höhere Anzahl endogener $\gamma$ H2AX-Foci in Oct4 A KO-Klonen.....	39
Abbildung 3.4: Erhöhte Strahlensensitivität in Oct4 A KO-Klonen .....	40
Abbildung 3.5: Vermindertes zelluläres Überleben nach PARP1-Inhibition in Oct4 A WT-Klonen .....	42
Abbildung 3.6: Vermindertes zelluläres Überleben nach PARP1-Inhibition in Oct4 A KO-Klonen.....	43
Abbildung 3.7: Stärkere Verminderung des zellulären Überlebens in Oct4 A KO- Klonen nach PARP1-Inhibition .....	45
Abbildung 3.8: Keine Modulation der Strahlenempfindlichkeit durch PARP1-Inhibition in Oct4 A WT-Klonen .....	46
Abbildung 3.9: Strahlensensibilisierung durch PARP1-Inhibition in Oct4 A KO-Klonen.....	47
Abbildung 3.10: Ein Effekt der CHK1-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit in Oct4 A WT-Klonen .....	50
Abbildung 3.11: Höhere Expression von HR-Genen in Oct4 A WT-Klonen nach Kombinationsbehandlung mit Olaparib und Bestrahlung.....	52

Abbildung 3.12: Höhere Expression der HR-Proteine BRCA2, BRCA1, FANCD2 und PALB2 in Oct4 A WT-Klonen .....	54
Abbildung 3.13: Höhere Expression der HR-Proteine RAD54L, CHK1, RAD51 und HOP2 in Oct4 A WT-Klonen.....	55
Abbildung 3.14: Höhere Expression von HR-Proteinen (BRCA2, BRCA1, FANCD2, PALB2, RAD54L, CHK1, RAD51, HOP2) in Oct4 A WT-Klonen .....	57
Abbildung 3.15: Differenz zwischen $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci in WT-Klonen nach Bestrahlung.....	59
Abbildung 3.16: Keine Differenz zwischen $\gamma$ H2AX- und RPA-Foci in WT-Klonen nach Bestrahlung.....	60

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung Zellklone der HNSCC Zelllinie UTSCC5 .....	21
Tabelle 2: Medium und Reagenzien für Zellkulturhaltung.....	21
Tabelle 3: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Proteinisolierung und Bicinchoninsäure-Test .....	21
Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Western Blot .....	22
Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Immunfluoreszenz-Assay .....	22
Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Koloniebildungsassay .....	23
Tabelle 7: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Assay.....	23
Tabelle 8: Primäre Antikörper für Western Blot .....	23
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Assay.....	24
Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Western Blot.....	24
Tabelle 11: Größenstandards für Western Blot-Proteine.....	24
Tabelle 12: Geräte (verwendet am UKE in Hamburg) .....	25
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien (verwendet am UKE in Hamburg) .....	26
Tabelle 14: Auswertungsprogramme .....	26
Tabelle 15: Pipettierschema Western Blot.....	31
Tabelle 16: Verdopplungszeit von Oct4 A WT- und KO-Klonen .....	37
Tabelle 17: Statistische Analyse Koloniebildungsassays mit Olaparib .....	49

## 9 Literaturverzeichnis

- Afify, S. M., & Seno, M. (2019). Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers 2019, Vol. 11, Page 345, 11(3), 345.*
- Alsaifi, E., Begg, K., Amelio, I., Raulf, N., Lucarelli, P., Sauter, T., & Tavassoli, M. (2019). Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. In *Cell Death and Disease* (Vol. 10, Issue 8, pp. 1–17). Nature Publishing Group.
- Arnold, C. R., Mangesius, J., Skvortsova, I. I., & Ganswindt, U. (2020). The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Frontiers in Oncology, 10, 164.*
- Assanga, I., & Luján, L. (2013). *Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. 4(4), 60–70.*
- Balbous, A., Cortes, U., Guilloteau, K., Rivet, P., Pinel, B., Duchesne, M., Godet, J., Boissonnade, O., Wager, M., Bensadoun, R. J., Chomel, J. C., & Karayan-Tapon, L. (2016). A radiosensitizing effect of RAD51 inhibition in glioblastoma stem-like cells. *BMC Cancer, 16(1).*
- Bartucci, M., Svensson, S., Romania, P., Dattilo, R., Patrizii, M., Signore, M., Navarra, S., Lotti, F., Biffoni, M., Pillozzi, E., Duranti, E., Martinelli, S., Rinaldo, C., Zeuner, A., Maugeri-Saccà, M., Eramo, A., & De Maria, R. (2012). Therapeutic targeting of Chk1 in NSCLC stem cells during chemotherapy. *Cell Death and Differentiation, 19(5), 768–778.*
- Baumann, M., Krause, M., & Hill, R. (2008). Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 8, Issue 7, pp. 545–554). Nat Rev Cancer.
- 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 Reviews and Reports*, 10(1), 114–126.
- Bichara, M., Meier, M., Wagner, J., Cordonnier, A., & Lambert, I. B. (2011). Postreplication repair mechanisms in the presence of DNA adducts in *Escherichia coli*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 727(3), 104–122.
- Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. In *Molecular Cell* (Vol. 66, Issue 6, pp. 801–817). Mol Cell.
- Bochum, S., Berger, S., & Martens, U. M. (2018). Olaparib. In *Recent Results in Cancer Research* (Vol. 211, pp. 217–233). Recent Results Cancer Res.
- Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., & Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. In *Genetics and Molecular Biology* (Vol. 38, Issue 4, pp. 420–432). Genet Mol Biol.
- Boulton, S. J. (2006). Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 34, Issue 5, pp. 633–645).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). 394 CA: A Cancer Journal for Clinicians Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*, 68, 394–424.
- Brix, N., Samaga, D., Hennel, R., Gehr, K., Zitzelsberger, H., & Lauber, K. (2020). The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. *Radiation Oncology*, 15(1).
- Bryant, H. E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A. S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., & Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and

recombination. *EMBO Journal*, 28(17), 2601–2615.

Buisson, R., Niraj, J., Rodrigue, A., Ho, C. K., Kreuzer, J., Foo, T. K., Hardy, E. J.-L., Dellaire, G., Haas, W., Xia, B., Masson, J. Y., & Zou, L. (2017). Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR. *Molecular Cell*, 65(2), 336–346.

Carpén, T., Syrjänen, S., Jouhi, L., Randen-Brady, R., Haglund, C., Mäkitie, A., Mattila, P. S., & Hagström, J. (2020). Epstein–Barr virus (EBV) and polyomaviruses are detectable in oropharyngeal cancer and EBV may have prognostic impact. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(8), 1615–1626.

Carruthers, R., Ahmed, S., Ramachandran, S., Strathdee, K., Kurian, K. M., Hedley, A., Gomez-Roman, N., Kalna, G., Neilson, M., Gilmour, L., Stevenson, K. H., Hammond, E. M., & Chalmers, A. J. (2018). Replication stress drives constitutive activation of the DNA damage response and radioresistance in glioblastoma stem-like cells. *Cancer Research*, 78(17), 5060–5071.

Carruthers, R., Ahmed, S. U., Strathdee, K., Gomez-Roman, N., Amoah-Buahin, E., Watts, C., & Chalmers, A. J. (2015). Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by inhibition of ATM kinase. *Molecular Oncology*, 9(1), 192–203.

Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263.

Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179–204.

Dickreuter, E., Eke, I., Krause, M., Borgmann, K., Van Vugt, M. A., & Cordes, N. (2016). Targeting of  $\beta 1$  integrins impairs DNA repair for radiosensitization of head and neck cancer cells. *Oncogene*, 35(11), 1353–1362.

Driehuis, E., Kolders, S., Spelier, S., Löhmußaar, K., Willems, S. M., Devriese, L. A.,

- de Bree, R., de Ruiter, E. J., Korving, J., Begthel, H., van Es, J. H., Geurts, V., He, G. W., van Jaarsveld, R. H., Oka, R., Muraro, M. J., Vivié, J., Zandvliet, M. M. J. M., Hendrickx, A. P. A., ... Clevers, H. (2019). Oral Mucosal Organoids as a Potential Platform for Personalized Cancer Therapy. *Cancer Discovery*, *9*(7), 852–871.
- Economopoulou, P., de Bree, R., Kotsantis, I., & Psyrri, A. (2019). Diagnostic tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in the clinical setting. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, Issue AUG, p. 827). Frontiers Media SA.
- El-Brolosy, M. A., & Stainier, D. Y. R. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics*, *13*(7).
- Elgart, K., & Faden, D. L. (2020). Sinonasal Squamous Cell Carcinoma: Etiology, Pathogenesis, and the Role of Human Papilloma Virus. *Current Otorhinolaryngology Reports* 2020 8:2, *8*(2), 111–119.
- Finnie, N. J., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Jeggo, P. A., & Jackson, S. P. (1995). DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(1), 320–324.
- Gagou, M. E., Zuazua-Villar, P., & Meuth, M. (2010). Enhanced H2AX Phosphorylation, DNA Replication Fork Arrest, and Cell Death in the Absence of Chk1. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(5), 739.
- Gao, Y., Wei, J., Han, J., Wang, X., Su, G., Zhao, Y., Chen, B., Xiao, Z., Cao, J., & Dai, J. (2012). The Novel Function of OCT4B Isoform-265 in Genotoxic Stress. *STEM CELLS*, *30*(4), 665–672.
- Glorieux, M., Dok, R., & Nuyts, S. (2017). Novel DNA targeted therapies for head and neck cancers: clinical potential and biomarkers. *Oncotarget*, *8*(46), 81662.
- Hardisson, D. (2003). Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell

carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology : Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 260(9), 502–508.

Harper, J. V., Anderson, J. A., & O'Neill, P. (2010). Radiation induced DNA DSBs: Contribution from stalled replication forks? *DNA Repair*, 9(8), 907–913.

Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., & Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44, 113.

Hopkins, T. A., Ainsworth, W. B., Ellis, P. A., Donawho, C. K., DiGiammarino, E. L., Panchal, S. C., Abraham, V. C., Algire, M. A., Shi, Y., Olson, A. M., Johnson, E. F., Wilsbacher, J. L., & Maag, D. (2019). PARP1 trapping by PARP inhibitors drives cytotoxicity in both cancer cells and healthy bone marrow. *Molecular Cancer Research*, 17(2), 409–419.

Hoppe, M. M., Sundar, R., Tan, D. S. P., & Jeyasekharan, A. D. (2018). Biomarkers for homologous recombination deficiency in cancer. In *Journal of the National Cancer Institute* (Vol. 110, Issue 7, pp. 704–713). J Natl Cancer Inst.

Huang, R. X., & Zhou, P. K. (2020). DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1, pp. 1–27). Nature Publishing Group.

Ivashkevich, A. N., Martin, O. A., Smith, A. J., Redon, C. E., Bonner, W. M., Martin, R. F., & Lobachevsky, P. N. (2011).  $\gamma$ H2AX foci as a measure of DNA damage: A computational approach to automatic analysis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1–2), 49–60.

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. In *Nature* (Vol. 461, Issue 7267, pp. 1071–1078). Europe PMC Funders.

- Jannetti, S. A., Zeglis, B. M., Zalutsky, M. R., & Reiner, T. (2020). Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) Inhibitors and Radiation Therapy. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11, p. 170). Frontiers.
- Johnson, D. E., Burtneß, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 6, Issue 1). Nat Rev Dis Primers.
- Kagohara, L. T., Zamuner, F., Davis-Marcisak, E. F., Sharma, G., Considine, M., Allen, J., Yegnasubramanian, S., Gaykalova, D. A., & Fertig, E. J. (2020). Integrated single-cell and bulk gene expression and ATAC-seq reveals heterogeneity and early changes in pathways associated with resistance to cetuximab in HNSCC-sensitive cell lines. *British Journal of Cancer*, 123(1), 101–113.
- Keung, M. Y. T., Wu, Y., & Vadgama, J. V. (2019). PARP inhibitors as a therapeutic agent for homologous recombination deficiency in breast cancers. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 8, Issue 4, p. 435). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Kitamura, N., Sento, S., Yoshizawa, Y., Sasabe, E., Kudo, Y., & Yamamoto, T. (2021). Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–13.
- Kitao, H., Iimori, M., Kataoka, Y., Wakasa, T., Tokunaga, E., Saeki, H., Oki, E., & Maehara, Y. (2018). DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer Science*, 109(2), 264.
- Konings, K., Vandevoorde, C., Baselet, B., Baatout, S., & Moreels, M. (2020). Combination Therapy With Charged Particles and Molecular Targeting: A Promising Avenue to Overcome Radioresistance. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Koo, B. S., Lee, S. H., Kim, J. M., Huang, S., Kim, S. H., Rho, Y. S., Bae, W. J.,

- Kang, H. J., Kim, Y. S., Moon, J. H., & Lim, Y. C. (2015). Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*, *34*(18), 2317–2324.
- Kuo Linda J., & Yang Li-Xi. (2008).  $\gamma$  H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo*, *22*(3), 305–310.
- Lagadec, C., Dekmezian, C., Bauché, L., & Pajonk, F. (2012). Oxygen levels do not determine radiation survival of breast cancer stem cells. *PLoS ONE*, *7*(3), e34545.
- Lajer, C. B., & Buchwald, C. Von. (2010). The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *APMIS*, *118*(6–7), 510–519.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645–648.
- Leemans, C. R., Snijders, P. J. F., & Brakenhoff, R. H. (2018). The molecular landscape of head and neck cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 18, Issue 5, pp. 269–282). Nat Rev Cancer.
- Liao, H., Ji, F., Helleday, T., & Ying, S. (2018). Mechanisms for stalled replication fork stabilization: new targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments. *EMBO Reports*, *19*(9).
- Liu, C., Liao, K., Gross, N., Wang, Z., Li, G., Zuo, W., Zhong, S., Zhang, Z., Zhang, H., Yang, J., & Hu, G. (2020). Homologous recombination enhances radioresistance in hypopharyngeal cancer cell line by targeting DNA damage response. *Oral Oncology*, *100*.
- MacLachlan, T. K., Takimoto, R., & El-Deiry, W. S. (2002). BRCA1 Directs a Selective p53-Dependent Transcriptional Response towards Growth Arrest and

- DNA Repair Targets. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12), 4280–4292.
- Major, A. G., Pitty, L. P., & Farah, C. S. (2013). Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. In *Stem Cells International* (Vol. 2013). Stem Cells Int.
- Malkova, A. (2018). Break-Induced Replication: The Where, The Why, and The How. In *Trends in Genetics* (Vol. 34, Issue 7, pp. 518–531). NIH Public Access.
- Marjanovic, N. D., Weinberg, R. A., & Chaffer, C. L. (2013). Cell Plasticity and Heterogeneity in Cancer. *Clinical Chemistry*, 59(1), 168.
- Meyer, F., Becker, S., Classen, S., Parplys, A. C., Mansour, W. Y., Riepen, B., Timm, S., Ruebe, C., Jasin, M., Wikman, H., Petersen, C., Rothkamm, K., & Borgmann, K. (2020). Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer. *Cells*, 9(1).
- Michelena, J., Lezaja, A., Teloni, F., Schmid, T., Imhof, R., & Altmeyer, M. (2018). Analysis of PARP inhibitor toxicity by multidimensional fluorescence microscopy reveals mechanisms of sensitivity and resistance. *Nature Communications*, 9(1).
- Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: Next generation western blotting techniques. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 14, Issue 11, pp. 1037–1053). Expert Rev Proteomics.
- Mohiuddin, I. S., Wei, S. J., & Kang, M. H. (2020). Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1866, Issue 4). Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.
- Murai, J., Huang, S. Y. N., Renaud, A., Zhang, Y., Ji, J., Takeda, S., Morris, J., Teicher, B., Doroshow, J. H., & Pommier, Y. (2014). Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(2), 433–443.

- Nathansen, J., Lukiyanchuk, V., Hein, L., Stolte, M. I., Borgmann, K., Löck, S., Kurth, I., Baumann, M., Krause, M., Linge, A., & Dubrovskaya, A. (2021). Oct4 confers stemness and radioresistance to head and neck squamous cell carcinoma by regulating the homologous recombination factors PSMC3IP and RAD54L. *Oncogene*, *40*(24), 4214–4228.
- Nathansen, J., Meyer, F., Müller, L., Schmitz, M., Borgmann, K., & Dubrovskaya, A. (2021). Beyond the Double-Strand Breaks: The Role of DNA Repair Proteins in Cancer Stem-Cell Regulation. *Cancers*, *13*(19).
- Peng, M., Bakker, J. L., DiCioccio, R. A., Gille, J. J. P., Zhao, H., Odunsi, K., Sucheston, L., Jaafar, L., Mivechi, N. F., Waisfisz, Q., & Ko, L. (2013). Inactivating Mutations in GT198 in Familial and Early-Onset Breast and Ovarian Cancers. *Genes & Cancer*, *4*(1–2), 15–25.
- Pezza, R. J., Voloshin, O. N., Volodin, A. A., Boateng, K. A., Bellani, M. A., Mazin, A. V., & Camerini-Otero, R. D. (2014). The dual role of HOP2 in mammalian meiotic homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, *42*(4), 2346–2357.
- Polverini, P. J., D’Silva, N. J., & Lei, Y. L. (2018). Precision Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Dental Research*, *97*(6), 614–621.
- Pommier, Y., O’Connor, M. J., & De Bono, J. (2016). Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. In *Science Translational Medicine* (Vol. 8, Issue 362). Sci Transl Med.
- Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., & Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(3), 973–978.
- Rachmadi, L., Siregar, N. C., Kanoko, M., Andrijono, A., Bardosono, S., Suryandari, D. A., Sekarutami, S. M., & Hernowo, B. S. (2019). Role of Cancer Stem Cell,

- Apoptotic Factor, DNA Repair, and Telomerase Toward Radiation Therapy Response in Stage IIIB Cervical Cancer. *Oman Medical Journal*, 34(3), 224–230.
- Rich, J. N. (2016). Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine*, 95(Suppl 1), S2–S7.
- Rose, M., Burgess, J. T., O’Byrne, K., Richard, D. J., & Bolderson, E. (2020). PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8, p. 879). Frontiers.
- Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Issue 1, pp. 68–78). Nature Publishing Group.
- Ruan, Z., Yang, X., & Cheng, W. (2019). OCT4 accelerates tumorigenesis through activating JAK/STAT signaling in ovarian cancer side population cells. *Cancer Management and Research*, 11, 389–399.
- Sabatini, M. E., & Chiocca, S. (2019). Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *British Journal of Cancer* 2019 122:3, 122(3), 306–314.
- Saintigny, Y., Delacôte, F., Varès, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbek, D., & Lopez, B. S. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *The EMBO Journal*, 20(14), 3861–3870.
- Saleh-Gohari, N., Bryant, H. E., Schultz, N., Parker, K. M., Cassel, T. N., & Helleday, T. (2005). Spontaneous Homologous Recombination Is Induced by Collapsed Replication Forks That Are Caused by Endogenous DNA Single-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 7158–7169.
- Santos, E. S. dos, Lallemand, F., Petitalot, A., Caputo, S. M., & Rouleau, E. (2020). HRness in Breast and Ovarian Cancers. *International Journal of Molecular*

*Sciences 2020, Vol. 21, Page 3850, 21(11), 3850.*

Schulz, A., Meyer, F., Dubrovskaja, A., & Borgmann, K. (2019). Cancer stem cells and radioresistance: DNA repair and beyond. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 6). Cancers (Basel).

Sørensen, C. S., Hansen, L. T., Dziegielewska, J., Syljuåsen, R. G., Lundin, C., Bartek, J., & Helleday, T. (2005). The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature Cell Biology*, 7(2), 195–201.

Tanaka, T., Halicka, H. D., Huang, X., Traganos, F., & Darzynkiewicz, Z. (2006). Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. In *Cell Cycle* (Vol. 5, Issue 17, pp. 1940–1945). NIH Public Access.

Tubbs, A., & Nussenzweig, A. (2017). Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*, 168(4), 644.

Unkel, S., Belka, C., & Lauber, K. (2016). On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to the linear-quadratic model. *Radiation Oncology 2016* 11:1, 11(1), 1–11.

van Harten, A. M., Buijze, M., van der Mast, R., Rooimans, M. A., Martens-de Kemp, S. R., Bachas, C., Brink, A., Stigter-van Walsum, M., Wolthuis, R. M. F., & Brakenhoff, R. H. (2019). Targeting the cell cycle in head and neck cancer by Chk1 inhibition: a novel concept of bimodal cell death. *Oncogenesis 2019* 8:7, 8(7), 1–16.

Venere, M., Hamerlik, P., Wu, Q., Rasmussen, R. D., Song, L. A., Vasani, A., Tenley, N., Flavahan, W. A., Hjelmeland, A. B., Bartek, J., & Rich, J. N. (2014). Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(2), 258–269.

- Ventelä, S., Sittig, E., Mannermaa, L., Mäkelä, J. A., Kulmala, J., Löyttyniemi, E., Strauss, L., Cárpen, O., Toppari, J., Grénman, R., & Westermarck, J. (2015). CIP2A is an Oct4 target gene involved in head and neck squamous cell cancer oncogenicity and radioresistance. *Oncotarget*, *6*(1), 144–158.
- Vilenchik, M. M., & Knudson, A. G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(22), 12871–12876.
- Wadkin, L. E., Orozco-Fuentes, S., Neganova, I., Bojic, S., Laude, A., Lako, M., Parker, N. G., & Shukurov, A. (2019). Seeding hESCs to achieve optimal colony clonality. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10.
- Walcher, L., Kistenmacher, A. K., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., Blandszun, A. R., Yevsa, T., Fricke, S., & Kossatz-Boehlert, U. (2020). Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1280.
- Wang, X., & Dai, J. (2010). Concise review: Isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells*, *28*(5), 885–893.
- Widon, M. J., D'Souza, G., Rettig, E. M., Westra, W. H., van Zante, A., Wang, S. J., Ryan, W. R., Mydlarz, W. K., Ha, P. K., Miles, B. A., Koch, W., Gourin, C., Eisele, D. W., & Fakhry, C. (2018). Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer*, *124*(14), 2993–2999.
- Wong, M. H., Monroe, M. M., Anderson, E. C., & Clayburgh, D. R. (2011). Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Oncology*, *2011*.
- Wu, S., Zhou, J., Zhang, K., Chen, H., Luo, M., Lu, Y., Sun, Y., & Chen, Y. (2020). Molecular Mechanisms of PALB2 Function and Its Role in Breast Cancer

Management. *Frontiers in Oncology*, 10, 301.

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(9), 9732–9741.

Yu, S. S., & Cirillo, N. (2020). The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *Journal of Cellular Physiology*, 235(1), 65–73.

Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. In *Nature Cell Biology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 2–9). NIH Public Access.

Zeng, L., Beggs, R. R., Cooper, T. S., Weaver, A. N., & Yang, E. S. (2017). *Combining Chk1/2 Inhibition with Cetuximab and Radiation Enhances In Vitro and In Vivo Cytotoxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*.

Zhou, C., & Parsons, J. L. (2020). The radiobiology of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. In *Expert Reviews in Molecular Medicine* (Vol. 22). Expert Rev Mol Med.

Zhou, Y., Chen, X., Kang, B., She, S., Zhang, X., Chen, C., Li, W., Chen, W., Dan, S., Pan, X., Liu, X., He, J., Zhao, Q., Zhu, C., Peng, L., Wang, H., Yao, H., Cao, H., Li, L., ... Wang, Y. J. (2018). Endogenous authentic OCT4A proteins directly regulate FOS/AP-1 transcription in somatic cancer cells article. *Cell Death and Disease*, 9(6).

Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300(5625), 1542–1548.

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die es mir mit Ihrer Unterstützung ermöglicht haben, diese Arbeit zu verfassen:

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Kerstin Borgmann für die Bereitstellung meines interessanten Themas und die Möglichkeit der Mitarbeit an einem spannenden gemeinsamen Projekt des Labors für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und dem "National Center for Radiation" der Universität Dresden. Außerdem bedanke ich mich für die Betreuung mit hilfreichen Konsultationen und Diskussionen während der Durchführung der Experimente und des Schreibprozesses.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei Britta Riepen bedanken, die mich zu Beginn meiner Arbeit in die Labormethoden einführte, mich beim Durchführen einiger Experimente unterstützte und mir immer hilfsbereit zur Seite stand.

Auch Lena Schuckenbrock möchte ich für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft im Labor und ihre Herzlichkeit danken. Es hat immer sehr viel Spaß gemacht mit ihr im Labor zusammenzuarbeiten, sogar frühmorgens um kurz vor sieben.

Dr. Felix Meyer danke ich für seine hilfreichen GraphPad-Prism-Tutorials und die wertvollen, rettenden Ratschläge in schwierigen Phasen meiner Arbeit.

Darius Rüther, Christa Auster und Alexander Rose möchte ich für das äußerst hilfreiche Korrekturlesen und Lektorat sowie die motivierenden Gespräche danken.

Leo und Emma danke ich für die Hilfe bei der Erstellung von Grafiken und die Stimmungsauflockerungen in den Schreibpausen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich die Zeit über unterstützten und motivierten.

## **11 Lebenslauf**

**Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.**

## 12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....