UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Onkologie

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Prof. Dr. Cordula Petersen

Vergleich der DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkapazität HPV-positiver und HPV-negativer Oropharynxkarzinome im *Ex-vivo*-Assay

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Henrike Barbara Antonia Angelika Zech

aus Oldenburg (Oldb.)

Hamburg, 2020

Angenommen

von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

10.11.20

Veröffentlicht mit Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Nicole Fischer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

PD Dr. Malte Kriegs

Primum non nocere, secundum cavere, tertium sanare.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 4

Abbildungsverzeichnis 6

Tabellenverzeichnis 6

Abkürzungsverzeichnis 7

1 Einleitung 8

1.1 Die Rolle Humaner Papillomaviren in Kopf-Hals-Tumoren 10

1.1.1 Humane Papillomaviren – Biologie und Tumorgenese von HPV-assoziierten HNSCC 10

1.1.2 Erhöhte Strahlensensibilität von HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen und mögliche biologische Grundlagen 14

1.2 Fragestellung: DNA-Schadensantwort HPV-positiver Oropharynxkarzinome in *Ex-vivo*-Kulturen von Kopf-Hals-Tumorgewebe 16

2 Material und Methoden 18

2.1 Materialien 18

2.2 Methoden 21

2.2.1 Zellkultur 21

2.2.2 Gewebesammlung 21

2.2.3 *Ex-vivo*-Kultivierung von Tumorschnitten 21

2.2.4 Kryokonservierung und -schnitte 22

2.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 23

2.2.6 Immunfluoreszenzmikrokopische Färbung der Tumorfrischgewebe 23

2.2.7 Immunfluoreszenzmikroskopische Färbung von Zelllinien 23

2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbruch-Foci 23

3 Ergebnisse 25

3.1 Projektübersicht 25

3.2 *Ex-vivo*-Gewebeschnitt-Kultivierung von Kopf-Hals-Tumoren nach Köcher 26

3.3 p63 als Kopf-Hals-Tumormarker 26

3.4 Vergleich von 53BP1-Foci und γH2AX-Foci 30

3.5 Patientencharakteristika 31

3.6 Analyse der DNA-Reparaturkapazität bei HPV-positiven und negativen HNSCC 32

3.7 ATM-Inhibition 34

4 Diskussion 36

4.1 Etablierung eines *Ex-vivo*-Assays für Kopf-Hals-Karzinome zur Messung der individuellen Radiosensibilität (Methodik nach Köcher) 36

4.2 *Ex-vivo* Assay bestätigt die Hypothese eines gestörten DNA-Reparaturvorgangs bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen 42

4.3 Potentieller Defekt der ATM-abhängigen DNA-Schadensantwort bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen 47

5 Zusammenfassung 50

6 Summary 51

7 Literaturverzeichnis 52

8 Danksagung 62

9 Lebenslauf 64

10 Eidesstattliche Erklärung 64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Informationskampagne „makesensecampaign" der European Head and Neck Society 9
Abbildung 2: Produktive HPV-Infektion 12
Abbildung 3: Onkogenese HPV-positiver Oropharynxkarzinome 13
Abbildung 4: Erhöhte Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver HNSCC im Koloniebildungsassay 15
Abbildung 5: Oxygenierung und Proliferation von Kopf-Hals-Karzinomzellen (A) und Prostatakarzinomzellen (B) im *Ex-vivo*-Assay 16
Abbildung 6: Schematischer Querschnitt der *Ex-vivo*-Kultur 22
Abbildung 7: Schema der DNA-Doppelstrang (DSB-)messung aus *ex vivo* kultivierten frischen Kopf-Hals-Tumorgewebe. 25
Abbildung 8: Immunfluoreszenz Co-färbung von p63 und Keratin 5 von UD-SCC-2 und Fibroblasten F180 in Mischkultur 27
Abbildung 9 Validität von p63 als Kopf-Hals-Tumormarker in Zellllinien 28
Abbildung 10: Validität von p63 in *ex vivo* kultivierten Kopf-Hals-Tumorfrischgewebe. 29
Abbildung 11: Vergleich von residuellen 53BP1 und γH2AX-Foci bei einem *ex vivo* kultivierten HPV-positiven OPSCC (T8) 24 h nach Bestrahlung. 30
Abbildung 12: Vergleich residueller Foci 24 h nach Radiatio mit 3 Gy bei HPV-negativen (n=6) und HPV-positiven (n=8) OPSCC 33
Abbildung 13: Vergleich residueller Foci 24 h nach Radiatio mit 3 Gy, 3 Gy und ATM-Inhibition und 6 Gy bei HPV-negativen (n=3) und HPV-positiven (n=6) OPSCC 35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische und histopathologische Charakteristika der eingeschlossenen Patienten 31

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad 3 related
BRCA	Breast Cancer early-onset
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EHNS	European Head and Neck Society
Gy	Gray= J/kg Energiedosis ionisierender Strahlung
h	hours = Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNSCC	Head and neck Squamous cell carcinoma = Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs
HPV	Humane Papillomaviren
HPV+	Positiver HPV-Status
HPV-	Negativer HPV-Status
HR	Homologe Rekombination
Kap.	Kapitel
NHEJ	nicht-homologes *Endjoining*
OPSCC	Oropharyngeal Squamous cell carcinoma = Plattenepithelkarzinome des Oropharynx
s.	siehe
SF3	Surviving fraction at 3 Gy = Überlebensfraktion von Zellen/Zellkolonien nach 3 Gy, Maß für Strahlensensibilität
USA	United States of America = Vereinigte Staaten von Amerika

1 Einleitung

Tumore des Kopf-Hals-Bereiches sind mit einer Inzidenz von etwa 650.000 Fällen und 330.000 Todesfällen die siebthäufigste Tumorart weltweit (Bray et al. 2018). Sie bezeichnen eine in der Lokalisation, Ätiologie, Prognose und Therapie heterogene Gruppe maligner Tumore der Schleimhäute des oberen Aerodigestivtrakts, d. h. klassischerweise des Kehlkopfs, der Mundhöhle und des Rachens sowie der selteneren Manifestationen der Speicheldrüsen und der Nasenhaupt- und -nebenhöhle. Etwa 90 % der Tumore entwickeln sich aus Neoplasien des Plattenepithels und werden dementsprechend als Plattenepithelkarzinome bezeichnet (HNSCC = Head and Neck Squamous Cell Carcinoma). Die hauptsächlichen Risikofaktoren sind typischerweise Tabak- und Alkoholabusus. Rauchen erhöht das Erkrankungsrisiko um das 5- bis 25-fache im Vergleich zur Normalbevölkerung (Goldenberg et al. 2004). Starker Alkoholkonsum ist als unabhängiger Risikofaktor anerkannt und potenziert die onkogene Wirkung des Tabaks deut- lich (Hashibe et al. 2007).

In den letzten Jahrzehnten zeigte sich vor allem in den westlichen Ländern eine zwar geographisch divergierende, aber insgesamt steigende Inzidenz von Kopf-Hals-Tumoren im Bereich des Oropharynx, die mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) assoziiert sind. Die USA verzeichnete einen Anstieg HPV-positiver Oropharynxkarzinome von 1988 und 2004 um 225 % bei gleichzeitiger Abnahme von HPV-negativen HNSCC um 50 %. HPV-positive Kopf-Hals-Karzinome übersteigen mittlerweile die Anzahl von HPV-positiven Zervixkarzinomen in den USA (Senkomago et al. 2019). In Deutschland zeigen aktuelle Daten ebenso einen kontinuierlichen Anstieg der HPV-positiven Oropharynxkarzinome (OPSCC). Man schätzt, dass aktuell 40 % aller OPSCC HPV-assoziiert sind (Reuschenbach et al. 2019). In der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf überwog im Jahre 2019 die Zahl der HPV-positiven OPSCC die Zahl der HPV-negativen (unveröffentlichte Daten).

Patienten mit einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich werden bei meist spät manifestierender Symptomatik in der Regel verzögert einer Diagnose zugeführt. Die klinische Symptomatik richtet sich nach der betroffenen Lokalisation, wie z. B. Lymphknotenschwellungen, Schluckbeschwerden, Heiserkeit, chronische Halsschmerzen oder Schleimhautläsionen. Die European Head and Neck Society (EHNS) hat dieses Charakteristikum in der „makesense-campaign“ adressiert: Bei anhaltender unspezifischen Symptomatik im HNO-Bereich wird zu einer frühzeitigen HNO-Untersuchung geraten, um eine bessere Früherkennung und Prognose zu erzielen (EHNS 2020) (Abb. 1).

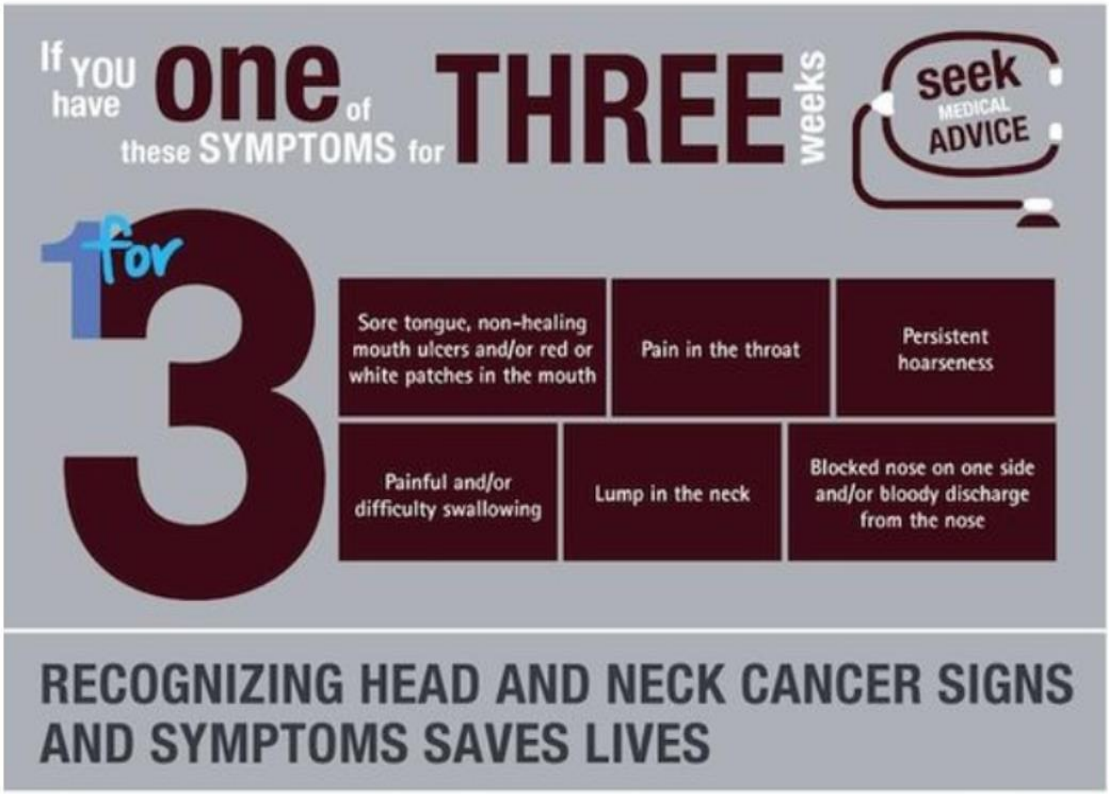


Abbildung 1: Informationskampagne „makesensecampaign" der European Head and Neck Society. Die unspezifische Symptomatik bedingt die späte Diagnosestellung und ungünstige Prognose von Kopf-Hals-Karzinomen. Bei einer der aufgeführten Beschwerden für 3 Wochen („1 for 3") sollte eine (HNO)-ärztliche Konsultation erfolgen. Abbildung vergrößert und entnommen aus dem Internetauftritt der European Head and Neck society (EHNS 2020).

Häufig können in der flexiblen Endoskopie bereits verdächtige Läsionen detektiert werden. Hilfreich neben Anamnese und Risikofaktoren sind ferner bildgebende Verfahren wie Sonografie, Magnetresonanztomografie, Computertomografie oder selten Positronenemissionstomografie. Bei Diagnosestellung sind etwa zwei Drittel der Tumore bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Eine lymphogene Metastasierung der zervikalen Halslymphknoten liegt häufig bereits vor und Fernmetastasen zeigen sich in etwa 14 % der Fälle. Betroffen sind vor allem Leber und Lunge (Duprez et al. 2017). Das im Staging festgelegte TNM-Stadium und der Allgemeinzustand des Patienten definiert bis dato die Therapie. Sie stützt sich auf die Säulen Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Bei Patienten im frühen Tumorstadium ist eine Monotherapie mit Bestrahlung oder Operation meist möglich. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen bei 80–90 %. Bei den häufigeren Tumorpatienten im fortgeschrittenen Stadium sind multimodale Therapieansätze indiziert, beispielsweise eine Operation mit adjuvanter (Radio-)Chemotherapie oder eine primäre Radiochemotherapie (Bernier et al. 2005) . Die Notwendigkeit und Art einer adjuvanten Therapie richtet sich nach der postoperativ durchgeführten histopathologischen Risikoevaluation (R-Status, extrakapsuläres Wachstum einer Lymphknotenmetastase, T3-/T4-Status, Lymphangio-Gefäß- oder Perineuralinvasion, Lymphkno-

tenstatus). Eine adjuvante Radiotherapie wird in der Regel mit 60 Gy (2 Gy/Tag) durchgeführt, bei Hochrisikopatienten erfolgt zudem eine Chemotherapie mit Cisplatin, sofern keine Kontraindikationen bei dem Patienten vorliegen (Bernier et al. 2005, Bernier et al. 2004, Cooper et al. 2004). Eine primäre Radiochemotherapie wird häufig mit Cisplatin und kumulativ 70 Gy durchgeführt. Die intensiven, multimodalen Therapieschemata führen häufig zu Therapieabbrüchen und können zu erheblichen reversiblen und irreversiblen Langzeitnebenwirkungen führen, z. B. ausgeprägter Mukositis, Schluck- und Sprachstörungen, ausgeprägter Mundtrockenheit sowie Innenohrschädigung oder Niereninsuffizienz nach Chemotherapie. Einschränkungen des täglichen Lebens, Häufigkeit von Arbeitsunfähigkeit und Minderung der Lebensqualität im Rahmen einer onkologischen Therapie sind selten so ausgeprägt wie bei Patienten im Kopf-Hals-Bereich (Heutte et al. 2014). Trotz der aggressiven Therapie kommt es zu einem Wiederauftreten des Tumors in mindestens 30 % der Fälle (Argiris et al. 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 50 % und hat sich in den letzten Jahren in Unterschied zu vielen anderen Entitäten nicht wesentlich verändert (Bray et al. 2018, Jemal et al. 2011, Torre et al. 2015).

Die technischen Innovationen des letzten Jahrzehnts wie z.B. die DNA-Sequenzierung über die Next Generation Sequencing-Technologie machen eine zunehmende genetische, epigenetische und molekulare Analyse von Karzinomen möglich und offenbaren Kopf-Hals-Karzinome als eine komplexe Entität, die sich durch hohe tumorbiologische Heterogenität auszeichnet (Hammerman et al. 2015, Leemans et al. 2018, Tonella et al. 2017). Eine Stratifizierung von Therapiealgorithmen für einzelne tumorbiologisch divergente Subgruppen oder ein Intervenieren in spezifische onkogene Signalwege („targeted therapy“) gelang bisher im Unterschied zu anderen Entitäten in der kurativen Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen nicht.

Das Einbeziehen biologischer Tumormerkmale in eine Therapieentscheidung könnte hingegen zukünftig über den HPV-Status eines Tumors erfolgen. Hinsichtlich der deutlichen Unterschiede zwischen HPV-positiven und negativen Tumoren bzgl. Ätiologie, Epidemiologie, Patientencharakteristika, Tumorbiologie, Therapieansprechen, Radiosensibilität und Prognose werden Therapiemodifikationen- und Deeskalationen für HPV-positive Kopf-Hals-Tumore intensiv diskutiert und sind Bestandteil einer Vielzahl von Studien (Bonomo und Livi 2020, Kelly et al. 2016, Kobayashi et al. 2018).

1.1 Die Rolle Humaner Papillomaviren in Kopf-Hals-Tumoren

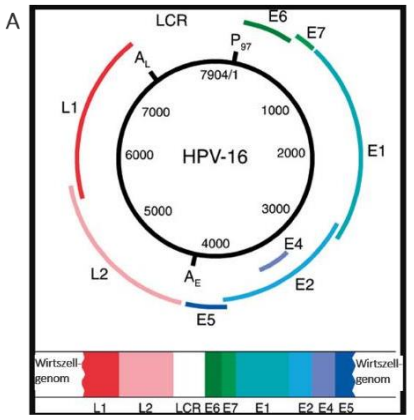
1.1.1 Humane Papillomaviren – Biologie und Tumorgenese von HPV-assoziierten HNSCC

Humane Papillomaviren (HPV) gehören zur Familie der Papillomaviridae. Ihr Genom besteht aus zirkulärer doppelsträngige DNA, die 8000 Basenpaare umfasst und meist episomal in Komplexen mit Histonen vorliegt. Es teilt sich in drei Abschnitte, mit zum einen den Struktur-und Regulatorproteine E1 bis E7, zum anderen den Kapsidproteinen

L1-L2 sowie eine Kontrollregion zur Überwachung der Replikation und Transkription (Abb. 2A, 2B). Es gibt ungefähr 200 verschiedene HPV-Typen, die die Haut und Schleimhaut von Vagina, Gebärmutterhals, Vulva, Penis, Anus und Oropharynx befallen können. Nur ein Bruchteil der Humanen Papillomaviren ist onkogen, im Kopf-Hals-Bereich sind dies vorrangig HPV 16 gefolgt von HPV 18. Von der Zeit zwischen Primärinfektion bis zur persistenten Infektion und zur Tumorgenese eines Kopf-Hals-Tumors vergehen in der Regel Jahrzehnte. Die virale Tumorgenese ist dabei als ein „biologischer Unfall“ zu werten (Moore und Chang 2010). Im Rahmen des molekularen Parasitismus mit Wunsch nach Replikation des Virus kann eine Zellimmortalisierung und maligne Transformation der Zelle durch unterschiedliche bisher nicht vollständig verstandene Mechanismen erfolgen wie z.B. Eingriffe in DNA-Reparatursysteme, intrazelluläre Signalwege, Apoptoseregulation oder Induktion von Entzündungsprozessen über Zytokinsekretion (Pinatti et al. 2018). Einige anatomische Lokalisationen besitzen eine gesonderte Vulnerabilität gegenüber eine HPV-induzierte Onkogenese: Beim Zervixkarzinom bilden sich HPV-assoziierte Tumore nahezu ausschließlich im Übergangsbereich (Transformationszone) zwischen dem mehrschichtigen Plattenepithel der Ektozervix und dem endozervikalen Zylinderepithel aus (Cohen et al. 2019). Im Kopf-Hals-Bereich finden sich HPV-assoziierte Tumore vor allem im Oropharynx mit meist einer Manifestation tonsillär oder des Zungengrunds (Gillison et al. 2000).

Es wird postuliert, dass der Viruseintritt nach oraler Aufnahme über den Vertiefungen der Tonsillen, den tonsillären Krypten, erfolgt, welche teilweise nicht durchgehende Epithelien besitzen (Egawa et al. 2015, Schiffman et al. 2016). Für eine Replikation ist der Virus auf die Replikationsmaschinerie seiner Wirtszelle angewiesen.

Die Primärinfektion findet typischerweise in den basalen Zellen des Epithels statt. Die Expression viraler Proteine korreliert mit dem Differenzierungsstatus der Wirtszellen (Abb. 2C). Nach Infektion der Basalzellen ist ihre Expression zunächst minimal und steigt mit dem Differenzierungsgrad der Wirtszelle an bis es an den äußeren Schichten zur Virusfreisetzung kommen kann. Die steigenden Expression von E1 und E2 ist dabei bedeutend für die Replikation des Virusgenoms (Abb. 2B, 2C). Die Aktivierung von E6 und E7, welche auch als (Proto-) Onkogene bezeichnet werden, sorgt für den Wiedereintritt der Wirtszellen in den Zellzyklus, durch Modulationen von Zellzyklus-regulierenden Signalkaskaden, v.a. durch Blockade der Schlüsselproteine, TP53 und RB1. E7 sorgt für eine Degradation des Retinoblastom-Proteins (Rb), dem zentralen Regulator der Schnittstellen zwischen G1 und S-Phase, was in einen Übergang der infizierten Zellen in die S-Phase resultiert. E6 inaktiviert p53 durch Ubiquitin-vermittelte Degradation. Das als „Hüter des Genoms“ bekannte Protein wird damit daran gehindert, einen Zellzyklusarrest oder Apoptose auszulösen. Durch diese Mechanismen wird eine Virusreplikation erst ermöglicht. Der Virus benötigt die aktive Replikationsmaschinerie in der S-Phase des Zellzyklus, die seine ausdifferenzierenden Wirtszellen ansonsten nicht mehr durchschreiten würden.



B

	Funktion
L1	Hauptkapsid Protein
L2	Kapsid Protein
E1	Transkriptionsfaktor, Helikase aktivität
E2	Transkriptionsfaktor, Regulation der viralen Kopienummer
E4	Vereinfacht die Virenfreisetzung
E5	Stimuliert die Zellproliferation und -prävention der Differenzierung, Herunterregulation der MHC-I Expression
E6	Deregulation des Zellzyklus durch p53-Inaktivierung/Degradierung. Induziert maligne Transformation
E7	Behält Zellen im aktiven Zellzyklus durch Rb Inaktivierung. Induziert maligne Transformation

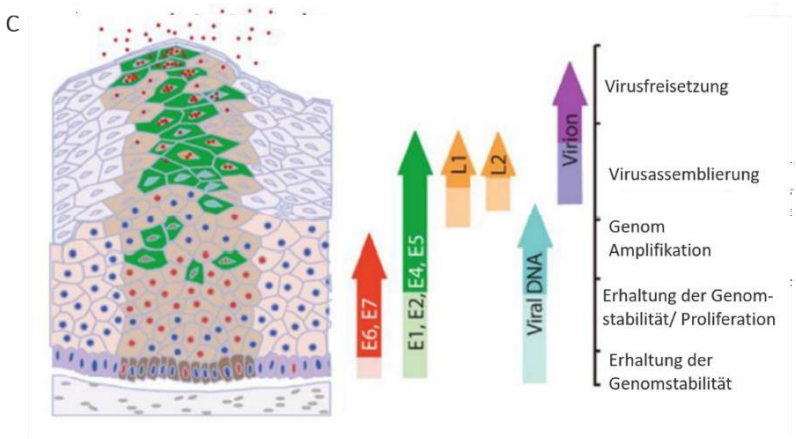


Abbildung 2: Produktive HPV-Infektion. (A) Aufbau eines Humanen Papillomavirus und Integration des HPV-Genoms in das Wirtsgenom. (B) Funktion der einzelnen Virusproteine. (C) Ablauf einer produktiven Infektion: Die Expression viraler Proteine korreliert mit dem Differenzierungsstatus der Wirtszellen. Nach Infektion der Basalzellen ist ihre Expression zunächst minimal und steigt mit dem Differenzierungsgrad der Wirtszelle an bis es an den äußeren Schichten zur Virusfreisetzung kommen kann. Abbildung (A) und (B) geändert und übersetzt aus dem Englischen nach (Kajitani et al. 2012). Abbildung (C) geändert und übersetzt nach (Egawa et al. 2015).

Die Prozesse die zu einer malignen Transformation einer chronisch-infizierten Zelle führen und die Gründe, warum einige Infektionen ausheilen, während andere zur Entartung führen, sind unverstanden. Mögliche zugrunde liegende Mechanismen sind Gegenstand intensiver kontroverser Diskussion, hingegen ist die wichtige Rolle von E6 und E7 als unabdingbare Komponenten der HPV-induzierten Onkogenese hinreichend belegt (Egawa et al. 2015, Mittal und Banks 2017).

Es wird vermutet, dass eine maligne Transformation mit einem Genverlust von E2 assoziiert ist. Dieses Protein hemmt die Funktion von E6 und E7. Bei E2-Verlust kommt es

zur nicht regulierten Expression von E6 und E7, welche im Folgenden unterschiedlichste Einflüsse auf Signalwege der Wirtszelle nehmen und eine genetische Instabilität, onkogene Transformation und klonale Expansion bewirken (Pinatti et al. 2018, Scheffner et al. 1993) (Abb.3). Häufig wird ein Funktionsverlust von E2 bei Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom beobachtet. Anders als jahrelang angenommen, ist dies nicht Bedingung für eine HPV-abhängige Onkogenese. Es wird angenommen, dass in jeweils ca. 20% aller HPV-bedingten Zervix- und Kopf-Hals-Tumoren keine Integration der viralen DNA erfolgt (Cancer Genome Atlas 2015, Cancer Genome Atlas Research et al. 2017, Jeon und Lambert 1995).

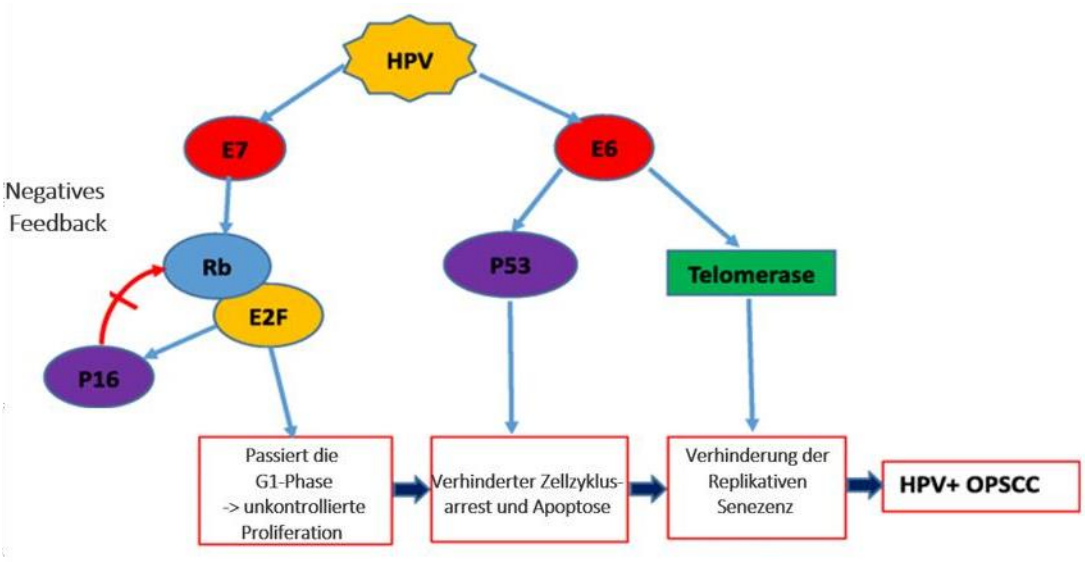


Abbildung 3: Onkogenese HPV-positiver Oropharynxkarzinome. E6 und E7 sind die hauptsächlichen Onkoproteine. Sie wirken auf eine Vielzahl von zellulären Signalwegen in infizierten Zellen, um mit der fortbestehenden Proliferation der Wirtszelle eine Persistenz und Replikation von HPV zu gewährleisten. Die wichtigsten sind in dieser Abbildung stark vereinfacht dargestellt. E7 inaktiviert das Rb-Protein, was zu einer Überaktivierung des Transkriptionsfaktor E2F führt. Dies überführt die Zelle aus der G1- in die S-Phase, wodurch die Proliferation gefördert wird. Die Inaktivierung des Rb Proteins führt zu einer erhöhten Expression von p16, dem Surrogatmarker einer HPV-Infektion. E6 führt zur Degradierung von p53 mit der Folge einer Apoptosehemmung, Deregulation des Zellzyklus und der Aktivierung von Telomerasen. E6 und E7 wirken in der HPV-induzierten Onkogenese komplementär zueinander. Abbildung geändert und übersetzt aus dem Englischen nach (Liu et al. 2018a).

Die Ätiologie von HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen ist deutlich von den HPV-negativen abzugrenzen, bei denen die Noxenexposition als das auslösende onkologische Moment angesehen wird.

Entsprechend der distinkten Ätiologie sind HPV-positive von HPV-negativen Kopf-Hals-Tumoren auch in ihren tumorbiologischen Eigenschaften zu unterscheiden. In der genetischen Analyse von Kopf-Hals-Tumoren im Rahmen des Cancer Genome Atlas Projekt zeigten sich z.B. deutliche Unterschiede im detaillierten genomischen Profil beider Tu-

more. Bei Noxen-induzierten Kopf-Hals-Tumoren stehen Mutationen im p53-Gen im Vordergrund, seltener Deletionen/Mutationen im Gen CDKN2A (codiert für u.a. p16 & p14ARF) sowie mit nochmals deutlich geringerer Häufigkeit Amplifikationen von CCND1 (codiert für CyclinD1), EGFR, FGFR1 oder PI3KCA sowie Mutationen von EGFR und PI3KCA. Für HPV-positive HNSCC finden sich diese Veränderungen mit Ausnahme von Amplifikationen/Mutationen von PI3KCA, nicht (Leemans et al. 2018). Beruft man sich auf die grundsätzlichen biologischen Merkmale eines Tumors nach den von Hannahan/Weinberg et al. definierten „Hallmarks of cancer“ (Hanahan und Weinberg 2000, Hanahan und Weinberg 2011), konnten bereits an mehreren Punkten grundlegende Unterschiede gesehen werden (Eckhardt et al. 2018). Eine Abgrenzung der HPV-positiven Oropharynxkarzinome als eine sowohl klinisch als auch biologisch divergente Entität ist in der Fachwelt anerkannt und der HPV/p16-Status der anerkannteste prognostische Marker dieser Tumore (Kobayashi et al. 2018).

1.1.2 Erhöhte Strahlensensibilität von HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen und mögliche biologische Grundlagen

Eine signifikant bessere Prognose von HPV-assoziierten OPSCC gegenüber Noxen-assoziierten OPSCC ist auf Grundlage zahlreicher Daten in der Fachwelt unumstritten (Alfaraj et al. 2019, You et al. 2019). Ein besseres Therapieansprechen zeigt sich vor allem bei Therapieregimen, welche eine Radiotherapie enthalten und sind auch bei alleiniger Radiatio zu beobachten (Ang et al. 2010, Fakhry et al. 2008, Petrelli et al. 2014). Demnach wird postuliert, dass eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit der HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren ursächlich für den besseren Krankheitsverlauf ist. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Einige Autoren gehen davon aus, dass epidemiologische Faktoren in Betracht gezogen werden sollten, wie jüngeres Alter bei Diagnose und weniger Komorbiditäten (Ang et al. 2010). In den meisten Hypothesen werden tumorbiologische Unterschiede einbezogen: Als mögliche Faktoren wird die unterschiedliche Zusammensetzung der Stammzellfraktion (Zhang et al. 2014), Unterschiede der EGFR- oder VEGF-abhängigen Signalwege (Baruah et al. 2015, Young et al. 2011) oder ein unterschiedliches Ausmaß hypoxischer Bereiche im Tumorgewebe vor und vor allem unter der Radiotherapie diskutiert (Sorensen et al. 2014). Die beste wissenschaftliche Grundlage besteht bezüglich zwei sich gegenüberstehenden Theorien: Die Theorien der erhöhten Immunogenität und die Theorie einer defekten DNA Doppelstrangbruch-Reparatur: In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das immunologische Profil von HPV-positiven Oropharynxkarzinomen sich von dem HPV-negativer deutlich unterscheidet. Basis dieser Theorie ist eine bei HPV-positiven Patienten beobachtete erhöhte Zahl Tumor infiltrierenden T-Lymphozyten im Tumorgewebe in prätherapeutischen Biopsien und Resektaten. Dabei zeigte sich eine deutliche Korrelation der T-Lymphozytenzahl mit dem Überleben (Balermpas et al. 2016, Marcu et al. 2018, Wagner et al. 2016, Welters et al. 2018). Schwächen dieser Theorie sind das fehlende Verständnis der hierfür ursächlichen Mechanismen. Während mehrere Arbeiten Hypothesen bezüglich der Art der Interaktionen von Immunität und Bestrahlung generieren (Weichselbaum et al. 2017),

konnten diese und insbesondere die Frage nach einer spezifischen Rolle von HPV-assoziierten OPSCC in diesem Kontext, bisher nicht beantwortet werden (Manukian et al. 2019). Es ist außerdem zu bedenken, dass offensichtlich die Immunogenität prätherapeutisch nicht ausreichte, den Tumor zu bekämpfen.

Die zweite Theorie postuliert eine intrinsisch erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver Kopf-Hals-Tumoren. Rieckmann et al. konnte 2013 nachweisen, dass bereits HPV-positive Zelllinien gegenüber HPV-negativen eine erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit vorweisen (Rieckmann et al. 2013). Dabei zeigten die untersuchten HPV-positiven Linien eine deutlich höhere Anzahl residueller Doppelstrangbrüche (DSB) nach Bestrahlung, was erstmals einen Hinweis auf eine defekte DNA-Reparatur bei HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen gab. Seither wurde diese Beobachtung in Arbeiten anderer Forschungsgruppen bestätigt und unterschiedliche Hypothesen bzgl. der genaueren Mechanismen generiert (Dok et al. 2014, Liu et al. 2018a, Mirghani et al. 2015, Park et al. 2014, Wang et al. 2017). Zu bedenken bei dieser Theorie ist, dass bei diesen Arbeiten teils die gleichen, in jedem Fall aber nur eine limitierte Anzahl der ca. 10 aktuell verfügbaren HPV-positiven Zelllinien verwendet wurden. Da unklar ist, inwieweit diese repräsentativ für HPV-positive HNSCC sind, stellt diese geringe Bandbreite an HPV-positiven Modellen die größte Limitation der Theorie einer eingeschränkten DSB-Reparatur und erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver HNSCC dar.

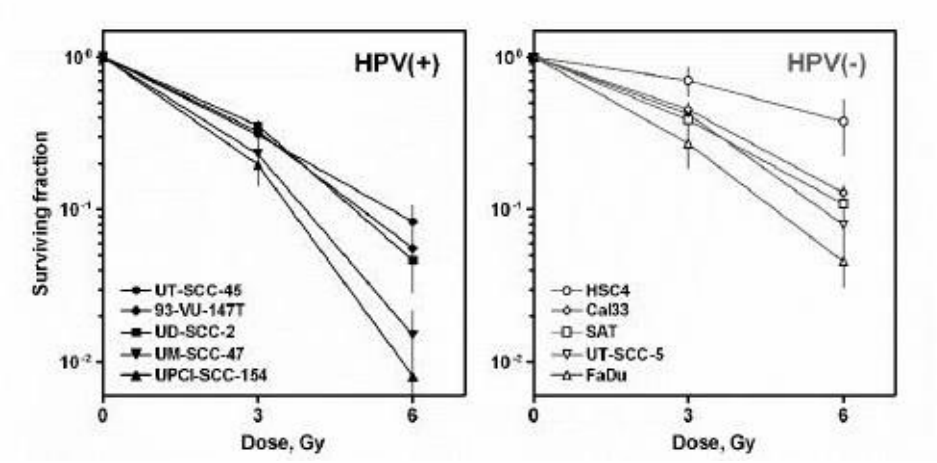


Abbildung 4: Erhöhte Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver HNSCC im Koloniebildungsassay. Exponentiell wachsende Kulturen wurden mit den angegebenen Dosen bestrahlt und 24h später in definierter, geringer Zellzahl zur Koloniebildung ausgelegt. HPV-positive Linien zeigen eine im Mittel höhere Strahlenempfindlichkeit. Abbildung vergrößert aus (Rieckmann et al. 2013).

1.2 Fragestellung: DNA-Schadensantwort HPV-positiver Oropharynxkarzinome in *Ex-vivo*-Kulturen von Kopf-Hals-Tumorgewebe

In der vorliegenden Arbeit ging es um die Fragestellung, ob sich die auf Basis von Zelllinien-Experimenten generierte Hypothese einer veränderten DNA-Reparaturantwort HPV-positiver HNSCC, insbesondere OPSCC, an davon unabhängigem, humanem Tumorgewebe verifizieren lässt.

Hiermit sollte überprüft werden, ob sich die klinisch manifeste erhöhte Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver Tumore plausibel durch diese Hypothese erklären lässt.

Experimentell wurde ein *Ex-vivo*-Assay verwendet, welches von Dr. rer. nat. Sabrina Köcher aus dem Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie/Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für Prostatatumoren etabliert wurde (Kocher et al. 2019). Die Kulturtechnik wurde 2018 von Dr. med. Joanna Berger erfolgreich auf Kopf-Hals-Tumorgewebe übertragen (bisher unveröffentlichte Daten).

Bei dem *Ex-vivo*-Assay handelt es sich um ein Tumormodel, bei dem Tumorfrischgewebe nach Entnahme als dünner Gewebeschnitt kultiviert wird. Die für diese Arbeit verwendeten Proben entstammen den Operationspräparaten von in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf operativ behandelten Patienten, die zuvor einer Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken zugestimmt hatten. Die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten die *Ex-vivo*-Kultivierung von Tumorschnitten als ein robustes System nachweisen, bei den die kultivierten Tumorzellen im Randbereich der Schnittkulturen suffizient oxygeniert und versorgt werden (Abb. 5).

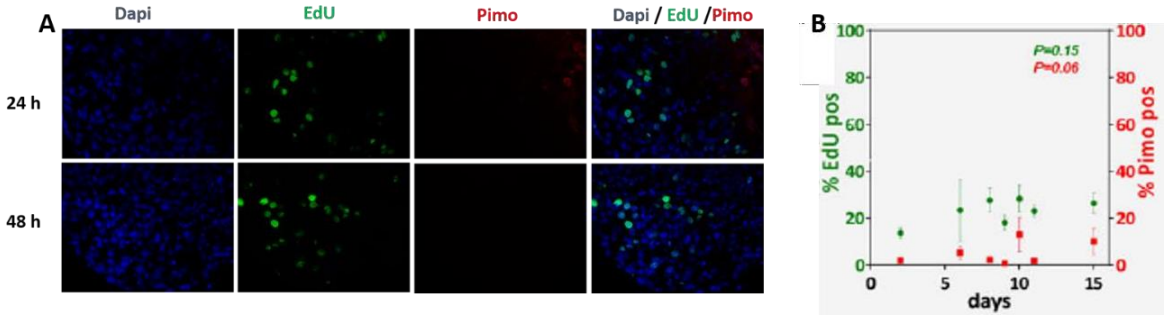


Abbildung 5: Oxygenierung und Proliferation von Kopf-Hals-Karzinomzellen (A) und Prostatakarzinomzellen (B) im *Ex-vivo*-Assay. Die Pimonidazolfärbung zeigt hypoxische Areale an und die 5-Ethynyl-2`-deoxyuridine (EdU)-Färbung prolifierende Zellen. (A) Gleichbleibend hohe Anzahl proliferierender Zellen (Edu, grün) 24 h und 48 h nach Beginn der Kultivierung von Kopf-Hals-Tumorgewebe bei niedriger Anzahl hypoxischer Zellen (Primonidazol, rot). Nicht publizierte Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Joanna Berger. (B) Eine Quantifizierung Edu-und Pimonidazol positiver Zellen der in *ex vivo* kultivierten Prostatatumorzellen zeigt eine unverändert hohe Anzahl proliferierender Zellen auch über einen Kultivierungszeitraum von über 2 Wochen. Abbildung vergrößert und entnommen aus (Kocher et al. 2019).

Das Ziel dieser Arbeit ist die vergleichende Analyse der DNA-Reparaturkapazität von im *Ex-vivo*-Assay kultivierter HPV-positiver und negativer Oropharynxtumore. Dazu wurden diese bestrahlt und 24 h nach Bestrahlung die noch vorhandenen, residuellen DNA-Doppelstrangbrüche quantifiziert und verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die benutzten Materialien sind nachfolgend vornehmlich in Tabellenform aufgeführt.

Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellart	HPV-Status	p53 Status
UD-SCC-2	Hypopharynx	HPV-positiv	wildtyp
UM-SCC-47	Mundhöhle (Zunge)	HPV-positiv	wildtyp
UPSC:SCC-154	Mundhöhle (Zunge)	HPV- positiv	wildtyp
UT-SCC-45	Mundboden	HPV- positiv	wildtyp
HSC-4	Mundhöhle	HPV-negativ	mutiert
SAT	Mundhöhle	HPV-negativ	nicht definiert
UT-SCC-5	Mundhöhle	HPV-negativ	mutiert
UT-SCC-60B	Metastase eines Tonsillenkarzinom	HPV-negativ	mutiert
F 180	Fibroblasten		
MCF-7	Mammakarzinom (Adenokarzinom)		
MDA-MB-231	Mammakarzinom (Adenokarzinom)		
DKMG	Glioblastom		
BS-153	Glioblastom		
DU145	Prostatakarzinom		

Kultivierungsmedium Zelllinien

Spezifisch für die einzelnen Entitäten wurden die üblichen Zellkulturmedien mit entsprechenden Zusätzen wie folgt verwandt:

HNSCC	RPMI	Gibco-Invitrogen
	FBS (10%)	Biochrome
	Penicillin/Streptomycin (1%)	Gibco-Life technologies
Prostatakarzinom +Mammakarzinom	DMEM	Gibco-Invitrogen
	FBS (10%)	Biochrome
Glioblastom	DMEM	Gibco-Invitrogen
	hitzeinaktiviertes FBS (10%)	Biochrome

Kultivierungsmedium *Ex-vivo*-Assay

Dem standardmäßig verwendeten Zellkulturmedium DMEM wurden antimykotische und antibiotische sowie hitzeinaktiviertes (60°C; 30min) fötales Rinderserum (FBS) entsprechend der unten angegebenen Anteile zugesetzt.

DMEM (=Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco-Invitrogen
hitzeinaktiviertes FBS (10%)	Biochrome
Penicillin/Streptomycin (1%)	Sigma-Aldrich
Amphotericin B (1%)	Gibco-Life technologies

Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien/Material	**Firma**
Deckgläschen 24x60mm	Automat Star
Diamindinophenylindole (DAPI)	Merck Millipore
Eosinlösung 0,2%	Medite
Formaldehyd (37%)	Merck Millipore
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom
Hämatoxylin Meyer	Medite
Handschuhe, Nitril	VWR
Millicell® *cell culture inserts* (0.4µm, 30mm	Merck
Messer (Chopper)	Chroma, Feintechnik GmbH
Mounting Medium Entellan ®	Merck Millipore
Nagellack	handelsüblich / Drogerie
Objektträger	Roth
Objektträger Superfrost	Hecht
Pipettenspitzen (10 µl/200 µl/1000 µl)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml/ 2ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 ml/ 50ml)	Greiner
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Serologische Pipetten (2/5/10/25ml)	Sarstedt
Skalpellklingen, steril	Bayha
Sucrose	Serva
TissueTek®	Serva
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt
Tween 20	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco
Vectashield-Eindeckmedium	Vector Laboratories
Xylol	Chemsolute
Zellkulturflaschen (25 cm^2/75 cm^2/175 cm^2)	Sarstedt
6-well Zellkulturplatten	Greiner Bio one

Verwendete Antikörper

Antikörper	**Spezies**	**Firma, Klon- oder Katalognummer**	**Konzentration/ Zelllinie**	**Konzentration/ *ex vivo* Tumor**
anti-53BP1	Kaninchen	Novus Biologicals, NB100-304	--	1:250
anti-γH2AX	Maus	Merck, Klon JBW301	--	1:250
anti-p63	Maus	Abcam, Klon 4A4	1:250	1:250
anti-p63	Kaninchen	Cell Signaling, Klon D2K8X	1:800	1:250
Keratin 5	Maus	Invitrogen, Klon XM26	1:250	--
anti-Maus AlexaFluor594	Ziege	Invitrogen, 1937185	1:1000	1:500
anti-Kaninchen AlexaFluor488	Ziege	Cell signaling technology, 4412S	1:1000	1:500

Verwendete Inhibitoren

Inhibitoren	**Firma**	**Konzentration**
ATM-Inhibitor = KU55933	Tocris Bioscience	5 µM

Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	**Zusammensetzung**
PBS, pH 7,4	137 mM NaCl 10 mM Na2HPO4 2 mM KH2PO4 2,7 2,7 mM KCl
Präparation Gewebeschnitte:	
FixierlösungPFA	4% Formaldehyd in PBS
Sucroselösung	25% Sucrose in PBS
Immunfluoreszenz:	
Permeabilisierung Zelllinien	0.2% Triton X-100 in PBS
Permeabilisierung *Ex-vivo*-Assay	1% SDS in Aqua dest.
Blockierlösung	3% BSA in PBS
Waschlösung	0,5% Tween 20 in PBS
Antikörperlösung	0,5% Tween 20 +1%BSA in PBS

Verwendete Geräte

Gerät	**Firma**
Bestrahlungsgerät	RS225, Gulmay X-ray source (200 kV, 15 mA, additional 0.5 mm Cu filter, dose rate of 0.8 Gy/min)
Gewebechopper	MacIllvine tissue chopper
Mikrotom CryoStar NX70	Thermo Scientific
Pipetten	Research Plus, Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro, Brand
Schüttler	KM-2, Edmund Bühler
	Polymax 1040, Heidolph
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus
Vortexer	Vortex-Genie2 (Scientific Industries)
	IKA Vortex Genius3 (IKA Labortechnik)
Waage	New Classic MS Mettler Toledo
Wärmeschrank	Function line, Haraeus
Zellzähler Coulter Counter	BGR 500, Beckman Coulter

Verwendete EDV-Programme

AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy
GraphPadPrism 5	GraphPad
GIMP 2.10.14	Freie Software
Image J	Freie Software
Microsoft Office 356	Microsoft

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden im Labor für Strahlenbiologie & experimentelle Radioonkologie etablierte Zelllinien für die p63 und Keratin 5 Färbung verwendet. Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinien erfolgte standardmäßig in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 10 % CO2 und 100 % Luftfeuchtigkeit. Unter Beachten der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen erfolgte das Passagieren unter einer sterilen Werkbank nach dem üblichen Prozedere mittels folgender Arbeitsschritte: Absaugen des Mediums, Waschen mit PBS, Ablösen der Zellen mittels Trypsin und anschließend Resuspendierung eines Teils der Zellen in frisches Medium. Die für die Versuche benötigte Zellzahl wurde mit einem Coulter-Counter bestimmt.

2.2.2 Gewebesammlung

Für die *Ex-vivo*-Kultivierung wurden Gewebeproben von Patienten mit einem Oropharynxkarzinom verwendet, welche am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt wurden. Die Proben wurden während der medizinisch indizierten Tumorresektion oder Panendoskopie entnommen, wenn die Patienten zuvor einer Probenentnahme und Nutzung zu Forschungszwecken mündlich und schriftlich zugestimmt hatten. Die Aufklärung des Patienten erfolgte im Rahmen der Aufklärung des operativen Eingriffs mindestens einen Tag vor der Operation. Das Vorliegen einer schriftlichen Aufklärung wurde präoperativ überprüft. Die Sammlung von Tumorgewebe erfolgte im Rahmen der Biobanksammlung für Tumorfrischgewebe bei Kopf-Hals-Karzinomen, welche vom Hamburgischen Beauftragten für Datenschutz und Informationsfreiheit entsprechend §12a para. 5 des Hamburgischen Krankenhausgesetz (HmbKHG) genehmigt wurde. Die zugeordnete Fallnummer der Ethikkommission lautet WF-049/09. Die ausgewählten Patienten haben einer Sammlung, Archivierung und Nutzung ihrer klinischen Daten im Rahmen des Hamburgischen Krebsregisters zugestimmt (HmbKrebsR). Ihre Nutzung im Kontext wissenschaftlicher Projekte ist im §§ 7 und 8 HmbKrebsR verankert. Das Projekt ist im Einklang mit dem UKE Richtlinien und Regularien, mit den ethischen Standards des Institutes, sowie der Deklaration von Helsinki in seiner aktuellen Version.

2.2.3 *Ex-vivo*-Kultivierung von Tumorschnitten

Die Methodik des *Ex-vivo*-Assays für die Kultivierung von Tumorschnitten beruht auf den Vorarbeiten von Köcher et al. (Kocher et al. 2019). Für den *Ex-vivo*-Assay wurden die aus der Panendoskopie und Tumorresektion entnommenen Schnitte unverzüglich nach Entnahme in mit Medium gefüllten Reaktionsgefäßen in das Labor transportiert und innerhalb von ca. 30 Minuten weiterverarbeitet. Aus den Proben wurden 400 µm dicke Tumorschnitte angefertigt. Dies erfolgte entweder mit dem Gewebechopper – oder falls es die Gewebetextur nicht erlaubte – mit dem Skalpell. Die Klingen wurden regelmäßig

auf Schärfe überprüft und bei Bedarf gewechselt. Für HPV-positive und -negative Tumoren wurden, um Kontaminationen mit dem anderen Gewebe auszuschließen, unterschiedliche Messer benutzt. Die Gewebeschnitte wurden auf feinporige, beschichtete Millicell®-Kunststoffmembranen gelegt, die in mit 1 ml Medium befüllten 6er wells inseriert waren (Abb. 6) und somit zur optimalen Sauerstoffversorgung an der Luft/Mediumsgrenze inkubiert. Die Gewebeschnittkulturen wurden anschließend bei 37°C, 10% CO2 und 100% Luftbefeuchtung für 1 Tag, in Ausnahmefällen 2 Tage, kultiviert, um eine Re-Oxygenierung und eine Erholung des Gewebes zu erreichen. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt. Die Gewebeschnitte wurden mit 0 und 3 Gray bestrahlt und anschließend für 2 oder 24 h inkubiert, bevor sie in 4%iger Formaldehydlösung für 1 h fixiert wurden. Bei einigen Tumoren mit ausreichender Gewebemenge wurde in zusätzlichen Ansätzen 2 h vor der Bestrahlung ATM-Inhibitor hinzuzugeben oder mit einer höheren Dosis von 6 Gy bestrahlt.

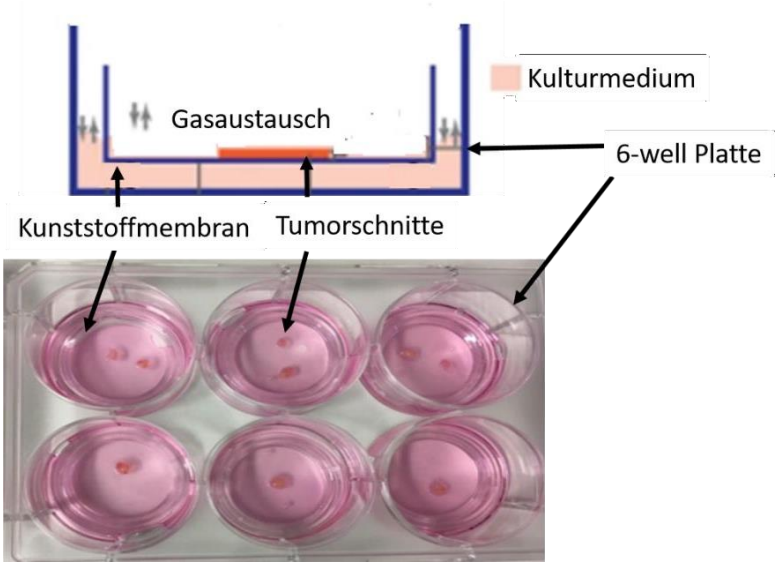


Abbildung 6: Schematischer Querschnitt der *Ex-vivo*-Kultur. Der etwa 400 µm dünne Tumorschnitt wird auf eine feinporige Kunststoffmembran gebettet, die dem Nährstoffmedium aufliegt. Die Oxygenierung erfolgt über die Luft. Abbildung verändert, vereinfacht und Erklärungen übersetzt aus dem Englischen nach (Misra et al. 2019). Im unteren Bildteil erfolgte das Hinzufügen einer Fotoaufnahme eigener Experimente.

2.2.4 Kryokonservierung und -schnitte

Die Formaldehyd-fixierten Tumorproben wurden zweimal jeweils 1 h mit PBS/20 % Saccharose gewaschen. Die Proben wurden mithilfe von TissueTek ® auf Objektträgern eingefroren und bei -80 °C gelagert. Mit dem Kryotom wurden aus den Proben Kryoschnitte mit 5 µm Dicke angefertigt, die bei -20°C bis zur weiteren Verwendung auf Objektträgern gelagert wurden.

2.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Kryoschnitte erfolgte um das Vorhandensein und die Lokalisation der Tumorzellen in den Gewebeschnitten zu kontrollieren. Kryoschnitte wurden hierzu 5 Minuten in Hämalaunlösung gelegt und mit Aqua dest. gespült. Ein langsames Bläuen erfolgte durch lauwarmes Leitungswasser. Anschließend folgte die 2-minütige Inkubation in Eosinlösung. Nach kurzem Abspülen mit Aqua dest. wurden die Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (mit 70, 96 und 100 % jeweils 10 Minuten). Der nun entwässerte Schnitt wurde mit Xylol geklärt und mit dem Eindeckmittel Entellan ® und einem Deckgläschen bedeckt

2.2.6 Immunfluoreszenzmikrokopische Färbung der Tumorfrischgewebe

Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Kryoschnitte 1,5 h mit 1 % SDS in PBS permeabilisiert und über Nacht bei 4 °C in 3 % Rinderserumalbumin in PBS blockiert. Die Schnitte wurden anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern inkubiert und dann dreimalig für 10 Minuten in 0.5 % Tween 20 in PBS gewaschen. Anschließend erfolgten für 1 h die Behandlung mit dem sekundären Antikörper und wieder 2 Waschschritte. Für die Inkubationen wurden die Schnitte in einer feuchten dunklen Kammer gelegt. 40,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurde der Lösung mit den sekundären Antikörper zugesetzt um eine Färbung des Nukleus zu erreichen. Nach Komplettierung der Färbung und ausreichender Trocknungszeit wurden die Objektträger mittels eines kleinen Tropfens *Mounting Medium* gemountet und die Ränder der Deckgläschen wurden mit Nagellack luftdicht verschlossen.

2.2.7 Immunfluoreszenzmikroskopische Färbung von Zelllinien

Unbehandelte Zellen wurden auf Deckgläschen in Zellkulturschalen ausgelegt und am nächsten Tag mit 4 % Formaldehyd bei Raumtemperatur für 10min fixiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 1 % BSA und 0,2 % Triton X-100 in PBS für 10Minuten permeabilisiert wurden. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Zellen in PBS bei 4 °C gelagert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen über Nacht mit 3 % BSA versetzt. Es folgte die Inkubation für 1 h mit den Primär-Antikörper (anti-p63, bzw. Keratin 5) in 1 % BSA und 0,5 % Tween 20 in PBS. Nach drei Waschschritten in 0,5 % Tween20 in PBS mit einer Dauer von 10 min folgte die Inkubation mit den sekundären Antikörper und DAPI und für 1 h und anschließend nochmals 3 Waschschritte. Die Deckgläschen wurden danach mit einem Tropfen *Mounting Medium* auf den Objektträger aufgebracht und mit Nagellack versiegelt. Eine Lagerung der Objektträger erfolgt im Dunkeln bei 4 °C.

2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbruch-Foci

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde unter Verwendung eines Zeiss AxioObservers durchgeführt (Z1-Mikroskop, Objektive: x20, Auflösung 0,44 µm; Plan Apo 63/1,4 Oil

DICII, Auflösung 0,24 µm; Filter: Zeiss 43, Zeiss 38, Zeiss 49). Z-Stapel von halbkonfokalen Bildern wurden unter Verwendung eines Zeiss Apotome, der Zeiss AxioCam MRm Kamera und der Zeiss AxioVision Software durchgeführt. Die Belichtungszeit wurde spezifisch für die einzelnen Antikörper kalibriert und bei den unterschiedlichen Tumoren und Ansätzen konstant gehalten (1200 -1500 ms für p63, 750-800ms für 53BP1, 15-20 ms für DAPI).

Zur Quantifizierung der 53BP1-Foci wurden zunächst in den mikroskopischen Bildern die in den p63-positiven Zellkernen und Kernfragmenten befindlichen 53BP1-Foci manuell gezählt. Danach erfolgte die pixel-basierte Quantifizierung der dazugehörigen Kernfläche mittels Image J durch DAPI-basierte Bildmasken der p63-positiven Zellkerne der jeweiligen Bilder. Die erhaltenen Foci/Fläche-Werte wurden final auf die Fläche eines durchschnittlichen Tumorzellkerns normalisiert. Diese durchschnittliche Kernfläche wurde zuvor durch Quantifizierung der durchschnittlichen Fläche von über 200 optisch vollständigen Nuklei aus 10 verschiedenen *ex vivo* kultivierten Tumoren ermittelt. Die finalen Angaben für jeden Tumor erfolgten somit als Anzahl der 53BP1-Foci pro flächennormierten Nukleus nach folgender Formel:

$$\frac{Anzahl\ der\ Foci}{norm.\ Nukleus} = \frac{Anzahl\ der\ Foci}{DAPI\ Fläche} \times durchschnittliche\ Kernfläche$$

Durch diese Auswertung pro DAPI-Fläche konnten sowohl mittig geschnittene Kerne als auch nicht-mittig geschnittene Kernfragmente in die Analyse einbezogen werden. Da naturgemäß keine Wiederholungsversuche im Ex-vivo-Assay möglich waren, war eine sinnvolle Berechnung von Standardabweichungen pro Präparat nicht möglich und entsprechend finden sich keine Fehlerbalken bei der graphischen Präsentation. Abschließend wurden Mittelwert (und Standartabweichung) der Foci pro norm. Nukleus zwischen HPV-positiven und -negativen Tumoren verglichen. Die Berechnung der Signifikanz (nicht-gepaarter, zweiseitiger T-Test) und Darstellung der Graphen erfolgte mittels Microsoft excel oder GraphPad Prism 6 Software (GraphPad).

3 Ergebnisse

3.1 Projektübersicht

Zum Vergleich der DSB-Reparaturkapazitäten von HPV-positiven und HPV-negativen Oropharynxtumoren wurde Tumorfrischgewebe entsprechend der oben genannten Vorarbeiten (S. Köcher, J. Bartels, Kap. 1.2) in DMEM-Medium auf Zellkultureinsätzen kultiviert und nach einer Erholungsphase von ca. 24 h bestrahlt. Mittels Immunfluoreszenz wurden 53BP1-Foci als Surrogatmarker für residuelle DSB 24 h nach Radiatio in HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren quantifiziert. Die Anzahl der durchschnittlichen residuellen Foci pro Nukleus eines Tumors korreliert dabei negativ mit seiner DNA-Reparaturfähigkeit

Die Arbeitsschritte im Einzelnen werden in Abbildung 7 zusammengefasst und die Ergebnisse nachfolgend detailliert beschrieben:

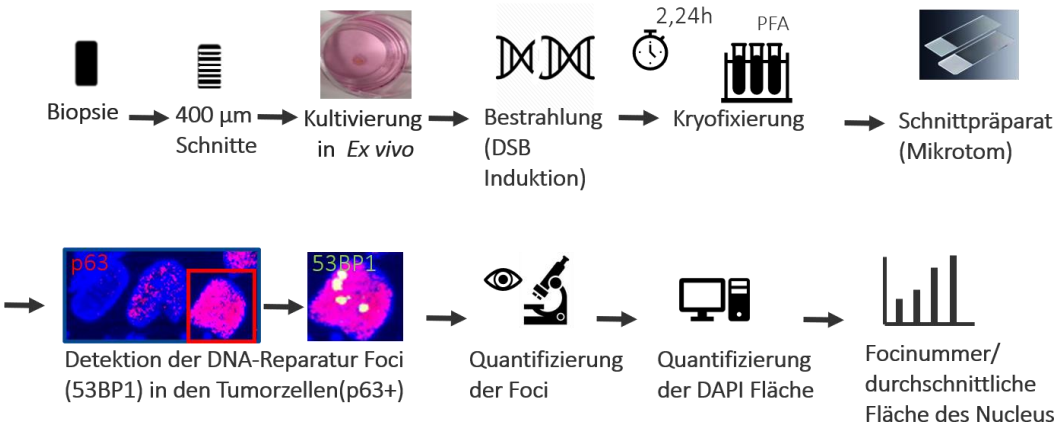


Abbildung 7: Schema der DNA-Doppelstrang (DSB-)messung aus *ex vivo* kultivierten frischen Kopf-Hals-Tumorgewebe. Tumorgewebe wird mit dem Chopper oder Skalpell in etwa 400 µm große Schnitte geteilt, auf kleinporige Kunststoffmembranen auf eine mit Medium gefüllte 6-well Zellkulturplatte gelegt, teilweise bestrahlt und teilweise mit Inhibitoren behandelt. Nach 2 oder 24h erfolgt die Fixierung mit Paraformaldehyd (=PFA) und Tissue-Tek®. Mithilfe des Mikrotoms werden aus dem gefrorenen Tumormaterial feine Kryoschnitte gefertigt (5 µm Schnittdicke). In der Immunfluoreszenz können die durch Bestrahlung induzierten DSB (Fixierung 2h nach Bestrahlung) und die residuellen DSB (Fixierung 24h nach Bestrahlung) durch 53BP1 in den Tumorzellen detektiert werden. Die gleichzeitige Färbung von p63 macht die Tumorzellen sichtbar. Die Quantifizierung der Foci erfolgt manuell. Die Zellkernfläche anhand der DAPI Färbung wird mit Image J berechnet. Zuletzt wird der Wert Foci/Nukleus in normierter Fläche angegeben.

3.2 *Ex-vivo*-Gewebeschnitt-Kultivierung von Kopf-Hals-Tumoren nach Köcher

Entsprechend der in Abbildung 7 beschriebenen Methodik konnten Proben von 14 Oropharynxkarzinom-Patienten (8 HPV-positive und 6 HPV-negative) entnommen, kultiviert und hinsichtlich ihrer DSB-Reparaturkapazität charakterisiert und verglichen werden.

Im Medium transportierte, frisch resezierte Tumorproben wurden dazu innerhalb von 30 Minuten zu 400 µm dünnen Schnitten mit dem Gewebechopper präpariert, sofern dies die Gewebetextur zuließ. Alternativ wurde ein scharfes Skalpell verwendet. Die Schnitte wurden auf feinporigen Kunststoffmembranen kultiviert, welche dem Nährmedium auflagen (Kap. 2.2.3 Abb. 6) und nach 24 Stunden bestrahlt. Die Fixierung erfolgte 2 und 24 h nach Bestrahlung, um sowohl induzierte als auch residuelle Doppelstrangbrüche sichtbar machen zu können. Nach Fixierung in 4%iger Formaldehydlösung wurden unter Verwendung von Tissue Tek ® die Gewebeproben kryokonserviert und anschließend bei -80°C gelagert. Im Folgenden, wurden die Proben mit dem Kryotom zu 5 µm dünnen Schnitten weiterverarbeitet, die auf kältestabilen Objektträgern fixiert wurden. Die Tumorzellen auf den Gefrierschnitten konnten mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Färbung auf die Anzahl der 53BP1-Foci und damit vorliegenden DSB untersucht werden (Abb. 7, Spalte 2, grün). Zur Identifikation der Tumorzellen wurde der Tumormarker p63 verwendet (Abb. 7, Spalte 2, rot). Schlussendlich wurden die Anzahl der Foci quantifiziert und als Foci pro flächennormierten Zellkern angegeben (Kap. 2.2.8).

Die Erfolgsrate dieser Methodik (entnommene/ abschließend auswertbare Proben) konnte von anfänglich 50% auf mehr als 90% gesteigert werden. Die Optimierung erfolgte vor allem durch Modifikationen der Probeentnahme, welche mit Verzicht auf reißende und Verwendung von schneidenden Instrumenten atraumatisch gestaltet werden konnte.

Einzelne Schritte der beschriebenen Methodik (Abb.7) stellen eine Abweichung zum Versuchsprotokoll nach Köcher dar. p63 wurde als Kopf-Hals-Tumormarker verwendet, seine Validität wurde zuvor überprüft (Kap. 3.2). Die Entscheidung für die Detektion von DSB mittels 53BP1-Foci war das Resultat einer vergleichenden DNA-DSB-Analyse mit dem DNA-DSB-Marker γH2AX (Kap. 3.4).

3.3 p63 als Kopf-Hals-Tumormarker

In den Schnittpräparaten von Kopf-Hals-Karzinomen liegen Tumorzellen und peritumorale Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten oder Immunzellen nebeneinander vor. Für die Fragestellung der Arbeit war eine sichere Identifizierung der Tumorzellen notwendig. Die Verwendung eines Tumormarkers mit nukleärer Färbung ist gegenüber einem mit zytoplasmatischer Färbung im *Ex-vivo*-Assay von Vorteil. p63 ist ein nukleär vorkommendes Protein aus der p53-Familie, welches bei Kopf-Hals-Tumorzellen hochreguliert ist und für ihren Nachweis verwendet werden kann (Khan et al. 2012). Um zu überprüfen,

ob p63 verlässlich Kopf-Hals-Tumorzellen detektiert, erfolgten zunächst immunfluorezenzmikoskopische Färbungen an Zelllinien und an *ex vivo* kultiviertem Tumorfrischgewebe.

Abbildung 8A zeigt das Ergebnis einer immunfluoreszenzmikroskopischen Färbung von p63 in einer Mischkultur bestehend aus Tumorzellen einer HPV-positiven Kopf-Hals-Tumor-Zelllinie und einer Fibroblasten-Zelllinie. Als Kontrolle wurde Keratin 5 verwendet, ein Protein der Keratinfamilie, welches im Zytoplasma der meisten Plattenepithelkarzinome hochreguliert wird und als HNSCC-Marker anerkannt ist (Moll et al. 2008): Die in ihrer Morphologie durch die kleine Größe abgrenzbaren HPV-positiven Tumorzellen dieser Linie waren positiv für Keratin 5 und p63, während die Fibroblasten negativ waren (Abb.8).

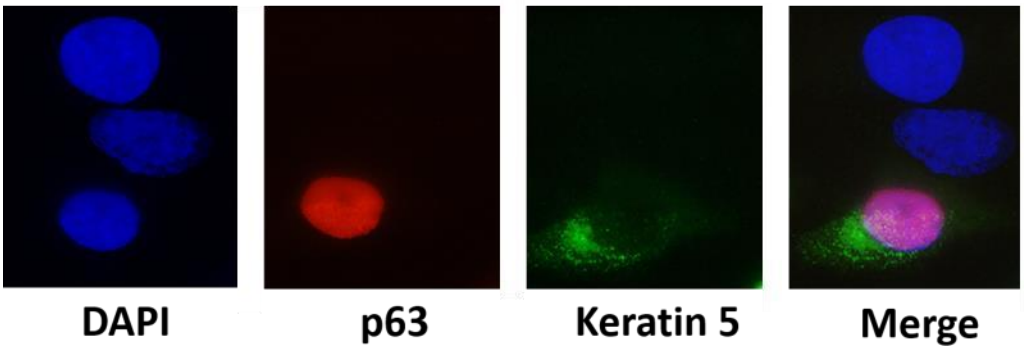


Abbildung 8: Immunfluoreszenz Co-färbung von p63 und Keratin 5 von UD-SCC-2 und Fibroblasten F180 in Mischkultur. p63 und Keratin5 färben spezifisch die UD-SCC 2 Tumorzellen (untere Zelle), während die Fibroblasten negativ für beide Tumormarker sind (obere Zellen).

Anschließend wurde die diagnostische Wertigkeit von p63 als Kopf-Hals-Tumormarker an 4 HPV-positiven und 4 HPV-negativen Kopf-Hals-Tumorzelllinien (darunter eine Lymphknotenmetastase: UT-SCC-60B) und 5 Tumorlinien anderer Entitäten überprüft.

p63 konnte dabei in allen 8 verwendeten Kopf-Hals-Tumorzelllinien detektiert werden, Fibroblasten und Tumoren anderer Entitäten waren p63-negativ Die Intensität der p63 Färbung unterlag zelllinienspezifischen Unterschieden, sowohl innerhalb der HPV-negativen als auch der HPV-positiven Gruppe.

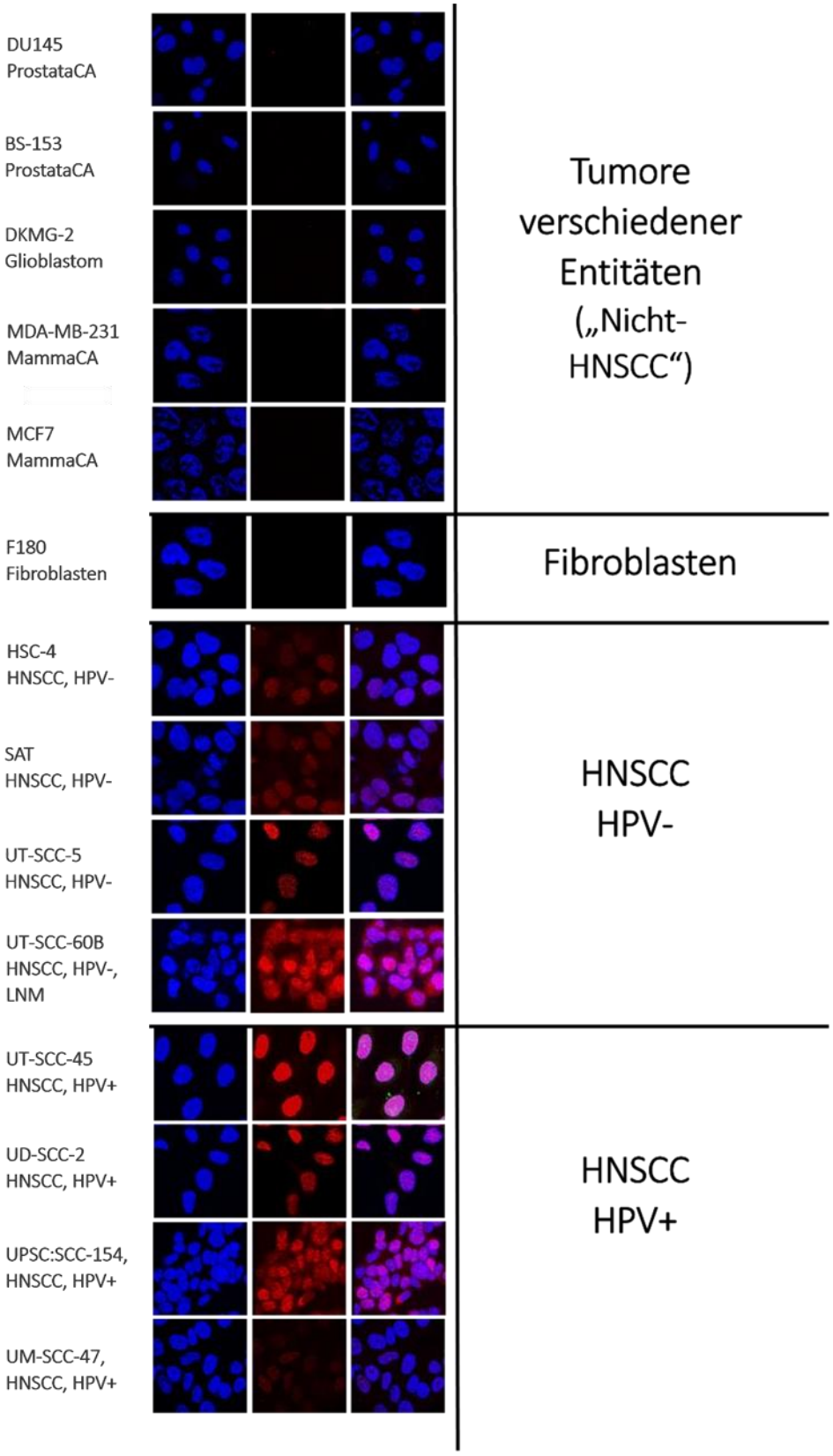
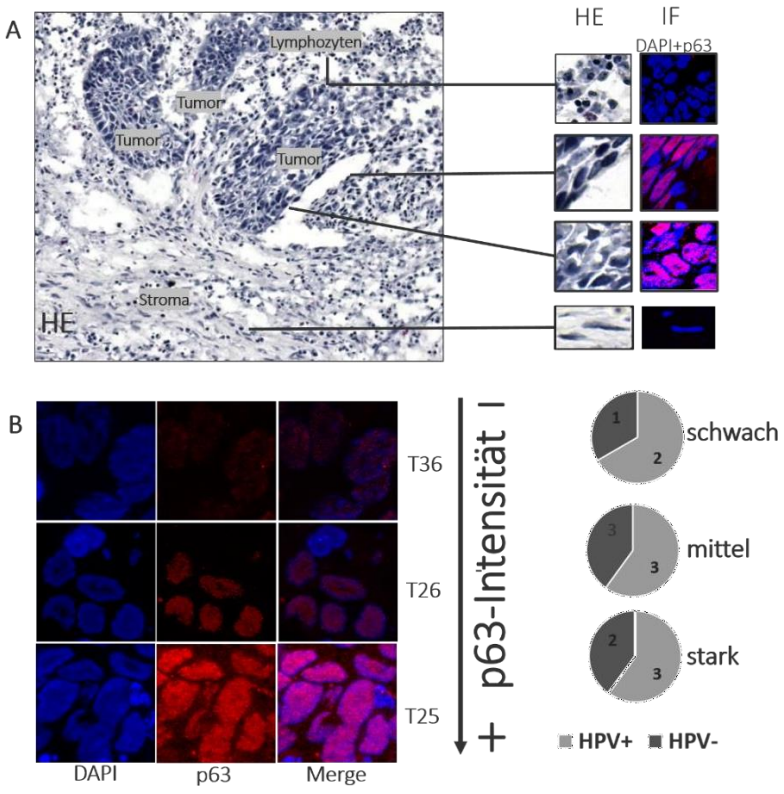
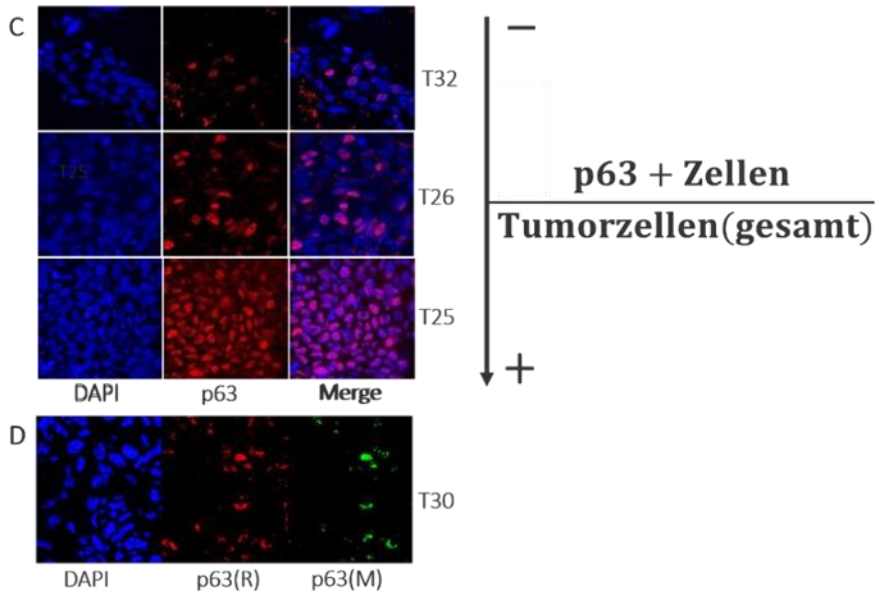


Abbildung 9 Validität von p63 als Kopf-Hals-Tumormarker in Zellllinien. Immunfluoreszenzfärbung von p63 in HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC-Zelllinien, Fibroblasten und Tumorzellen anderer Entitäten (keine Plattenepitheltumoren). p63 färbt spezifisch Tumorzellen von Kopf-Hals-Karzinomen. Abkürzungen: Ker5=Keratin 5, HNSCC=head and neck squamous cell carcinoma, ProstataCA=Prostatakarzinom, MammaCA= Mammakarzinom, LNM= lymph node metastasis, Lymphknotenmetastase.

Abschließend wurde die Funktionalität von p63 als Kopf-Hals-Tumormarker auf den Kryoschnittpräparaten der *ex vivo* kultivierten Tumoren überprüft und die Ergebnisse mit der HE-Färbung verglichen (Abb. 10A). p63 konnte die Tumorzellen von Immunzellen und Zellen des Stromagewebes sicher unterscheiden. Ähnlich der Immunfloreszenzfärbung der Zelllinien variierte die Intensität der p63-Färbung im Laufe des Projektes von Tumor zu Tumor unabhängig vom HPV-Status (Abb. 10B). In einigen Tumoren zeigten sich suspekte, dysmophe Zellkerne p63-negativ. Die Anzahl der mittels p63-Färbung vermutlich falsch negativ detektierten Zellen war von Tumor zu Tumor unterschiedlich. Anhand der Zellkernmorphologie womöglich falsch positiv gefärbte Zellen konnten hingegen nicht beobachtet werden, was für eine hohe Spezifität spricht (Abb. 10C) Zur Überprüfung des verwendeten p63 Antikörper (Spezies Maus) wurde zudem eine Doppelfärbung mit einem zweiten, unabhängigen p63 Antikörper (Spezies Kaninchen) durchgeführt. Dabei wurden die Tumorzellen von beiden Antikörpern gleichermaßen detektiert (Abb. 10D).

Abbildung 10: Validität von p63 in *ex vivo* kultivierten Kopf-Hals-Tumorfrischgewebe. A) Verlässliche Abgrenzung von p63-positiven Tumorzellen und p63-negativen peritumoralen Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung bei Vergleich mit der HE-Färbung. Bei unterschiedlichen Schnitthöhen werden gleiche Gewebeschnittareale und nicht gleiche Tumorzellen korreliert. (B) HPV-unabhängige tumorspezifisch variable Intensität der p63-Färbung . HE= Hämatoxylin-Eosin-Färbung, IF= Immunfluoreszenz. (C) Tumorspezifische variable Sensitivität von p63. (D) Kongruenz des verwendeten Antikörpers (Spezies: Maus) mit einem unabhängigen p63 Antikörper (Spezies: Kaninchen).





3.4 Vergleich von 53BP1-Foci und γH2AX-Foci

Ziel der Arbeit war der Vergleich der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung bei HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC. Durch lokal stark erhöhte Konzentrationen bilden unterschiedliche Markerproteine distinkte, in der Immunfluoreszenz nachweisbare Foci in der unmittelbaren Umgebung von DNA-DSB, welche somit quantifiziert werden können. Die am häufigsten verwendeten Marker sind 53BP1 und γH2AX (Rothkamm et al. 2015). In einer Immunfluoreszenz-Co-Färbung von 53BP1- und γH2AX zeigten sich die 53BP1-Foci als deutlich klarer abgrenzbar als die γH2AX-Foci (Abb. 11).

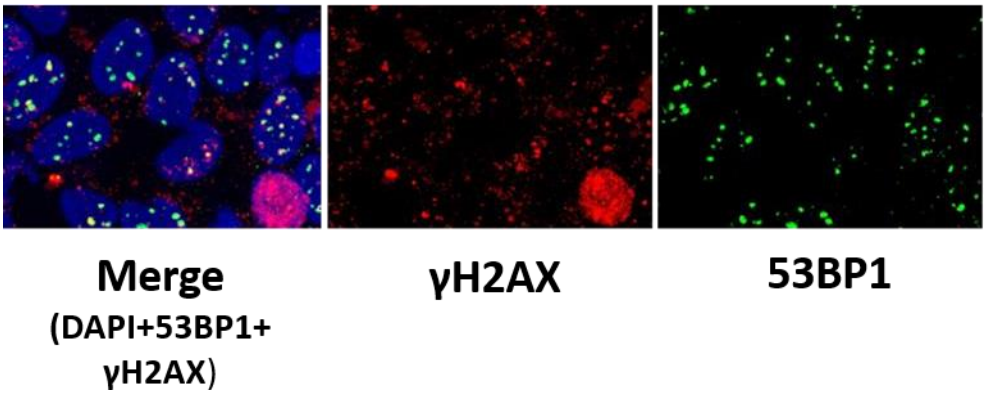


Abbildung 11: Vergleich von residuellen 53BP1 und γH2AX-Foci bei einem *ex vivo* kultivierten HPV-positiven OPSCC (T8) 24 h nach Bestrahlung. Im Vergleich zu den γH2AX-Foci sind 53BP1-Foci wesentlich leichter vom Hintergrund abzugrenzen und quantifizierbar

γH2AX-Foci kolokalisierten zwar oft mit 53BP1, jedoch war zur Detektion eine relativ starke Belichtung notwendig und es fanden sich auch verhältnismäßig viele Signale außerhalb der Nuklei, die somit naturgemäß nicht mit DSBs assoziiert sein konnten. Im Gegensatz zu den γH2AX-Foci waren quasi alle 53BP1-Foci mit γH2AX kolokalisiert, sodass 53BP1 eine hohe Spezifität zuzuordnen ist. Bei den deutlicheren Signalen ist ebenso von einer hohen Sensitivität auszugehen. Für die weiteren Versuche wurden daher 53B1-Foci zur Quantifizierung der DSB verwendet.

3.5 Patientencharakteristika

Nach Etablierung von p63 als Tumormarker und Überprüfung von 53BP1 als DNA-DSB-Marker wurde der *Ex-vivo*-Assay wie oben beschrieben durchgeführt (Kap. 3.1, Kap. 3.2, Abb.7). Es konnten für die strahlenbiologischen Untersuchungen insgesamt 6 HPV-negative und 8 HPV-positive Tumore eingeschlossen werden. Bei allen Patienten handelte es sich um ein neu diagnostiziertes Oropharynxkarzinom. Rezidive, Patienten mit einer vorbestehenden onkologischen Erkrankung sowohl im HNO-Bereich als auch in anderen Lokalisationen sowie Patienten mit einer strahlen- oder chemotherapeutischer Vortherapien befanden sich nicht in der untersuchten Kohorte.

	Pat No	Alter	Geschlecht	Lokalisation	Ed.7 (Ed.8) T	N	M	ECS	p16	HPV	Raucher-status	Pack years	Alkohol status
O-HNSCC HPV-	T7	63	weibl.	Tonsille	4a	3b	0	nein	nein	-	Nichtraucher	0	1 Glas Wein/Tag
	T13	62	männl.	Vallecula	1	0	0	nein	nein	-	Raucher	40	4 Bier/ Woche
	T14	75	weibl.	Zungengrund	4	2c	0	nein	nein	-	ehem. Raucher	30	unklar
	T29	79	männl.	Uvula, Weichgaumen	1	1	0	nein	nein	-	Raucher	30	ehem. Abusus
	T32	66	männl.	retrotonsillär	4a	0	0	nein	nein	-	Raucher	40	Abusus
	T11	61	männl.	Vallecula	4a	3b	0	ja	nein	-	Raucher	45	Abusus
O-HNSCC HPV+	T2	62	männl.	Tonsille	2	2b (1)	0	nein	ja	16	ehem. Raucher	20	Bier/ week-end
	T8	62	männl.	Tonsille	2	1	0	ja	ja	16	Raucher	25	1 Bier alle 2 Tage
	T25	77	weibl.	Tonsille	2	2b (1)	0	ja	ja	16	Nichtraucher	0	3 Gläser Wein/week-end
	T26	53	männl.	Tonsille	2	2a (1)	0	nein	ja	16	Nichtraucher	0	7 Bier/week-end
	T27	57	männl.	Tonsille	1	2 (1)	0	Ja	ja	16	Raucher	5	2 Bier/Tag
	T30	52	männl.	Zungengrund	2	2 (1)	0	Néin	ja	16	ehem. Raucher	10	unklar
	T33	74	männl.	Tonsille, Zungengrund	2	2b (1)	0	Nein	ja	16	Nichtraucher	0	Kein Alkohol
	T36	64	männl.	tonsil	2	1	0	Ja	ja	16	Nichtraucher	0	selten

Tabelle 1: Klinische und histopathologische Charakteristika der eingeschlossenen Patienten. Alter, TNM-Status und Noxenexposition entsprechen den typischen Merkmalen HPV-positiver und-negativer Kopf-Hals-Karzinompatienten. Zur besseren Vergleichbarkeit wird primär die 7. Edition der UICC/TNM-Klassifikation angegeben. Änderungen zur 8.Edition betreffen den N-Status bei den HPV-positiven OPSCC T2, T25, T26, T27, T30 und T33 und werden in Klammern angegeben. Alle Patienten wurden operiert mit Ausnahme von T26 und erhielten je nach Risikoprofil eine adjuvante Radio(chemo)therapie. Der p16-Status wurde mittels p16-Immunohistochemie bestimmt, der-Nachweis von HPV erfolgte mittels HPV-PCR. Alle HPV-positiven OPSCC zeigten den HPV Typ 16. Abkürzungen: Ed. = Edition, ehem.=ehemalig

Der HPV-Status wurde aus dem entnommenen Gewebe entsprechend der klinischen histopathologischen Routinediagnostik bei Kopf-Hals-Karzinomen am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf mittels p16-Immunhistochemie und HPV-PCR bestimmt. Die Patientencharakteristika der eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die klinischen und pathologischen Charakteristika entsprechen typischer Merkmale HPV-positiver und HPV-negativer Kopf-Hals-Karzinompatienten. HPV-negative Patienten zeigten eine häufigere Raucheranamnese und Alkoholexposition während HPV-positive Kopf-Hals-Tumorpatienten jünger waren (Durchschnittsalter: 61,4 Jahre vs. 71 Jahre) und bei geringeren T-Stadien häufiger Lymphknotenmetastasen mit extrakapsulären Wachstum (ECS) zeigten. Alle HPV-positiven OPSCC zeigten den HPV Typ 16.

3.6 Analyse der DNA-Reparaturkapazität bei HPV-positiven und negativen HNSCC

Um zu untersuchen, ob HPV-positive Kopf-Hals-Karzinome sich in der DNA-Reparaturkapazität gegenüber den HPV-negativen unterscheiden, wurde bei den untersuchten Tumoren die Anzahl der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung quantifiziert und die Werte zwischen den beiden Gruppen verglichen. Wie zuvor beschrieben wurden hierzu die Tumore mit 3 Gy bestrahlt und nach einer Inkubationszeit von 2 h zur Kontrolle der radiogen induzierten DSB und nach 24h zur Untersuchung der residuellen DSB fixiert. In der Immunfluoreszenz wurden durch eine Co-Färbung die DSB mittels 53BP1-Foci nur in den durch p63-Positivität markierten Tumorzellen für analysiert.

Wie in Abbildung 12A, Zeile 1 zu sehen, zeigen sowohl HPV-positive als auch HPV-negative Tumore im unbehandelten Zustand nur sehr wenige 53BP1-Foci. Nach Bestrahlung wird in beiden Entitäten eine Vielzahl von Doppelstrangbrüchen induziert (s. Abb. 12A, Zeile 2). Deutliche Unterschiede zeigten sich aber in der Anzahl der residuellen Foci 24 h nach Bestrahlung (Abb. 12A, Zeile 3). Hier zeigten sich in den HPV-positiven Tumoren sichtbar mehr Foci als in den HPV-negativen, in denen nur noch vereinzelt schwach gefärbte 53BP1-Foci verblieben waren. Nach halbautomatischer Quantifizierung mit Image J ergibt sich bei den HPV-negativen Tumoren eine Foci-Anzahl pro normiertem Zellkern in einer Spannbreite von 0,6 bis 2,1 und bei HPV-positiven von 2,4 und 10,1 (Abb.12B). Nach Subtraktion des Hintergrundes, d.h. der Anzahl der Foci in der unbestrahlten Kontrolle des jeweiligen Tumors, ergibt sich eine signifikant unterschiedliche durchschnittliche Foci-Anzahl pro normierten Zellkern von 1,3 bei HPV-negativen und 6,3 bei HPV-positiven, d.h. eine etwa 5-fach erhöhte Foci-Anzahl ($p= 0,0019$; nichtgepaarter, zweiseitiger T-Test) (Abb. 12B).

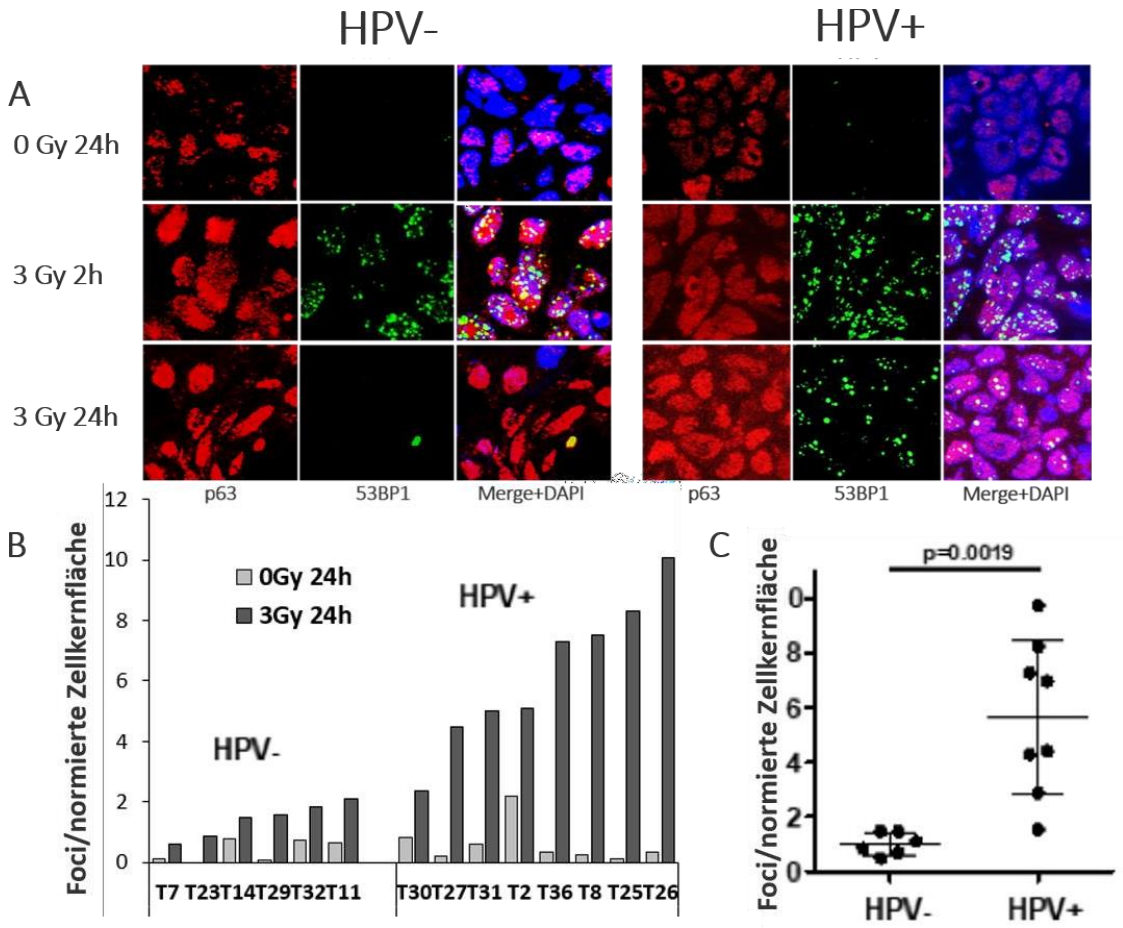


Abbildung 12: Vergleich residueller Foci 24 h nach Radiatio mit 3 Gy bei HPV-negativen (n=6) und HPV-positiven (n=8) OPSCC. (A) Repräsentatives Bild einer Immunfluoreszenz-Co-Färbung mit p63 und 53BP1 in einem HPV-negativen (T7) und einen HPV-positivem (T25) Tumor. Bei ähnlicher Induktion der Foci nach Bestrahlung, bei beiden Tumoren zeigen sich deutlich weniger residuelle Foci beim HPV-negativen Tumor. (B) Quantifizierung der Foci pro normierte Zelllkernfläche 24h nach Bestrahlung mit 3 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Probe. Es zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen HPV-negativen (0,6-2,1 Foci/normierte Zellkernfläche) und HPV-positiven OPSCC (2,4-10,1 Foci/normierte Zellkernfläche). (C) Quantifizierung der residuellen Foci nach Abzug des Hintergrundwertes (0 Gy/24h). Der Unterschied zwischen HPV-positiven und negativen ist hochsignifikant (p=0,0019).

3.7 ATM-Inhibition

Bei 3 HPV-negativen und 6 HPV-positiven Tumoren lag genug Tumormaterial vor, um eine Inhibition von Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), der zentralen Kinase der DNA-Schadensantwort, vor Bestrahlung durchzuführen. Weiterhin wurde eine Dosiserhöhung von 3 auf 6 Gy vorgenommen. Primär dienten diese Versuche der Überprüfung der Funktionalität des *Ex-vivo*-Assays. In beiden Fällen sollte sich eine Erhöhung der residuellen Foci im Vergleich zur Bestrahlung mit 3 Gy zeigen (Rainey et al. 2008).

Die Bestrahlung mit 6 Gy führte im Vergleich zur Bestrahlung mit 3 Gy zu einer höheren Zahl induzierter und residueller Foci bei HPV-positiven und -negativen Tumoren (Abb. 11A und 11C). Bei den einzelnen Tumoren waren die residuellen Foci nach 6 Gy im Vergleich zu 3 Gy um den Faktor 1,3 bis 2,5 (HPV-negativ) und 1,7 bis 2,7 (HPV-positiv) auf ähnliche Weise erhöht. Die Anzahl der residuellen Foci nach 6 Gy bei HPV-positiven im Vergleich zu HPV-negativen bestätigte den bei 3 Gy gemessenen Unterschied (Kap. 3.5).

Eine ATM-Inhibition vor Bestrahlung mit 3 Gy führte zu einer deutlichen Zunahme der Foci-Anzahl bei HPV-negativen Tumoren. Mit einer durchschnittlichen Erhöhung um das 4-fache und einer maximalen Erhöhung der Foci um das 5,8-fache zeigten sich bei HPV-negativen Tumoren eine höhere Anzahl der Foci nach ATM-Inhibition und Radiatio mit 3 Gy als nach einer Radiatio mit 6 Gy (Abb. 13A, 13B).

Im Unterschied hierzu führte eine ATM-Inhibition nur bei einem HPV-positiven Karzinom zu einer deutlichen Erhöhung der Foci-Zahl, während die übrigen HPV-positiven Tumoren sogar etwas niedrigere Werte als nach einer alleinigen Bestrahlung zeigten (T30, Abb.13). Dieser sich ähnlich den HPV-negativen Tumoren verhaltende HPV-positive Tumor (T30) zeichnete sich auch durch die niedrigste Anzahl residueller Foci nach 3 Gy in der HPV-positiven Kohorte aus: Mit einem Wert von 1,6 Foci/ Nukleus (norm.) lag T30 im oberen Bereich der HPV-negativen Tumore (Abb.12C, rechts, unterster Punkt der HPV-positiven Gruppe). Eine ATM-Inhibition führte bei T30 zu einer Erhöhung der Foci-Zahl um mehr als das doppelte im Vergleich zur alleinigen Radiatio (Abb. 13B, mittig, schwarzer Balken).

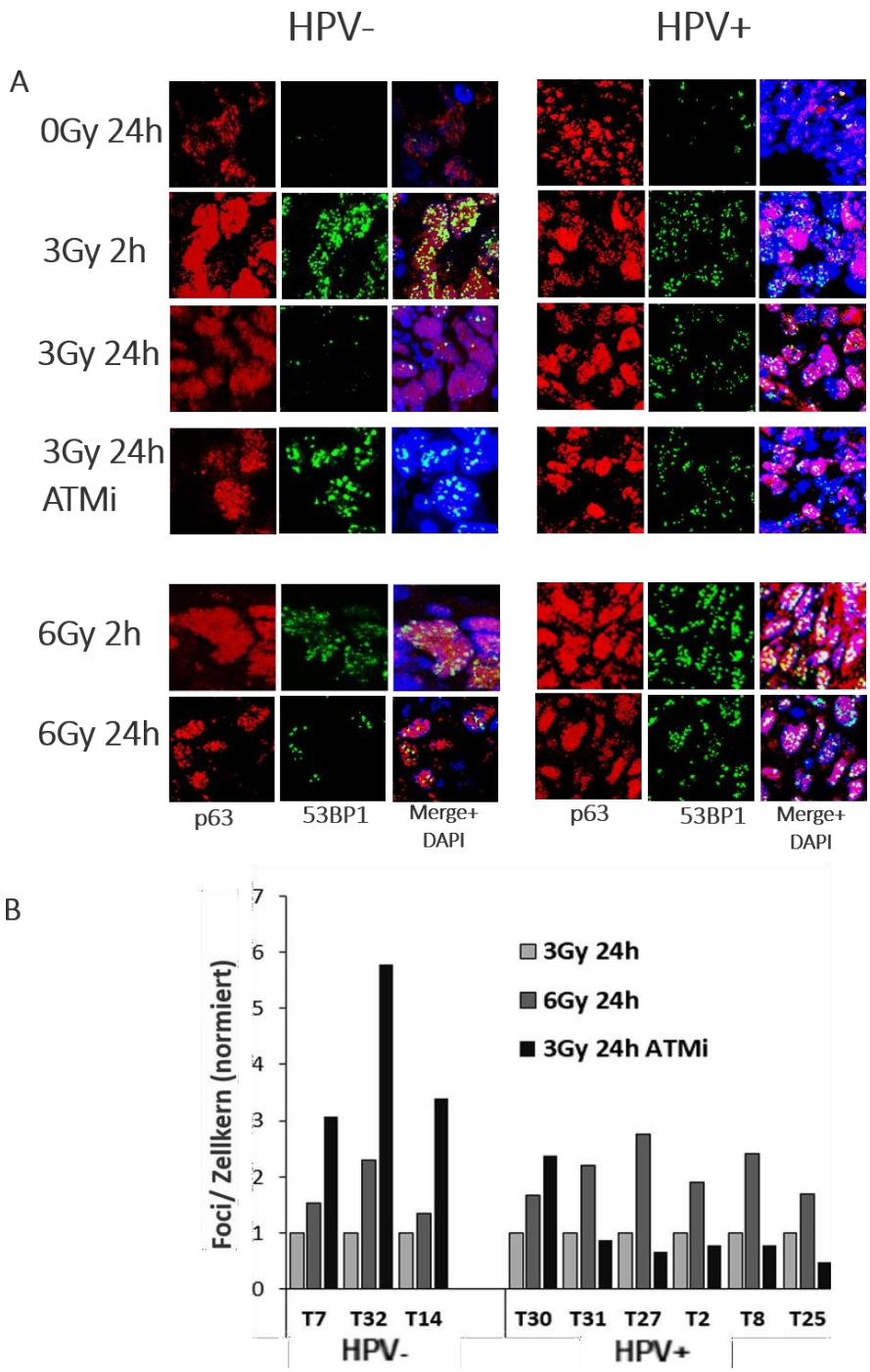


Abbildung 13: Vergleich residueller Foci 24 h nach Radiatio mit 3 Gy, 3 Gy und ATM-Inhibition und 6 Gy bei HPV-negativen (n=3) und HPV-positiven (n=6) OPSCC. (A) Repräsentatives Bild einer Immunfluoreszenz-Co-Färbung mit p63 und 53BP1 in einem HPV-negativen (T14) und einem HPV-positiven (T36) Tumor. ATM-Inhibition erhöht die Zahl residueller DSB deutlich beim HPV-negativen Tumor (rechts), nicht jedoch beim HPV-positiven Tumor (links). (B) Quantifizierung der Foci pro normierte Zellkernfläche 24 h nach Radiatio mit 3 Gy (hellgrau), Radiatio mit 3 Gy und ATM-Inhibition (mittelgrau) und Radiatio mit 6 Gy (schwarz). Erhöhung residueller Foci nach ATM-Inhibition vor Radiatio bei allen HPV-negativen und nur einem HPV-positiven Tumor. Der 3Gy 24h-Wert (Abb. 12B) wurde nach Subtraktion des Hintergrundes (0 Gy 24h) auf 1 normiert. Die Anzahl der Foci/normierten Zellkern nach ATM-Inhibition und Dosiserhöhung auf 6 Gy wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten die aus Zelllinien-Experimenten generierten Ergebnisse, einer beeinträchtigten DNA-Reparaturkapazität HPV-positiver OPSCC, in davon unabhängigen, humanen Tumorfrischgewebeproben statistisch signifikant bestätigt werden.

Auf experimenteller Ebene wurden hierzu humane Tumorgewebsschnitte *ex vivo* kultiviert. Die dazu verwendete Methodik basierte auf den Vorarbeiten des Labors für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Hinsichtlich der spezifischen Fragestellung wurde in dieser Arbeit das Versuchsprotokoll der Vorarbeiten in einigen Punkten angepasst (Kap. 4.1).

Die vorliegenden Ergebnisse sind meines Wissens die ersten, die einen DNA-Reparaturdefekt HPV-positiver Kopf-Hals-Tumoren unabhängig von Zelllinien-Daten belegen. Die These, dass defekte DNA-Reparaturmechanismen und eine erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver Oropharynxtumore wesentlich zur klinisch manifesten erhöhten Strahlensensibilität dieser Tumore gegenüber HPV-negativen OPSCC beitragen, erscheint damit zunehmend plausibel (Kap. 4.2).

Unsere Ergebnisse gaben ferner Hinweise darauf, dass eine Dysregulation ATM-abhängiger Signalwege einen Mechanismus der ineffiziente DNA Schadensantwort und erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver OPSCC darstellt (Kap. 4.3).

4.1 Etablierung eines *Ex-vivo*-Assays für Kopf-Hals-Karzinome zur Messung der individuellen Radiosensibilität (Methodik nach Köcher)

Basierend auf der bereits in den 1960er Jahren durchgeführten Methode der Kultivierung und Analyse gesunder Gewebeschnitte (Bousquet und Meunier 1962, Loffredo Sampaolo 1956) konnte in den letzten Jahren die erfolgreiche Kultivierung von Tumorfrischgewebe nach Anfertigung dünner Gewebeschnitte durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden (Jiang et al. 2019, Menegakis et al. 2015, Naipal et al. 2014, Willers et al. 2015). Der hier vorgestellte und verwendete *Ex-vivo*-Assay basiert auf den Vorarbeiten zur Kultivierung von Prostatatumorgewebe von Köcher et al. (Kocher et al. 2019), unterscheidet sich jedoch von diesem bezüglich einiger Einzelheiten. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Techniken im Vergleich zu der in dieser Arbeit verwendeten diskutiert und die aktuelle und zukünftig mögliche Bedeutung des *ex-vivo*-Assays erörtert.

Kultivierung: Um eine hohe Unversehrtheit des Gewebes vor Kultivierung zu gewährleisten, ist eine möglichst atraumatische Gewebeentnahme zu empfehlen. Bei vielen Lokalisationen gelingt dies mittels Stanzbiopsie (Kocher et al. 2019). Bei Kopf-Hals-Karzinomen sollte auf reißende Instrumente wie beispielsweise einer Probenentnahme mit dem

Doppellöffel verzichtet und scharf schneidende Instrumente verwendet werden. Zur Anfertigung der Gewebeschnitte kann wie in unserem Protokoll ein Gewebechopper oder Skalpell verwendet werden. Je nach Entität und Gewebetextur können auch mit dem Vibratom oder Krumdieck Gewebeschneider zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden (Gerlach et al. 2014, Meijer et al. 2017, Vaira et al. 2010). Bei der Kultivierung der Tumorschnitte werden in unterschiedlichen Gruppen verschiedene technische Methodiken verwendet. Nach der in vorliegender Arbeit angewandten Methode nach Köcher werden die Tumorschnitte auf feinporige Kunststoffmembranen gebettet, die in mit Medium gefüllten 6-well Platten gelegt werden. Durch Positionierung der Tumorschnitte in der Luft-Medium-Grenzschicht wird eine optimale Oxygenierung und Nutrition gewährleistet. Es ist auch möglich, einen Tumorschnitt am Boden einer mit Medium gefüllten Schale zu kultivieren oder ein Gewebestück im Medium unter Rotationsbewegungen flottieren zu lassen. Mehrere Vergleichsarbeiten konnten nachweisen, dass der Einsatz von feinporigen Membranen mit Oxygenierung des Gewebes durch die Luft gegenüber anderen Methoden überlegen ist. Eine besseren Vitalität und niedrigeren Aktivierung von Stressproteinen und weniger genetischen Veränderungen des Gewebes ließen sich nachweisen (Davies et al. 2015, de Hoogt et al. 2017, Meijer et al. 2017). Bei Verwendung der Methodik nach Köcher fanden sich vitale und oxygenierten Zellen verlässlich in den äußeren Schichten des Gewebeschnitts. Die Tumorzellen aus dem Prostatagewebeschnitten im Randbereich konnten bis zu 15 Tage mit gleichbleibenden Oxygenierungs- und Proliferationsstatus in Kultur gehalten werden (Kocher et al. 2019) (Kap. 1.3, Abb.5). Bei Übertragen dieser Methodik auf Kopf-Hals-Tumorgewebe konnten diese Beobachtungen für einen Zeitraum von etwa 72 h reproduziert werden (Berger et al., unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit wurde die Analyse von Tumorschnitten in der Regel 48 Stunden (selten 72 Stunden) nach Kultivierung durchgeführt, was auch das Risiko von Infektionen stark reduziert. Als Nährmedium wurde kohärent zu anderen Arbeiten übliches Zellkulturmedium mit FBS und antibiotischen und /oder antimykotischen Zusätzen verwendet (Gerlach et al. 2014, Naipal et al. 2014).

Fixierung & Lagerung: Die in unserer Arbeitsgruppe praktizierte Lagerung als Formaldehyd-fixierter Gefrierschnitt unter Verwendung von Tissue Tek ® stellt einen klaren Unterschied zu den meisten anderen Arbeitsgruppen dar, die eine Paraffineinbettung vornahmen (Lhuillier et al. 2019, Menegakis et al. 2015, Naipal et al. 2014). Letztere hat zwar den Vorteil, dass sich meist qualitativ hochwertige Hämatoxylin-Eosin-Färbung anfertigen lassen, Einbußen können sich dafür aber in der Qualität und klaren Differenzierbarkeit der Foci in der Immunfluoreszenzfärbung ergeben (Menegakis et al. 2015). Die häufig notwendige Antigen-Demaskierung bedingt vermutlich das verwaschenes Aussehen und verminderte Trennschärfe der einzelnen Foci. Die Methode nach Köcher stellt damit eine technische Verbesserung dar, die vermutlich auch eine genauere Quantifizierung der Foci ermöglicht.

Etablierung des Tumormarkers p63. Eine Modifikation des *Ex-vivo*-Assays nach Köcher für die Verwendung in unserer Arbeit ist die Etablierung des Kopf-Hals-Tumormarkers p63. Bisher wurden Tumorzellen von peritumoralen Zellen in den auszuwertenden

Gewebeschnitte durch die vergleichende Analyse von HE-Schnitten und durch die Morphologie der DAPI-gefärbten Zellkerne unterschieden (Naipal et al. 2014). Vor allem bei Kopf-Hals-Tumoren mit nicht unwesentlichem Anteil von Stroma-, Muskel-, Immunzellen deren Kerne u.a. durch Schnittartefakte nicht immer eindeutig von den Tumorzellkernen unterschieden werden konnten, ist eine sicherere Identifikation der Tumorzellnuklei ein Qualitätsmerkmal. Gerlach et al. nutzen hierfür Zytokeratin, welches sich durch eine zytoplasmatische Färbung auszeichnet (Gerlach et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde p63 verwendet, ein Strukturprotein mit Verwandtschaft zu p53, welches den Vorteil einer nukleären Färbung bietet und bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nahezu ubiquitär nachweisbar ist. Khan et al. konnten in der Untersuchung von 30 Kopf-Hals-Karzinompatienten und 60 gesunden Kontrollen und dem Vergleich einer p63-Immunhistochemie und einer HE-Färbung eine Spezifität von p63, Klon 4A4 von 96,9% bei einer Sensitivität von 86,6% nachweisen. Eine Verbesserung der Sensitivität war für die Fragestellung der Arbeit nicht von Notwendigkeit, könnte aber durch kombinierte Verwendung von anti-p63, Klon 4A4 und anti-p63, Klon Y4A4 erreicht werden (Khan et al. 2012). In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich eine sichere Abgrenzung der HNSCC Zelllinien von anderen Entitäten durch die p63 4A4 Färbung (Abb. 8). Die Beobachtung einer tumorspezifischen Variabilität der p63 Intensität in der Literatur konnte sowohl in den Experimenten mit Zelllinien als auch mit den *ex vivo* kultivierten Tumoren reproduziert werden (Abb. 8, Abb.9A). Eine Korrelation der Intensität zum HPV-Status ist bis dato nicht untersucht worden. In unseren Untersuchungen weisen weder die Zelllinien- noch die *Ex-vivo*-Experimente auf einen klaren Unterschied hin. Weiterhin fand sich in der kleinen untersuchten Kohorte kein Hinweis einer Korrelation zur intrinsischen Radiosensibilität oder – im Unterschied zu Khan et al. – zum Grading des Tumors (Khan et al. 2012). Nach Bestrahlung zeigte sich ebenso keine Veränderung der p63-Intensität. In Zusammenschau ist hier also von einem verlässlichen Tumormarker in der DNA-Reparatur-Analyse von in *ex vivo* kultivierten HPV-positiven und -negativen Kopf-Hals-Karzinomen auszugehen. Aus meiner Sicht ist er einer p53 oder p16 Färbung vorzuziehen, da er sowohl für HPV-negative als auch HPV-positive HNSCC verwendet werden kann. Einer Keratin 5 oder Panzytokeratinfärbung ist er überlegen, weil die nukleäre Färbung gegenüber einer zytoplasmatischen Färbung die eindeutige Identifikation von Tumorzellkernen in Gewebeschnitten v.a. bei nah beieinander liegenden Zellen und schräger Schnittlinie deutlich erleichtert und die Technik damit vermutlich weniger fehleranfällig macht.

DSB-Foci und DNA-Reparaturkapazität. Die zytotoxische Wirkung der Bestrahlung in der Tumortherapie beruht zu einem großen Teil auf der Induktion von DNA-Schäden, wovon DNA-DSB als besonders zelltoxisch angesehen werden. Liegen diese vor, setzen sie DNA-Reparaturmechanismen in Gang um die Intaktheit der DNA wieder herzustellen. Der Grad der Radiosensibilität eines Tumors wird hauptsächlich durch seine DSB-Reparaturkapazität bestimmt (Mladenov et al. 2013). Die Reparatur erfolgt größtenteils durch zwei unterschiedliche Wege: Non-homologous end-joining (NHEJ) und homologe Rekombination (HR). Während beim NHEJ getrennte Stränge unabhängig von ihrer Sequenz wieder zusammengefügt werden, wird bei der HR der jeweils fehlende Strang

durch homologe Vorlage eines Schwesterchromatids über die Bruchstelle neu synthetisiert und kann damit nur in der S- und G2-Phase stattfinden. Das NHEJ ist mit Substanzverlusten verknüpft und im Gegensatz zur HR deutlich fehleranfälliger, findet aber in allen Zellzyklusphasen statt (Davis und Chen 2013). Von diesen beiden klassischen Reparaturwegen existieren mehrere Varianten, vor allem Prozesse, die dem NHEJ ähneln, und als sog. „Alternatives end-joining" bezeichnet werden. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass der Endverknüpfungsmechanismus nicht durch essentielle Proteinen des NHEJ (bestehend aus dem Schadenssensor Ku70/Ku80, der Kinase DNA-PKcs, dem Gerüstprotein XRCC4 und der DNA-Ligase IV), sondern durch andere „alternative" Proteine (u.a. PARP und DNA-Ligase III) reguliert wird (Bennardo et al. 2008, Haber 2018).

Die Messung verbleibender Doppelstrangbrüche 24 h nach Beginn der DNA- Reparatur ist spiegelbildlich für die DNA-Reparaturfähigkeit eines Tumors. Durch lokal stark erhöhte Konzentrationen bilden unterschiedliche Markerproteine distinkte, in der Immunfluoreszenz nachweisbare Foci in der unmittelbaren Umgebung von DNA DSBs, welche somit quantifiziert werden können. Die am häufigsten verwendeten Marker sind 53BP1 und γH2AX (Rothkamm et al. 2015), wobei letzterer insbesondere in Kombination mit dem *Ex-vivo*-Assay deutlich häufiger verwandt worden ist (Menegakis et al. 2015, Naipal et al. 2014). H2AX ist eine Histon Variante, welche durch nach DNA-Schäden aktivierte Kinasen wie ATM, ATR oder DNA-PKcs an ihrem C-Terminalen Ser-139 Rest zu γH2AX phospholisiert wird. An das γH2AX können dann andere Proteine wie das 53BP1 andocken. Es wird postuliert, dass eine erhöhte Spezifität in der Quantifizierung der DNA Doppelstrangbrüche durch eine gemeinsame Bestimmung von 53BP1 und γH2AX erreicht werden kann (Popp et al. 2017, Rieckmann et al. 2013).

Bei in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz-Co-Färbungen von 53BP1 und γH2AX zeigte sich eine hohe Co-Lokalisation von nahezu allen positiven 53BP1-Foci und positiven γH2AX-Foci. Während die Abgrenzung der 53BP1-Foci sehr klar war, waren für die Detektion der γH2AX-Foci hohe Belichtungszeiten notwendig und es fanden sich dann auch Signale außerhalb der Nuklei, die somit natürlich nicht mit DSBs assoziiert sein konnten. (Abb. 10). Im Gegensatz zu den 53BP1-Foci waren also eine Vielzahl der γH2AX-Foci nicht mit den 53BP1-Foci co-lokalisiert. Somit war sowohl von einer höheren Spezifität und bei der entsprechend klaren Signalgebung auch höheren Sensitivität der 53BP1-Foci auszugehen. Da zudem die Co-Färbung mit dem Tumorzellmarker p63 durchgeführt wurde, wurden für die vergleichende Analyse residueller DNA-DSB von HPV-positiven und negativen Oropharynxkarzinomen daher nur die 53B1-Foci zur Quantifizierung der DSB angewandt.

Ex-vivo-Radiosensitivitäsassay in der Literatur. Insgesamt ist die Messung residueller DNA-Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung von *ex vivo* kultivierten Tumorfrischgeweben bereits ein zunehmend etabliertes Mittel um radiobiologische und translationale Fragestellungen zur Radiosensitivität und auch radiosensibilisierender Agenzien bei verschiedenen Tumorentitäten zu adressieren. Sein hohes Potential zeigt sich z.B. durch die Möglichkeit Subgruppen von Tumorpatienten einer Entität abgrenzen zu können,

welche defekte oder veränderte DNA-Reparaturmechanismen aufweisen, die aber (bisher) nicht durch einen prädiktiven Marker identifizierbar sind. Bei diesen Patienten kann die Effizienz von Therapien evaluiert werden, die in DNA-Reparaturprozesse eingreifen. Ein Beispiel ist die Inhibition der in der DNA-Reparatur involvierten Poly(ADP-ribose)-polymerase 1-Enzyme (=PARP) durch Olaparib. Dieses wird klinisch bereits bei Tumorpatienten unterschiedlicher Entitäten im meist fortgeschrittenem Stadium nach genetischem Nachweis einer BRCA-Mutation angewendet, beispielsweise bei Ovarial- und Mammakarzinomen. Stark vereinfacht, ist durch ein defizientes BRCA die homologe Rekombination dieser Tumorzellen dysfunktional und eine DNA-Reparatur zunehmend von PARP-abhängigen Signalwegen abhängig. Naipal et al. konnten mithilfe eines *Ex-vivo*-Radiosensibilitäts-Assays aus einer Gruppe von Mammakarzinompatienten, Tumoren mit HR-Defizienz identifizieren, für die dann tatsächlich BRCA-Mutationen oder BRCA-Promotermethylierungen nachgewiesen wurden (Naipal et al. 2014). Köcher et al. konnte zeigen, dass bei einem Drittel der untersuchten Prostatakarzinome eine Radiosensibilisierung durch PARP-Inhibition erfolgte, was impliziert, dass bei diesen Patienten ein Reparaturmechanismus, das PARP-vermittelte alt-EJ, besonders aktiv ist (Kocher et al. 2019). Durch Identifizierung einzelner Patienten mit bestimmten tumorbiologischen Eigenschaften durch den funktionellen *Ex-vivo*-Assay könnten z.B. durch nachträgliche genetische Analyse Marker erkannt werden, um diese Patienten im klinischen Einsatz einfacher abzugrenzen.

Chancen des *Ex-vivo*-Radiosensitivitätsassays Insgesamt ergeben sich – neben den eben beschriebenen Fragestellungen – multiple präklinische, translationale und klinische Anwendungsgebiete der *Ex-vivo*-Kultivierung von Tumorschnitten. Entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit (Kap. 4.2) können sie Beobachtungen der Grundlagenforschung, die auf anderen präklinischen Tumormodelle wie Zelllinien und Xenograft-Modelle basieren, überprüfen, sinnvoll ergänzen und die Validität erhöhen z.B. bei der Frage nach der Wirksamkeit radiosensibilisierender Substanzen, die potentielle Alternativen zum aktuellen Standard einer platin-haltigen Radiochemotherapie in der kurativen Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen darstellen könnten. Durch ein besseres Abbild der humanen Tumorbiologie durch die Kultivierung von frischen Tumorgewebsschnitten im *Ex-vivo*-Assay könnte damit eine bessere Translation vielversprechender präklinischer Ergebnisse in erfolgreiche klinische Studien ermöglicht werden als bisher. Aktuell liegt die Quote einer erfolgreichen Translation von neuen Therapien von „bench to bedside“ in der Onkologie nur bei etwa 8%, was der prädiktiven Insuffizienz der bisheriger Tumormodelle, meist Xenograft-Mausmodellen, zugeschrieben wird (Mak et al. 2014).

Es ist außerdem denkbar, dass der *Ex-vivo*-Radiosensibilitätsassay bei konkreten Fragestellungen in der Klinik als prädiktiver Test werden kann, insbesondere wenn diese bisher nicht evidenz-basiert beantwortet werden können. Beispiele aus der Kopf-Hals-Onkologie wären das Therapieentscheiden einer primären Radiochemotherapie gegenüber einer Operation mit Adjuvanz bei erstdiagnostiziertem Oropharynxkarzinom (Mehanna et al. 2016) oder die Frage nach dem Mehrwert einer lokalen (Re-) radiatio bei einem systemisch therapierten Patienten mit inoperablen Lokalrezidiv.

Die klinische Durchführbarkeit und Praktikabilität des *Ex-vivo*-Assays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Das bei einer Panendoskopie gewonnene Probenmaterial ist in der Regel für eine Analyse ausreichend und das Vorliegen der Testergebnisse innerhalb einer Woche machbar.

Limitationen des *Ex-vivo*-Radiosensitivitäsassay Bis dato ist allerdings gerade beim individuellen klinischen Einsatz des Assays noch Vorsicht geboten. Aktuell existieren wenig Daten zur Kohärenz der im *Ex-vivo* Assay gemessenen intrinsischen Radiosensibilität mit dem tatsächlichen klinischen Therapieansprechen auf Bestrahlung (Menegakis et al. 2015). Naturgemäß wird von einer hohen Kohärenz ausgegangen, da die Tumorschnittkultivierung in vielen Aspekten den Originaltumor abbildet, da das ursprüngliche zelluläre Mikromilieu erhalten bleibt (Meijer et al. 2017). Es muss aber z.B. bedacht werden, dass in der *Ex-vivo*-Kultivierung von Tumorschnitten eine künstliche gleichmäßige Oxygenierung der Tumorzellen durch die Luft und eine gleichmäßige Versorgung durch das Medium erfolgt. Bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich herrschen in unterschiedlichem Ausmaß intra- und intertumorale hypoxische Bedingungen beispielsweise durch die variable räumliche Entfernung zu Blutgefäßen und Begrenzungen der Diffusion (chronische Hypoxie) oder durch Änderung des Blutflusses und Unterschiede der Gefäßpermeabilität (akute Hypoxie). Diese komplexen Vorgänge können in diesem Modell nicht abgebildet werden. Wie sehr sie die klinische Radiosensibilität eines Tumors im Einzelnen beeinflussen, ist schwer einzuschätzen (Marcu et al. 2018). Weitere im *Ex-vivo*-Assay nur unzureichend abzubildende Vorgänge des komplexen Ökosystems eines Tumors ist seine Immunogenität. Inwiefern diese Einfluss auf die Radiosensibilität nehmen kann, wird intensiv diskutiert (Haikerwal et al. 2015). Es existieren nur wenig Daten bezüglich immunogener Vorgänge auf Tumorschnittkulturen. Kürzlich erschienene Arbeiten weisen aber darauf hin, dass sie in diesem Modell (teilweise) erhalten und untersucht werden könnten (Jiang et al. 2019, Sivakumar et al. 2019).

Eine klinische Überprüfung der experimentell im *Ex-vivo*-Assay gewonnenen Daten zur Strahlensensibilität der eingeschlossenen Patienten ist geplant. Dazu wird die Kohärenz der Werte der residuellen Foci-Zahlen pro Nukleus eines Patienten mit seinem klinischen Ansprechen auf Radiotherapie und seinem weiteren Krankheitsverlauf korreliert werden.

Zusammenfassend trägt diese Arbeit neben der Beantwortung der eigentlichen Fragestellung (Kap. 4.2) auch zur technischen Etablierung des *Ex-vivo*-Assays bei Kopf-Hals-Karzinomen unter Verwendung eines validen Tumormarkers bei. Seine prädiktive Aussagekraft hinsichtlich der individuellen Radiosensibilität bedarf aber noch weiterer Untersuchungen, um seinen weiteren potentiell hohen Nutzen in präklinischen, translationalen und klinischen Fragestellungen abschätzen zu können.

4.2 *Ex-vivo*-Assay bestätigt die Hypothese eines gestörten DNA-Reparaturvorgangs bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen

Eine signifikant bessere Prognose von HPV-assoziierten OPSCC gegenüber Noxen-assoziierten HNSCC, sowie ein besseres Ansprechen vor allem bei Therapieregimen, welche Bestrahlung enthalten, ist auf Grundlage zahlreicher Studien in der Fachwelt anerkannt (Alfaraj et al. 2019, Lassen et al. 2009, O'Sullivan et al. 2012, You et al. 2019). Im Unterschied hierzu werden die möglichen zu Grunde liegenden Ursachen kontrovers diskutiert. Die Hypothese einer defizienten DNA-Reparatur bei HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren konnte durch unsere Untersuchungen in der *Ex-vivo*-Kultur verifiziert werden.

Defekte DNA-Reparatur als Ursache einer erhöhten Strahlensensibilität HPV-positiver HNSCC-Zelllinien: Rieckmann et al. konnte 2013 erstmals eine unterschiedliche Radiosensibilität auf Grundlage einer defekten DNA-Reparatur bei HPV-positiven HNSCC gegenüber HPV-negativen HNSCC nachweisen (Rieckmann et al. 2013). Hierzu wurden 5 HPV-positive und 5 HPV-negative HNSCC-Zelllinien verglichen. Die Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit 3 Gy bei den HPV-negativen Tumoren zeigte sich gegenüber den HPV-positiven deutlich erhöht (SF3 = 0.4455 vs. 0.2827) und korrelierte negativ mit der Anzahl der γ2AX- und 53BP1-Foci. Seither wurde diese Publikation vielfach zitiert und die Beobachtungen einer erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit bei geminderter DNA-Reparaturkapazität HPV-positiver Zelllinien mehrfach reproduziert (Dok et al. 2014, Liu et al. 2018b, Park et al. 2014). Zusammenfassend zeigte sich dabei etwa eine doppelt bis dreifach niedrigere Überlebensrate der Tumorzellen nach Bestrahlung bei HPV-positiven im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien, was mit einer durchschnittlich doppelten Anzahl von residuellen 53BP1/ γH2AX-Foci einherging (Dok et al. 2014, Rieckmann et al. 2013). Obgleich der klaren Daten und deutlichen Unterschiede ist eine direkte Übertragung dieser Beobachtungen auf die Klinik schwierig, da die Anzahl der untersuchten Linien klein und die Aussagekraft von Zelllinien limitiert ist. Diese stellen nur ein ungenaues Modell eines Tumors z.B. ohne Betrachtung seines Mikromillieus und der Heterogenität der Tumorzellen dar. Prolongiertes Kultivieren kann außerdem tumorbiologische Charakteristika verändern, beispielsweise. können sekundäre Mutationen induziert werden (Gillet et al. 2013). Eine besondere Problematik ergibt sich hinsichtlich der damals sowie aktuell wenigen weltweit verfügbaren HPV-positiven HNSCC-Zelllinien. Eine höhere Strahlensensibilität ist vor allem bei Patienten mit Oropharynxtumoren - klassischerweise der Tonsille und des Zungengrunds - beschrieben (You et al. 2019). Die meisten HPV+ Zelllinien entstammen ursprünglich von Patienten, welche nicht an einem Karzinom des Oropharynx litten (UT-SCC-45 und 94-VU-147T: Mundhöhle, UD-SCC2: Hypopharynx, usw.) und außerdem teilweise eine positive Noxenanamnese aufwiesen (Olthof et al. 2015), welches die Prognose auch bei HPV-positiven Tumoren negativ beeinflusst (Gronhoj et al. 2019). Zudem ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Eigenschaften die Etablierung HPV-positiver HNSCC-Zelllinien aus Tumorgewebe begünstigen und die wenigen gewonnenen Linien somit einen bestimmten Typus repräsentieren, der nicht unbedingt repräsentativ sein muss.

DNA-Reparaturkapazität HPV-positiver und –negativer OPSCC im *Ex-vivo*-Assay: Der wissenschaftliche Mehrwert der aktuellen Arbeit besteht darin, dass erstmals der zuvor in Zelllinien beschriebene DNA-Reparaturdefekt in Tumorgewebe einer von den Zelllinien völlig unabhängigen Patientenkohorte gezeigt werden konnte. In unsere Analysen wurden 14 Patienten, die an einem Oropharynxkarzinom operiert wurden, eingeschlossen. Davon zeigten 6 einen negativen und 8 einen positiven HPV-Status. Die histopathologischen und klinischen Merkmale zeigten sich typisch für die beiden Gruppen (wie z.B das jüngere Alter, die geringe Noxenexposition und der häufigere positive N-Status bei HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen. Der Primarius der HPV-positiven Tumoren befand sich vor allem an der Tonsille und dem Zungengrund. Alle HPV-positiven Tumoren waren mit HPV16, dem in HNSCC klar vorherrschenden Virusstamm, assoziiert. Obgleich die HPV-positiven Tumore ein kleineres T-Stadium als die HPV-negativen aufwiesen, zeigten sie häufiger eine zervikale Lymphknotenmetastasierung, die als charakteristisch für diese Entität beschrieben ist (Kobayashi et al. 2018). Unsere Ergebnisse zeigten in dieser als klinisch reprösentativ anzusehenden Kohorte bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen eine im Mittel ca. 5-fach höhere Anzahl residueller 53BP1-Foci 24 Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zu den HPV-negativen (p=0.0019) (Abb. 12). Tatsächlich wies nur ein HPV-positiver Kopf-Hals-Tumor Foci-Zahlen im Bereich der HPV-negativen Tumoren auf. Das Verhältnis der residuellen Foci bei HPV-positiven Tumoren gegenüber HPV-negativen war im *Ex-vivo*-Assay somit im Mittel tatsächlich sogar höher als in den Zelllinienexperimenten bei den Experimenten von Rieckmann et al. (ca. Faktor 5 vs. Faktor 3) (Rieckmann et al. 2013).

Der *Ex-vivo*-Assay wies damit klar auf einen Reparaturdefekt der HPV-positiven Oropharynxkarzinome hin. Limitierend muss bedacht werden, dass unsere Untersuchungen nicht dafür konzipiert waren, andere mögliche Ursachen der klinisch evidenten Radiosensitivität von Kopf-Hals-Karzinomen zu bewerten. Es kann nicht beantwortet werden, inwiefern eine mögliche stärkere Immunogenität von HPV-positiven Tumoren, wie einige Autoren vermuten (Balermpas et al. 2016, Rodel et al. 2019, Welters et al. 2018), gegenüber der defekten DNA-Reparatur zu diesem klinischen Effekt beiträgt oder ob mögliche Interaktionen bestehen. Dies bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen. Die in dieser Arbeit gezeigten klaren Ergebnisse, ihre Kohärenz mit der bestehenden Literatur sowie die Verwendung eines realitätsnahen Tumormodells geben ein starkes Indiz für die Relevanz einer defizienten DNA-Reparaturfähigkeit der HPV-positiver Oropharynxkarzinome für ihr klinisches Therapeansprechen.

Strahlensensibilität anderer HPV-assoziierter Tumorentitäten. HPV-assoziiert sind neben Oropharynxkarzinome auch Zervixkarzinome (96%), Analkarzinome (93%) sowie Vaginalkarzinome (64%) und Vulvakarzinome (36%) (Cobos et al. 2014). Die Onkogenese in diesen Entitäten wird über E6 und E7 ähnlich gesteuert wie bei HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren. Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass auch diese Tumorentitäten bei einer HPV-Assoziation ein verbessertes Ansprechen auf eine Radiatio oder Radiochemotherapie zeigen (Allo et al. 2019, Horne et al. 2018, Kabarriti et al. 2019, Serup-Hansen et al. 2014). Um feststellen zu können, inwiefern eine defiziente

DNA-Reparaturfähigkeit für HPV-assoziierte Tumore charakteristisch ist, wäre die Untersuchung anderer Entitäten von hoher Relevanz. Eine vergleichende Analyse der DNA-DSB-Reparatur HPV-positver und-negativer Vulvakarzinome unter Anwendung des *Ex-vivo*-Assays ist in Kooperation mit der Klinik für Gynäkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bereits initiiert.

Klinische Relevanz des biologischen Verständnisses der HPV-spezifischen Radiosensibilität bei Oropharynxkarzinomen/ Exkurs Deeskalationstudien. Das Verständnis der Ursachen für die bessere Radiosensibilität HPV-positiver Oropharynxkarzinome hat eine hohe klinische Relevanz. Betroffene Patienten haben zwar mit einer 5-Jahresüberlebensrate von ca. 90% eine deutlich bessere Prognose als HPV-negative (ca. 50%) (Ang et al. 2010), erleiden aber unter der meist multimodalen Therapie bestehend aus Operation und adjuvanten (Radio-)chemotherapie oder einen primären Radiochemotherapie häufige akut und spät auftretende Nebenwirkungen. In der gepoolten Analyse von drei RTOG-Studien konnte gezeigt werden, dass 43% der Patienten nach Radiochemotherapie an Spättoxizitäten litten, z.B. funktionellen laryngealen und pharyngealen Dysfunktionen wie Sprech- und vor allem Schluckprobleme (Denis et al. 2004, Machtay et al. 2008). Dixon et al. konnten nachweisen, dass 20-30% der Oropharynxkarzinompatienten, die kurativ mit einer primären Radiochemotherapie behandelt wurden, auch Jahre nach Therapie keine orale Kost zu sich nehmen konnten und auf eine Ernährung über eine Magensonde angewiesen waren (durchschnittlich Zeitabstand zum Therapieende: 3,5 Jahre) (Dixon et al. 2018). Bei kaum einer anderen Tumorart sind die Auswirkungen auf die Lebensqualität auch nach überstandener Tumorerkrankung so gravierend wie bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen, die u.a. an Arbeitsunfähigkeit und Depressionen und Suizidgedanken leiden (Kam et al. 2015, Mehnert et al. 2014, Oechsle et al. 2014, Osazuwa-Peters et al. 2018). Aufgrund der prätherapeutisch meist uneingeschränkten Lebensqualität der jungen HPV-positiven Kopf-Hals-Tumorpatienten ist die onkologische Erkrankung und ihre Folgen besonders einschneidend (de Graeff et al. 2000). Die therapieassoziierten starken Nebenwirkungen auf der einen Seite und die guter Prognose HPV-positiver Kopf-Hals-Karzinome auf der anderen bilden die Rationale für deeskalierende Therapieansätze bei HPV-positiven Tumoren. Ziel ist es, Therapien so zu modifizieren, dass Nebenwirkungen minimiert, die Therapieeffizienz aber erhalten bleibt. Eine Reihe an klinischen Studien untersucht hierzu verschiedene Ansätze: Reduzierung der Strahlendosis (NCT02254278a NRG HN002), eine transorale Operation mit risiko-adaptierter Adjuvanz (NCT01898494 ECOG 3311) oder eine Induktionschemotherapie und anschließende Bestrahlung mit ggf. Reduktion der Dosierung bei guter Ansprechrate auf eine Chemotherapie (NCT01084083a ECOG 1308, NCT01706939 Quarterback trial). Eine andere Überlegung war eine Modifikation des Therapieprotokolls der primären Radiochemotherapie durch den Austausch von Cisplatin mit Cetuximab. Hierzu wurden 2019 die Ergebnisse zweier Phase-III-Studien De-ESCALaTE HPV und RTOG 1016 publiziert (Gillison et al. 2019, Mehanna et al. 2019). Das Studiendesign war in beiden Studien ähnlich. Nach 1:1 Randomisierung wurden die Patienten im Standardarm mit Bestrahlung und Cisplatin und im experimentellen Arm

mit Bestrahlung und Cetuximab behandelt. Die RTOG 1016 war als „nicht-Unterlegenheits-Studie“ konzipiert (primärer Endpunkt: Gesamtüberleben), während bei der De-ESCALaTE HPV als primären Endpunkt das Auftreten von Toxizitäten definiert wurde. In den statistischen Überlegungen war man von einer gleichen Effektivität beider Therapieregimen ausgegangen (Bonner et al. 2006). Beide Studien konnten zeigen, dass der Austausch von Cisplatin durch Cetuximab in der kombinierten Therapie mit einer Radiatio nicht nur zu keiner Minderung der Toxizitäten führte, sondern auch dass die Patienten im experimentellen Arm einen signifikanten Überlebensnachteil im Gesamtüberleben und rezidiv-freien Überleben zeigten (RTOG 1016: 5-Jahresüberlebensrate von 77,9% in der Behandlungsgruppe mit Cetuximab vs. 84,6% im Standarttherapiearm, De-ESCALaTE HPV: 2-Jahres-Überlebensrate 97·5% vs. 89·4%). Hiermit konnte bei einer großen Patientenkohorte gezeigt werden, dass Cetuximab nicht als gleichwertge Alternative zu Cisplatin in der primären Radiochemotherapie zu werten ist und keinesfalls geringradige Toxizitäten aufweist. Eine De-Intensivierung durch eine Reduk- tion der Strahlendosis bei ausgewählten Patienten scheint möglicherweise ein potentiell vielversprechenderer Ansatz zu sein. Chera et al konnten in einer prospektiven Phase 2 Studie ein gutes Gesamtüberleben und auch bei Reduktion der Strahlendosis auf 60 Gray zeigen. Hierzu wurden Patienten mit minimaler Raucherhistorie und niedrigem Tumorstadium eingeschlossen (Chera et al. 2018). Das Studiendesign anderer Studien sah eine risikoadaptierte Reduktion der Strahlendosis nach Induktionschemotherapie (ICT) vor, wobei der Erkrankungsstatus/das Therapieansprechen nach Beenden der Induktion die Strahlendosis festlegte (56-60Gy) (Marur et al. 2017). Marur et al. konnte zeigen, dass eine deutliche Verbesserung der Schluckfunktion bei Dosisreduktion unter 60 Gy zu messen war, Nachteile ergaben sich aber durch die längere Therapiedauer und erhöhten Toxizitäten und Therapieabweichungen in der Phase der Induktion, kohärent mit den Ergebnissen anderer Deeskalationsstudien (Phase II), die eine Induktionschemotherapie im Protokoll enthielten (Chen et al. 2017, Misiukiewicz et al. 2019).

Im Hinblick auf die aktuelle Studienlage ist eine Therapie-Deeskalation von HPV-positiven Oropharynxkarzinomen nach allgemeinem fachwissenschaftlichem Konsens außerhalb von Studien ausdrücklich nicht indiziert, auch wenn Untersuchungen zeigen, dass dies in der Praxis bereits durchgeführt wird (Cramer et al. 2018, Wirth et al. 2019). Die Konzepte von Deeskalationsstudien werden im Kontext der bisherigen Ergebnisse in der Fachwelt hinterfragt. Es besteht eine besondere Problematik, da eine hoch effiziente Standarttherapie bei einer jugen Patienten auf den Prüfstand gestellt wird. Es ist zu bedenken, dass trotz der hohen Nebenwirkungsrate einer Therapie, Kopf-Hals-Patienten unabhängig vom HPV-Status die Kuration als oberstes Therapieziel angeben (List et al. 2004, Windon et al. 2019). Nach dem medizin-ethischen Grundsatz, dass bei jeder ärztlichen Behandlung primär der Patient nicht zu schaden sei („Primum non nocere“), müssen Deeskalationsstudien mit entsprechender Vorsicht durchgeführt werden und aus den negativen Ergebnissen der De-ESCALaTE HPV und der RTOG 1016, bei der de facto kumulativ ca. 500 Patienten mit exzellenter Prognose im experimentellen Arm untertherapiert wurden, Lehren gezogen werden (Ventz et al. 2019, Wirth et al. 2019).

Während die experimentellen Daten bzgl. dieses Studiendesigns, einer Überlegenheit von Cetuximab und Bestrahlung zu Cisplatin und Bestrahlung, lückenhaft waren, wird daran appelliert valide präklinische Daten klinischen Studien vorausgehen zu lassen (Rieckmann und Kriegs 2019). Aus radiobiologischer Sicht sollten beispielsweise bei Therapieregimen mit „molekularen targets“ und Bestrahlung radiosensibilisierende Effekte experimentell nachgewiesen werden (Harrington et al. 2011).

Neben der Art der Deeskalation ist aber auch die Art der Stratifizierung für den Erfolg klinischer Studien zu überprüfen. Diese basiert bei den meisten Studien auf der Arbeit von Ang. et al von 2010, einer retrospektiven Auswertung der Überlebensdaten von amerikanischen Patienten, welche mit einer primären Radiochemotherapie behandelt wurden. Den Prognosedaten wurden klinischen Charakteristika zugeordnet und entsprechende Risikogruppen (high, intermediate, low risk) für den Krankheitsverlauf definiert. Entscheidend waren Raucherstatus und die Anzahl der pack years, sowie T- und N-Status. Inwiefern diese Daten von einer amerikanischen Kohorte z.B. auf eine europäische zu übertragen ist, ist fraglich. Bei letzteren könnte bei einen deutlich höheren Anteil an Rauchern (entsprechend einer Studie aus Frankreich hatten 56% der Tumore eine positive Noxenanamnese (Mirghani et al. 2018) und angesichts der hohen prognostischen Aussagekraft des Raucherstatus eine genauere Stratifizierung sinnvoll sein. Bezüglich den Ergebnissen des *Ex-vivo*-Assays ist zu bemerken, dass auch innerhalb der von uns untersuchten HPV-positiven Kohorte eine hohe Variabilität bestand. Ähnlich wie bei den Ergebnissen mit den Zelllinien (Rieckmann et al. 2013) zeigte sich im *Ex-vivo*-Assay bei einem Tumor (T30) eine Radiosensibilität, die eher der HPV-negativen Gruppe entsprach. Der Patient hat nur eine moderate Raucheranamnese (<10 pack years) und kein fortgeschrittenes Stadium, wäre also entsprechend der Kriterien nach Ang et al. der low-risk-Gruppe zugeordnet worden. Unter den im *Ex-vivo*-Assay kultivierten Tumorproben, zeigten 4 von 8 der Patienten ein positiven Raucherstatus, welcher nicht mit der Anzahl an DNA-Doppelstrangschäden korrelierte. Auch wenn im statistischen Mittel bei epidemiologischen Auswertungen der Raucherstatus für die Prognose bestimmend ist, ist es mitunter für die Therapieentscheidung eines einzelnen Patienten ein ungenaues Mittel der Stratifikation und zusätzlich als anamnestisch erhobene Größe fehlerhaft.

Hinsichtlich dessen, dass innerhalb der Gruppe der HPV-positiven Oropharynxkarzinome deutliche tumorbiologische Unterschiede bestehen, ist ein besseres mechanistisches Verständnis der besseren intrinsischen Strahlensensibilität dieser Patientengruppe notwendig um effiziente und sichere Deeskalatonsstudien zu konzipieren. Eine Stratifikation auf Grundlage der bereits bekannten prognostische Marker ist hier mitunter sinnvoll (Balermpas et al. 2016, Chatfield-Reed et al. 2020, Hajek et al. 2017).

Ex-vivo-Radiosensibilitätsassays im Kontext von klinischen Deeskalationsstudien. Der Ex-vivo-Assay könnte die oben beschriebenen bestehenden Problematiken, die sich bei der Konzeption von klinische Deeskalationsstudien ergeben, adressieren. „Molecular targets“ könnten auf ihre radiosensibiliserende Wirkung im *Ex-vivo*-Assay an einen realitätsnahem Tumormodell vor dem klinischen Einsatz getestet werden. Experimentelle Therapien könnten gegenüber Standarttherapien im *Ex-vivo*-Assay bei einer Vielzahl

von Patienten verglichen werden. Eine Stratifizierung geeigneter Patienten für eine Deeskalationstherapie könnte durch den *Ex-vivo*-Assay erfolgen. Dies könnte in ein Studiendesign aufgenommen werden. HPV-positive Tumorpatienten mit einer vergleichsweisen guten DNA-Reparaturantwort und damit schlechteren Radiosensibilität könnten von Deeskalationsstudien ausgeschlossen werden, während bei strahlensensiblen beispielsweise eine Dosisreduktion vorgenommen werden könnte.

Zuvor ist die Korrelation der präklinisch gemessenen mit der tatsächlichen klinischen Radiosensitivität essentiell. Um die Größe der zu untersuchenden Kohorte zu erweitern ist ein Kooperationsprojekt mit der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und der Klinik für Pathologie des Universitätsklinikums Maastricht innitiiert (Prof Speel, Prof. Kremer). Ziel ist es, die Messung von residuellen 53BP1-Foci im *Ex-vivo*-Assay als Surrogatmarker der Strahlensensibilität in einer multizentrischen Kohorte zu validieren und die Integration des *Ex-vivo*-Assays in klinische Studien voranzutreiben.

4.3 Potentieller Defekt der ATM-abhängigen DNA-Schadensantwort bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen

Die Rolle von ATM in der DNA-Schadensantwort

Die Serin/Threonin-Kinase Ataxia Telangiectasia Mutated ATM ist zentral für die Funktionalität der DNA-Schadensantwort. Sie ist das Produkt des ATM Gens, welches bei Patienten mit einer Ataxia teleangiectasia defekt ist. Diese Erkrankung ist durch Neurodegeneration, Immundefizienz, erhöhter Wahrscheinlichkeit für Krebsentstehungen und einer extremem Hypersensibilität gegenüber Bestrahlung und Doppelstrangbruch-modifizierenden Agenzien gekennzeichnet (Rothblum-Oviatt et al. 2016). Zusammenfassend und vereinfacht wird ATM bei Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert und initiiert durch Phosphorylierungsprozesse verschiedene Signalkaskaden sowie über eine Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren am DSB eine Aktivierung der DNA-Reparaturwege HR als auch NHEJ (Batey et al. 2013, Chun und Gatti 2004, Shiloh 2006).

ATM-Inhibition von HPV-positiven Tumoren im *Ex-vivo*-Assay

In unseren Arbeiten führten wir eine ATM Inhibierung vor Bestrahlung durch, um die Funktionalität des *Ex-vivo* Assays zu prüfen, anlehnend an die Vorarbeiten von Köcher et al (Kocher et al. 2019). Durch die zentrale Rolle für die DNA-Reparatur ist bei einer Hemmung von ATM eine Dysfunktionalität dieser Prozesse zu erwarten, resultierend in einem deutlichen Anstieg der Anzahl residueller Foci (Kocher et al. 2019, Rothkamm et al. 2015). Dies konnte bei den HPV-negativen Tumoren wie erwartet demonstriert werden. Die ATM Inhibition vor Bestrahlung führte bei diesen Tumoren zu einer deutlichen Erhöhung der Foci-Zahl, die höher war als bei Bestrahlung mit 6 Gy und somit die Strahlenwirkung mehr als verdoppelt hatte. Bei HPV-positiven Tumoren zeigte sich zwar die erwartete Erhöhung der Foci-Zahl bei Dosiserhöhung von 3 auf 6 Gy, überraschenderweise führte aber bei 5 von 6 Tumoren eine ATM-Inhibition vor Bestrahlung sogar zu niedrigeren Foci-Zahlen als eine alleinge Bestrahlung. Nur der HPV-positive Tumor, der

eine ähnlich effiziente DNA-Reparatur zeigte wie die HPV-negativen, zeigte eine erhöhte Anzahl resiudeller Foci nach Inhibierung von ATM (T30, Abb. 12B). Dies spricht dafür, dass defekte DNA-Reparaturmechanismen bei HPV-positiven Tumoren an Defekte der ATM-abhängigen Signalwege geknüpft sind. Ob eine ATM-Inhibition tatsächlich nicht in der Lage ist, HPV-positive HNSCC zu radiosensibilisieren, oder ob vor allem die Markierung der Brüche durch 53BP1 beeinträchtigt ist, kann im *Ex-vivo*-Assay allerdings nicht geklärt werden.

Die Erfassung zugrunde liegender mechanistische Ursachen der defekten DNA-Reparatur HPV-positiver Tumore lag außerhalb der Fragestellung dieser Arbeit. Die beschriebenen Beobachtungen sind aber als ein wertvolles Nebenprodukt dieser Arbeit zu werten, insbesondere wenn man sie im Kontext der bestehenden Literatur und der aktuellen Daten aus dem Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie betrachtet.

DNA-Reparaturdefekte bei HPV-positiven Tumoren in der Literatur.
Zu der Frage, welche Mechanismen für eine defekte DNA-Reparatur HPV-positiver Kopf-Hals-Karzinome ursächlich sein könnten gibt es zurzeit widersprüchliche Daten.
Eine hohe Datenlage liegt vor, bezüglich der Interaktion von DNA-Reparaturwegen und HPV-Onkoproteinen. Schon ab einem frühen Stadium des HPV-Lebenszyklus` d.h. bereits nach Beginn der primären Infektion der Basalzellen des Epithels und lange vor der Entstehung eines Tumors, greifen HPV-Proteine in DNA-Reparaturmechanismen der Wirtszelle ein, um den viralen Lebenszyklus und die virale Replikation vervollständigen zu können (Hong 2017, Spriggs und Laimins 2017). Bristol et al. nehmen an, dass die Aktivität der DNA-Reparatur-Mechanismen für den viralen Lebenszyklus unerlässlich ist, weil die Replikation des 8 kb großen doppelsträngigen HPV-Genoms aberrante DNA-Strukturen schafft, welche für einen funktionierenden viralen Lebenszyklus repariert werden müssen. Hierbei spielt die E6 und E7-abhängige Aktivierung von ATM und ATR eine gesonderte Rolle (Anacker und Moody 2017). Eine HPV-abhängige Aktivierung der DNA-Reparaturproteine findet auch in der Progression von der chronischen Infektion bis zur Tumorentwicklung statt. Die Aktivität von Reparaturproteinen in der Onkogenese von HPV-assoziierten Zervixkarzinomen von low- zu intermediate- bis zur high-grade Läsion nahm graduell zu (Spriggs et al. 2019). Hierzu gehörte auch ATM (Zhao et al. 2019). Bei nicht vorliegenden oder bisher nicht detektierten Vorläuferläsionen von HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen liegen naturgemäß keine entsprechenden Arbeiten für die HPV-induzierte Onkogenese bei Kopf-Hals-Karzinomen vor.
Die beschriebenen Arbeiten zeigen, wie bei HPV-infizierten Zellen DNA-Reparaturprozesse und –proteine der Wirtszelle (wie ATM) in Signalwege der Virusreplikation oder HPV-induzierten Onkogenese verwebt werden. Dies könnte dazu führen, dass DNA-Reparaturproteine für eine funktionierende DNA Reparatur nicht mehr oder nur dysfunktional zur Verfügung stehen. Diese Hypothese sollte in die Überlegungen möglicher Mechanismen der veränderten HPV-assoziierten DNA-Reparatur miteinbezogen werden.

Die aktuell verfügbaren Arbeiten zu DNA-Reparaturmechanismen defekter HPV-positiver Tumoren lassen zeigen bisher kein einheitliches schlüssiges Gesamtbild.

Einige Autoren fanden Hinweise für einen Defekt der Homologen Rekombination und ein Ausweichen auf fehlerhafte Reparatursignalwege, wie zum alternativen end-joining / Microhomology-mediated end-joining (MMEJ) (Leeman et al. 2019, Liu et al. 2018b, Park et al. 2014).

Eine verminderte oder veränderte Expression von DNA-Reparaturproteinen von HPV-positiven gegenüber HPV-negativen Tumoren wird in vielen publizierten Arbeiten dabei als ursächlich für eine defekte DNA-Reparatur HPV-positiver Kopf-Hals-Tumore postuliert. Ihre Aussagekraft wird durch die geringe Zahl der verwendeten Zelllinien geschmälert (Dok et al. 2014, Liu et al. 2018b, Wang et al. 2017). In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Western Blot Analyse der Expression solcher DNA-Reparaturproteine bei einer größeren Gruppe von 6 HPV-positiven und 5 HPV-negativen Zelllinien konnte die in diesen Arbeiten beschriebenen Unterschiede in BRCA1, BRCA2, DNAPKcs, KU80, RNF168, FOXO3, SMG1 nicht und für Zyklin D1 nur in geringem Maße reproduziert werden (unveröffentlichte Daten). Hingegen zeigte sich tatsächlich eine geringere Expression von ATM in den HPV-positiven Zelllinien, die besonders strahlensensibel waren. Eine ATM-Inhibition bewirkte zwar auch in HPV-positiven HNSCC Linien eine Radiosensibilisierung, jedoch in geringerem Ausmaß als in radioresistenteren HPV-negativen HNSCC-Linien. Diese Ergebnisse sind damit im Einklang mit der in dieser Arbeit gezeigten Daten und weisen in der Zusammenschau auf einen Defekt der ATM-vermittelten DNA-Schadensantwort HPV-positiver Oropharynxkarzinome hin. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe fanden aber bisher keine Hinweise auf eine defiziente Phosphorylierung von ATM-Zielproteinen nach Bestrahlung, sodass der exakte Mechanismus des Defektes der DNA Schadensantwort noch weiter untersucht werden muss. In Planung sind hierfür primär offene Versuchen, d.h. Versuche, die nicht auf spezifischen Hypothesen beruhen (Rieckmann 2019).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass in der hier vorgestellten Arbeit weltweit erstmalig der DNA DSB Reparaturdefekt HPV-positiver Oropharynxtumoren anhand primärer Patientenproben demonstriert werden konnte und dass in diesen Tumoren mit großer Wahrscheinlichkeit Aberrationen in der ATM-vermittelten DNA-Schadensantwort vorliegen.

5 Zusammenfassung

Einleitung: HPV-positive Oropharynxkarzinome sind strahlensensibler als HPV-negative. Ursächliche Mechanismen werden kontrovers diskutiert. Theorien sind eine erhöhte Immunogenität und eine erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit als Folge von DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparaturdefekten Letzteres ist bisher jedoch nur anhand einer limitierten Zahl HPV-positiver Kopf-Hals-Tumorzelllinien belegt.

Methoden: Wir untersuchten die DNA-DSB-Reparatur HPV-positiver und HPV-negativer Oropharynxtumore in 400 µm dicken aus Patientenmaterial gewonnenen Tumorgewebeschnitten, die *ex vivo* kultiviert, bestrahlt und nach 24 h fixiert wurden. Bei einem Teil der Tumore wurde zuvor eine Inhibierung der zentralen DNA-Reparaturkinase Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) durchgeführt. Mithilfe einer Immunfluoreszenz-Co-Färbung des Tumormarkers p63 und des Foci-bildenden DNA Doppelstrangbruchmarkers 53BP1 konnten die residuellen Doppelstrangbrüche 24h nach Bestrahlung quantifiziert werden.

Ergebnisse: In den Kernen von HPV-positiven Tumorzellen (n=8) zeigte sich eine mehr als 5-fach erhöhte Zahl residueller Foci verglichen mit denen HPV-negativer Tumoren (n=6) (6,3 Foci/Zelle vs. 1,4; p = 0,019). Die Inhibition von ATM führte bei HPV-negativen Tumoren (n=3) zu einem deutlichen Anstieg residueller Foci um durchschnittlich den Faktor 4, während bei den HPV-positiven (n=6) nur der Tumor mit der effizientesten DNA-Reparatur eine Foci-Zunahme zeigte.

Schlussfolgerung: Die hier vorgestellten Daten weisen erstmals außerhalb von Zelllinien einen klaren Doppelstrangbruch-Reparaturdefekt HPV-positiver Kopf-Hals-Tumoren nach. Hierfür könnte ein Defekt der ATM-abhängigen DNA Schadensantwort verantwortlich sein. Aus klinischer Sicht könnte der hier verwendete *Ex-vivo*-Assay als präklinischer Test zur Vorhersage individueller Strahlensensibilität verwendet werden um beispielsweise HPV-positiven Tumore mit intakter DNA-Reparatur zu detektieren und von Therapie-Deeskalationen auszuschließen.

Schlüsselworte: HNSCC, OPSCC, HPV, Radiosensibilität, DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, Reparaturdefekt, ATM

6 Summary

Background/Significance: HPV-induced oropharyngeal cancer (OPSCC) are more sensitive towards radiation than HPV-negative. Underlying mechanism are discussed controversial. Theories are enhanced cellular radiosensitivity based on a defect in DNA double-strand break (DSB) repair or stronger immunogenicity. Limitation for the first theory is the experimental restriction to a low number of HPV positive and negative HNSCC cell lines.

Methods: We assessed DSB repair of HPV-positive and HPV-negative HNSCC using 400µm thick, patient derived tumor slice cultures, which were irradiated and fixed after 24h, partially after inhibiting central DNA damage response kinase Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM). Residual DSBs were analyzed by quantification of 53BP1 repair foci in enlarged p63-positive nuclei indicative of tumor cell origin.

Results: Analyzed nuclei of HPV+ OPSCC cultures (n=6) displayed on average a more than 5 times higher residual foci number than HPV-OPSCC (n=8) (6,3 vs. 1,4 Foci/ normalized cell nucleus p = 0,019). Inhibition of the central DNA damage response kinase ATM resulted in a profound increase in residual foci number in HPV-negative samples by a factor of 4 on average (n=3). Amongst the HPV-positive samples only the tumor with the most efficient DNA-damage-repair showed a reliable foci growth.

Conclusions: Our ex-vivo data, to the best of our knowledge, represent the first experimental evidence for the DSB repair defect of HPV+ OPSCC outside of established cell lines indicating a defect in the ATM-mediated DNA damage response as a contributing factor. Clinically, the functional *ex vivo* assay may be a powerful tool to predict patient-individual radiosensitivity and to identify cases of HPV positive tumors with a functional DSB repair to be excluded from de-intensification therapy.

Keywords: HNSCC, OPSCC, HPV, Radiosensitivitiy, DSB repair defect, ATM

7 Literaturverzeichnis

Alfaraj F, Craig T, Huang SH, O'sullivan B, Su J, Bayley A, Bratman S, Cho J, Giuliani M, Kim J, Ringash J, Waldron J, Hansen A, De Almeida J, Perez-Ordonez B, Weinreb I, Tong L, Xu W & Hope A (2019) Treatment outcomes in oropharynx cancer patients who did not complete planned curative radiotherapy. *Oral Oncology,* 97**,** 124-130.

Allo G, Yap ML, Cuartero J, Milosevic M, Ferguson S, Mackay H, Kamel-Reid S, Weinreb I, Ghazarian D, Pintilie M & Clarke BA (2019) HPV-independent Vulvar Squamous Cell Carcinoma is Associated With Significantly Worse Prognosis Compared With HPV-associated Tumors. *Int J Gynecol Pathol*.

Anacker DC & Moody CA (2017) Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. *Virus Res,* 231**,** 41-49.

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP & Gillison ML (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med,* 363**,** 24-35.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D & Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *Lancet,* 371**,** 1695-709.

Balermpas P, Rodel F, Rodel C, Krause M, Linge A, Lohaus F, Baumann M, Tinhofer I, Budach V, Gkika E, Stuschke M, Avlar M, Grosu AL, Abdollahi A, Debus J, Bayer C, Stangl S, Belka C, Pigorsch S, Multhoff G, Combs SE, Monnich D, Zips D & Fokas E (2016) CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *Int J Cancer,* 138**,** 171-81.

Baruah P, Lee M, Wilson PO, Odutoye T, Williamson P, Hyde N, Kaski JC & Dumitriu IE (2015) Impact of p16 status on pro- and anti-angiogenesis factors in head and neck cancers. *Br J Cancer,* 113**,** 653-9.

Batey MA, Zhao Y, Kyle S, Richardson C, Slade A, Martin NM, Lau A, Newell DR & Curtin NJ (2013) Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. *Mol Cancer Ther,* 12**,** 959-67.

Bennardo N, Cheng A, Huang N & Stark JM (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet,* 4**,** e1000110.

Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, Van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, Ozsahin EM, Jacobs JR, Jassem J, Ang KK & Lefebvre JL (2005) Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck,* 27**,** 843-50.

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, Van Glabbeke M, European Organization For R & Treatment of Cancer T (2004) Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med,* 350**,** 1945-52.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK & Ang KK (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med,* 354**,** 567-78.

Bonomo P & Livi L (2020) De-intensification for HPV positive oropharyngeal cancer: and yet it moves!: 2019 in review. *Clin Transl Radiat Oncol,* 22**,** 40-43.

Bousquet J & Meunier JM (1962) [Organotypic culture, on natural and artificial media, of fragments of the adult rat hypophysis]. *C R Seances Soc Biol Fil,* 156**,** 65-7.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA & Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin,* 68**,** 394-424.

Cancer Genome Atlas N (2015) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature,* 517**,** 576-82.

Cancer Genome Atlas Research N, Albert Einstein College Of M, Analytical Biological S, Barretos Cancer H, Baylor College Of M, Beckman Research Institute of City Of H, Buck Institute for Research On A, Canada's Michael Smith Genome Sciences C, Harvard Medical S, Helen FGCC, Research Institute at Christiana Care Health S, Hudsonalpha Institute For B, Ilsbio LLC, Indiana University School Of M, Institute of Human V, Institute for Systems B, International Genomics C, Leidos B, Massachusetts General H, Mcdonnell Genome Institute at Washington U, Medical College Of W, Medical University of South C, Memorial Sloan Kettering Cancer C, Montefiore Medical C, Nantomics, National Cancer I, National Hospital AN, National Human Genome Research I, National Institute of Environmental Health S, National Institute On D, Other Communication D, Ontario Tumour Bank LHSC, Ontario Tumour Bank OIFCR, Ontario Tumour Bank TOH, Oregon H, Science U, Samuel Oschin Comprehensive Cancer Institute C-SMC, International SRA, St Joseph's Candler Health S, Eli, Edythe LBIOMIOT, Harvard U, Research Institute at Nationwide Children's H, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins U, University Of B, University of Texas MDaCC, University of Abuja Teaching H, University of Alabama At B, University of California I, University of California Santa C, University of Kansas Medical C, University Of L, University of New Mexico Health Sciences C, University of North Carolina at Chapel H, University of Oklahoma Health Sciences C, University Of P, University of Sao Paulo RaPMS, University of Southern C, University Of W, University of Wisconsin School Of M, Public H, Van Andel Research I & Washington University in St L (2017) Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature,* 543**,** 378-384.

Chatfield-Reed K, Gui S, O'neill WQ, Teknos TN & Pan Q (2020) HPV33+ HNSCC is associated with poor prognosis and has unique genomic and immunologic landscapes. *Oral Oncol,* 100**,** 104488.

Chen AM, Felix C, Wang PC, Hsu S, Basehart V, Garst J, Beron P, Wong D, Rosove MH, Rao S, Melanson H, Kim E, Palmer D, Qi L, Kelly K, Steinberg ML, Kupelian PA & Daly ME (2017) Reduced-dose radiotherapy for human papillomavirus-associated squamous-cell carcinoma of the oropharynx: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol,* 18**,** 803-811.

Chera BS, Amdur RJ, Tepper JE, Tan X, Weiss J, Grilley-Olson JE, Hayes DN, Zanation A, Hackman TG, Patel S, Sheets N, Weissler MC & Mendenhall WM (2018) Mature results of a prospective study of deintensified chemoradiotherapy for low-risk human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer,* 124**,** 2347-2354.

Chun HH & Gatti RA (2004) Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst),* 3**,** 1187-96.

Cobos C, Figueroa JA, Mirandola L, Colombo M, Summers G, Figueroa A, Aulakh A, Konala V, Verma R, Riaz J, Wade R, Saadeh C, Rahman RL, Pandey A, Radhi S, Nguyen DD, Jenkins M, Chiriva-Internati M & Cobos E (2014) The role of

human papilloma virus (HPV) infection in non-anogenital cancer and the promise of immunotherapy: a review. *Int Rev Immunol,* 33**,** 383-401.

Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A & Denny L (2019) Cervical cancer. *Lancet,* 393**,** 169-182.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK & Radiation Therapy Oncology Group I (2004) Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med,* 350**,** 1937-44.

Cramer JD, Hicks KE, Rademaker AW, Patel UA & Samant S (2018) Validation of the eighth edition American Joint Committee on Cancer staging system for human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Head Neck,* 40**,** 457-466.

Davies EJ, Dong M, Gutekunst M, Narhi K, Van Zoggel HJ, Blom S, Nagaraj A, Metsalu T, Oswald E, Erkens-Schulze S, Delgado San Martin JA, Turkki R, Wedge SR, Af Hallstrom TM, Schueler J, Van Weerden WM, Verschuren EW, Barry ST, Van Der Kuip H & Hickman JA (2015) Capturing complex tumour biology in vitro: histological and molecular characterisation of precision cut slices. *Sci Rep,* 5**,** 17187.

Davis AJ & Chen DJ (2013) DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res,* 2**,** 130-143.

De Graeff A, De Leeuw JR, Ros WJ, Hordijk GJ, Blijham GH & Winnubst JA (2000) Pretreatment factors predicting quality of life after treatment for head and neck cancer. *Head Neck,* 22**,** 398-407.

De Hoogt R, Estrada MF, Vidic S, Davies EJ, Osswald A, Barbier M, Santo VE, Gjerde K, Van Zoggel H, Blom S, Dong M, Narhi K, Boghaert E, Brito C, Chong Y, Sommergruber W, Van Der Kuip H, Van Weerden WM, Verschuren EW, Hickman J & Graeser R (2017) Protocols and characterization data for 2D, 3D, and slice-based tumor models from the PREDECT project. *Sci Data,* 4**,** 170170.

Denis F, Garaud P, Bardet E, Alfonsi M, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J & Calais G (2004) Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Clin Oncol,* 22**,** 69-76.

Dixon L, Ramasamy S, Cardale K, Dyker K, Garcez K, Lee LW, Mcpartlin A, Murray P, Sen M, Slevin N, Sykes A, Prestwich R & Thomson D (2018) Long term patient reported swallowing function following chemoradiotherapy for oropharyngeal carcinoma. *Radiother Oncol,* 128**,** 452-458.

Dok R, Kalev P, Van Limbergen EJ, Asbagh LA, Vazquez I, Hauben E, Sablina A & Nuyts S (2014) p16INK4a impairs homologous recombination-mediated DNA repair in human papillomavirus-positive head and neck tumors. *Cancer Res,* 74**,** 1739-51.

Duprez F, Berwouts D, De Neve W, Bonte K, Boterberg T, Deron P, Huvenne W, Rottey S & Mareel M (2017) Distant metastases in head and neck cancer. *Head Neck,* 39**,** 1733-1743.

Eckhardt M, Zhang W, Gross AM, Von Dollen J, Johnson JR, Franks-Skiba KE, Swaney DL, Johnson TL, Jang GM, Shah PS, Brand TM, Archambault J, Kreisberg JF, Grandis JR, Ideker T & Krogan NJ (2018) Multiple Routes to Oncogenesis Are Promoted by the Human Papillomavirus-Host Protein Network. *Cancer Discov,* 8**,** 1474-1489.

Egawa N, Egawa K, Griffin H & Doorbar J (2015) Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses,* 7**,** 3863-90.

Ehns. (2020) *Makesensecampaign*. Online im Internet: www.makesensecampaign.eu [Stand 20.02.2020].

Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A & Gillison ML (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst,* 100**,** 261-9.

Gerlach MM, Merz F, Wichmann G, Kubick C, Wittekind C, Lordick F, Dietz A & Bechmann I (2014) Slice cultures from head and neck squamous cell carcinoma: a novel test system for drug susceptibility and mechanisms of resistance. *Br J Cancer,* 110**,** 479-88.

Gillet JP, Varma S & Gottesman MM (2013) The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst,* 105**,** 452-8.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV & Sidransky D (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst,* 92**,** 709-20.

Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, Jordan RCK, Zhao W, Sturgis EM, Burtness B, Ridge JA, Ringash J, Galvin J, Yao M, Koyfman SA, Blakaj DM, Razaq MA, Colevas AD, Beitler JJ, Jones CU, Dunlap NE, Seaward SA, Spencer S, Galloway TJ, Phan J, Dignam JJ & Le QT (2019) Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet,* 393**,** 40-50.

Goldenberg D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D & Moon CS (2004) Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg,* 131**,** 986-93.

Gronhoj C, Jensen JS, Wagner S, Dehlendorff C, Friborg J, Andersen E, Wittekindt C, Wurdemann N, Sharma SJ, Gattenlohner S, Klussmann JP & Von Buchwald C (2019) Impact on survival of tobacco smoking for cases with oropharyngeal squamous cell carcinoma and known human papillomavirus and p16-status: a multicenter retrospective study. *Oncotarget,* 10**,** 4655-4663.

Haber JE (2018) DNA Repair: The Search for Homology. *Bioessays,* 40**,** e1700229.

Haikerwal SJ, Hagekyriakou J, Macmanus M, Martin OA & Haynes NM (2015) Building immunity to cancer with radiation therapy. *Cancer Lett,* 368**,** 198-208.

Hajek M, Sewell A, Kaech S, Burtness B, Yarbrough WG & Issaeva N (2017) TRAF3/CYLD mutations identify a distinct subset of human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer,* 123**,** 1778-1790.

Hammerman PS, Hayes DN & Grandis JR (2015) Therapeutic insights from genomic studies of head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Discov,* 5**,** 239-44.

Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell,* 100**,** 57-70.

Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell,* 144**,** 646-74.

Harrington KJ, Billingham LJ, Brunner TB, Burnet NG, Chan CS, Hoskin P, Mackay RI, Maughan TS, Macdougall J, Mckenna WG, Nutting CM, Oliver A, Plummer R, Stratford IJ & Illidge T (2011) Guidelines for preclinical and early phase clinical assessment of novel radiosensitisers. *Br J Cancer,* 105**,** 628-39.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E,

Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J & Boffetta P (2007) Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst,* 99**,** 777-89.

Heutte N, Plisson L, Lange M, Prevost V & Babin E (2014) Quality of life tools in head and neck oncology. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis,* 131**,** 33-47.

Hong SY (2017) DNA damage response is hijacked by human papillomaviruses to complete their life cycle. *J Zhejiang Univ Sci B,* 18**,** 215-232.

Horne ZD, Dohopolski MJ, Pradhan D, Bhargava R, Edwards RP, Kelley JL, Comerci JT, Olawaiye AB, Courtney-Brooks MB, Bockmeier MM, Berger JL, Taylor SE, Sukumvanich P & Beriwal S (2018) Human papillomavirus infection mediates response and outcome of vulvar squamous cell carcinomas treated with radiation therapy. *Gynecol Oncol,* 151**,** 96-101.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E & Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin,* 61**,** 69-90.

Jeon S & Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 92**,** 1654-8.

Jiang X, Seo YD, Sullivan KM & Pillarisetty VG (2019) Establishment of Slice Cultures as a Tool to Study the Cancer Immune Microenvironment. *Methods Mol Biol,* 1884**,** 283-295.

Kabarriti R, Brodin NP, Ohri N, Narang R, Huang R, Chuy JW, Rajdev LN, Kalnicki S, Guha C & Garg MK (2019) Human papillomavirus, radiation dose and survival of patients with anal cancer. *Acta Oncol,* 58**,** 1745-1751.

Kajitani N, Satsuka A, Kawate A & Sakai H (2012) Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol,* 3**,** 152.

Kam D, Salib A, Gorgy G, Patel TD, Carniol ET, Eloy JA, Baredes S & Park RC (2015) Incidence of Suicide in Patients With Head and Neck Cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg,* 141**,** 1075-81.

Kelly JR, Husain ZA & Burtness B (2016) Treatment de-intensification strategies for head and neck cancer. *Eur J Cancer,* 68**,** 125-133.

Khan NR, Khan AN, Bashir S, Khan AA, Suleman BA & Chaudhry S (2012) Diagnostic utility of p63 (Ab-1) and (Ab-4) tumor markers in the squamous cell carcinomas of head and neck. *Asian Pac J Cancer Prev,* 13**,** 975-8.

Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H & Miyazaki T (2018) A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med,* 7.

Kocher S, Beyer B, Lange T, Nordquist L, Volquardsen J, Burdak-Rothkamm S, Schlomm T, Petersen C, Rothkamm K & Mansour WY (2019) A functional ex vivo assay to detect PARP1-EJ repair and radiosensitization by PARP-inhibitor in prostate cancer. *International Journal of Cancer,* 144**,** 1685-1696.

Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J & Overgaard J (2009) Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol,* 27**,** 1992-8.

Leeman JE, Li Y, Bell A, Hussain SS, Majumdar R, Rong-Mullins X, Blecua P, Damerla R, Narang H, Ravindran PT, Lee NY, Riaz N, Powell SN & Higginson DS (2019)

Human papillomavirus 16 promotes microhomology-mediated end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 116**,** 21573-21579.

Leemans CR, Snijders PJF & Brakenhoff RH (2018) The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer,* 18**,** 269-282.

Lhuillier C, Rudqvist NP, Elemento O, Formenti SC & Demaria S (2019) Radiation therapy and anti-tumor immunity: exposing immunogenic mutations to the immune system. *Genome Med,* 11**,** 40.

List MA, Rutherford JL, Stracks J, Pauloski BR, Logemann JA, Lundy D, Sullivan P, Goodwin W, Kies M & Vokes EE (2004) Prioritizing treatment outcomes: head and neck cancer patients versus nonpatients. *Head Neck,* 26**,** 163-70.

Liu C, Mann D, Sinha UK & Kokot NC (2018a) The molecular mechanisms of increased radiosensitivity of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC): an extensive review. *J Otolaryngol Head Neck Surg,* 47**,** 59.

Liu Q, Ma L, Jones T, Palomero L, Pujana MA, Martinez-Ruiz H, Ha PK, Murnane J, Cuartas I, Seoane J, Baumann M, Linge A & Barcellos-Hoff MH (2018b) Subjugation of TGFbeta Signaling by Human Papilloma Virus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Shifts DNA Repair from Homologous Recombination to Alternative End Joining. *Clin Cancer Res,* 24**,** 6001-6014.

Loffredo Sampaolo C (1956) [Chick embryo heart in organotypic culture]. *Boll Soc Ital Biol Sper,* 32**,** 1580-2.

Machtay M, Moughan J, Trotti A, Garden AS, Weber RS, Cooper JS, Forastiere A & Ang KK (2008) Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: an RTOG analysis. *J Clin Oncol,* 26**,** 3582-9.

Mak IW, Evaniew N & Ghert M (2014) Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res,* 6**,** 114-8.

Manukian G, Bar-Ad V, Lu B, Argiris A & Johnson JM (2019) Combining Radiation and Immune Checkpoint Blockade in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology,* 9.

Marcu L, Toma- Dasu I, Dasu A & Mercke C (2018) Radiotherapy and Clinical Radiobiology of Head and Neck Cancer *In: Medical Physics and Biomedical Engineering.* J G. Webster, E. Russell Ritenour, S Tabakov, und KW Ng, (Hrg), CRC Press, Boca Raton, Florida, 86-88

Marur S, Li S, Cmelak AJ, Gillison ML, Zhao WJ, Ferris RL, Westra WH, Gilbert J, Bauman JE, Wagner LI, Trevarthen DR, Balkrishna J, Murphy BA, Agrawal N, Colevas AD, Chung CH & Burtness B (2017) E1308: Phase II Trial of Induction Chemotherapy Followed by Reduced-Dose Radiation and Weekly Cetuximab in Patients With HPV-Associated Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx- ECOG-ACRIN Cancer Research Group. *J Clin Oncol,* 35**,**490-497.

Mehanna H, Evans M, Beasley M, Chatterjee S, Dilkes M, Homer J, O'hara J, Robinson M, Shaw R & Sloan P (2016) Oropharyngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol,* 130**,** S90-S96.

Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, Dalby M, Mistry P, Sen M, O'toole L, Al Booz H, Dyker K, Moleron R, Whitaker S, Brennan S, Cook A, Griffin M, Aynsley E, Rolles M, De Winton E, Chan A, Srinivasan D, Nixon I, Grumett J, Leemans CR, Buter J, Henderson J, Harrington K, Mcconkey C, Gray A, Dunn J & De EHPVTG (2019) Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet,* 393**,** 51-60.

Mehnert A, Brahler E, Faller H, Harter M, Keller M, Schulz H, Wegscheider K, Weis J, Boehncke A, Hund B, Reuter K, Richard M, Sehner S, Sommerfeldt S, Szalai C, Wittchen HU & Koch U (2014) Four-week prevalence of mental disorders in patients with cancer across major tumor entities. *J Clin Oncol,* 32**,** 3540-6.

Meijer TG, Naipal KA, Jager A & Van Gent DC (2017) Ex vivo tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA,* 3**,** FSO190.

Menegakis A, De Colle C, Yaromina A, Hennenlotter J, Stenzl A, Scharpf M, Fend F, Noell S, Tatagiba M, Brucker S, Wallwiener D, Boeke S, Ricardi U, Baumann M & Zips D (2015) Residual gammaH2AX foci after ex vivo irradiation of patient samples with known tumour-type specific differences in radio-responsiveness. *Radiother Oncol,* 116**,** 480-5.

Mirghani H, Amen F, Tao Y, Deutsch E & Levy A (2015) Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives. *Cancer Treat Rev,* 41**,** 844-52.

Mirghani H, Leroy C, Chekourry Y, Casiraghi O, Auperin A, Tao Y, Nguyen F, Caroline E, Breuskin I, Plana AM, Hartl D, Janot F, Temam S, Gorphe P & Blanchard P (2018) Smoking impact on HPV driven head and neck cancer's oncological outcomes? *Oral Oncol,* 82**,** 131-137.

Misiukiewicz K, Gupta V, Miles BA, Bakst R, Genden E, Selkridge I, Surgeon JT, Rainey H, Camille N, Roy E, Zhang D, Ye F, Jia R, Moshier E, Bonomi M, Hwang M, Som P & Posner MR (2019) Standard of care vs reduced-dose chemoradiation after induction chemotherapy in HPV+ oropharyngeal carcinoma patients: The Quarterback trial. *Oral Oncol,* 95**,** 170-177.

Misra S, Moro CF, Del Chiaro M, Pouso S, Sebestyen A, Lohr M, Bjornstedt M & Verbeke CS (2019) Ex vivo organotypic culture system of precision-cut slices of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep,* 9**,** 2133.

Mittal S & Banks L (2017) Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res,* 772**,** 23-35.

Mladenov E, Magin S, Soni A & Iliakis G (2013) DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol,* 3**,** 113.

Moll R, Divo M & Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol,* 129**,** 705-33.

Moore PS & Chang Y (2010) Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer,* 10**,** 878-89.

Naipal KA, Verkaik NS, Ameziane N, Van Deurzen CH, Ter Brugge P, Meijers M, Sieuwerts AM, Martens JW, O'connor MJ, Vrieling H, Hoeijmakers JH, Jonkers J, Kanaar R, De Winter JP, Vreeswijk MP, Jager A & Van Gent DC (2014) Functional ex vivo assay to select homologous recombination-deficient breast tumors for PARP inhibitor treatment. *Clin Cancer Res,* 20**,** 4816-26.

O'sullivan B, Huang SH, Perez-Ordonez B, Massey C, Siu LL, Weinreb I, Hope A, Kim J, Bayley AJ, Cummings B, Ringash J, Dawson LA, Cho BC, Chen E, Irish J, Gilbert RW, Hui A, Liu FF, Zhao H, Waldron JN & Xu W (2012) Outcomes of HPV-related oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy alone using altered fractionation. *Radiother Oncol,* 103**,** 49-56.

Oechsle K, Wais MC, Vehling S, Bokemeyer C & Mehnert A (2014) Relationship between symptom burden, distress, and sense of dignity in terminally ill cancer patients. *J Pain Symptom Manage,* 48**,** 313-21.

Olthof NC, Huebbers CU, Kolligs J, Henfling M, Ramaekers FC, Cornet I, Van Lent-Albrechts JA, Stegmann AP, Silling S, Wieland U, Carey TE, Walline HM, Gollin SM, Hoffmann TK, De Winter J, Kremer B, Klussmann JP & Speel EJ (2015) Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *Int J Cancer,* 136**,** E207-18.

Osazuwa-Peters N, Simpson MC, Zhao L, Boakye EA, Olomukoro SI, Deshields T, Loux TM, Varvares MA & Schootman M (2018) Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer,* 124**,** 4072-4079.

Park JW, Nickel KP, Torres AD, Lee D, Lambert PF & Kimple RJ (2014) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein causes a delay in repair of DNA damage. *Radiother Oncol,* 113**,** 337-44.

Petrelli F, Sarti E & Barni S (2014) Predictive value of human papillomavirus in oropharyngeal carcinoma treated with radiotherapy: An updated systematic review and meta-analysis of 30 trials. *Head Neck,* 36**,** 750-9.

Pinatti LM, Walline HM & Carey TE (2018) Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. *J Dent Res,* 97**,** 691-700.

Popp HD, Brendel S, Hofmann WK & Fabarius A (2017) Immunofluorescence Microscopy of gammaH2AX and 53BP1 for Analyzing the Formation and Repair of DNA Double-strand Breaks. *J Vis Exp*.

Rainey MD, Charlton ME, Stanton RV & Kastan MB (2008) Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Res,* 68**,** 7466-74.

Reuschenbach M, Tinhofer I, Wittekindt C, Wagner S & Klussmann JP (2019) A systematic review of the HPV-attributable fraction of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Germany. *Cancer Med,* 8**,** 1908-1918.

Rieckmann T (2019) Molekulares Targeting der DNA-Schadensantwort als Strategie zur effektiven Therapie HPV-positiver Kopf-Halskarzinome. Habilitationsschrift. Universität Hamburg, and Universität Hamburg Medizinische Fakultät. Abrufbar über Katalog der Ärztliche Zentralbibliothek (ÄZB), 31

Rieckmann T & Kriegs M (2019) The failure of cetuximab-based de-intensified regimes for HPV-positive OPSCC: A radiobiologists perspective. *Clin Transl Radiat Oncol,* 17**,** 47-50.

Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch CJ, Petersen C, Dikomey E & Kriegs M (2013) HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol,* 107**,** 242-6.

Rodel F, Martin D, Balermpas P, Wieland U, Winkelmann R, Riekmann T, Falk S, Rodel C & Fokas E (2019) Modulation of radiation sensitivity and antitumor immunity by viral pathogenic factors: Implications for radio-immunotherapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer,* 1871**,** 126-137.

Rothblum-Oviatt C, Wright J, Lefton-Greif MA, Mcgrath-Morrow SA, Crawford TO & Lederman HM (2016) Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis,* 11**,** 159.

Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z & Burdak-Rothkamm S (2015) DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen,* 56**,** 491-504.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD & Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell,* 75**,** 495-505.

Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, De Sanjose S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA & Franceschi S (2016) Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers,* 2**,** 16086.

Senkomago V, Henley SJ, Thomas CC, Mix JM, Markowitz LE & Saraiya M (2019) Human Papillomavirus-Attributable Cancers - United States, 2012-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep,* 68**,** 724-728.

Serup-Hansen E, Linnemann D, Skovrider-Ruminski W, Hogdall E, Geertsen PF & Havsteen H (2014) Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. *J Clin Oncol,* 32**,** 1812-7.

Shiloh Y (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci,* 31**,** 402-10.

Sivakumar R, Chan M, Shin JS, Nishida-Aoki N, Kenerson HL, Elemento O, Beltran H, Yeung R & Gujral TS (2019) Organotypic tumor slice cultures provide a versatile platform for immuno-oncology and drug discovery. *Oncoimmunology,* 8**,** e1670019.

Sorensen BS, Busk M, Horsman MR, Alsner J, Overgaard J, Kyle AH & Minchinton AI (2014) Effect of radiation on cell proliferation and tumor hypoxia in HPV-positive head and neck cancer in vivo models. *Anticancer Res,* 34**,** 6297-304.

Spriggs CC, Blanco LZ, Maniar KP & Laimins LA (2019) Expression of HPV-induced DNA Damage Repair Factors Correlates With CIN Progression. *Int J Gynecol Pathol,* 38**,** 1-10.

Spriggs CC & Laimins LA (2017) Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication. *Viruses,* 9.

Tonella L, Giannoccaro M, Alfieri S, Canevari S & De Cecco L (2017) Gene Expression Signatures for Head and Neck Cancer Patient Stratification: Are Results Ready for Clinical Application? *Curr Treat Options Oncol,* 18**,** 32.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J & Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin,* 65**,** 87-108.

Vaira V, Fedele G, Pyne S, Fasoli E, Zadra G, Bailey D, Snyder E, Faversani A, Coggi G, Flavin R, Bosari S & Loda M (2010) Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 107**,** 8352-6.

Ventz S, Trippa L & Schoenfeld JD (2019) Lessons Learned from Deescalation Trials in Favorable Risk HPV-Associated Squamous Cell Head and Neck Cancer-A Perspective on Future Trial Designs. *Clin Cancer Res,* 25**,** 7281-7286.

Wagner S, Wittekindt C, Reuschenbach M, Hennig B, Thevarajah M, Wurdemann N, Prigge ES, Von Knebel Doeberitz M, Dreyer T, Gattenlohner S & Klussmann JP (2016) CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer,* 138**,** 2263-73.

Wang L, Zhang P, Molkentine DP, Chen C, Molkentine JM, Piao H, Raju U, Zhang J, Valdecanas DR, Tailor RC, Thames HD, Buchholz TA, Chen J, Ma L, Mason KA, Ang KK, Meyn RE & Skinner HD (2017) TRIP12 as a mediator of human papillomavirus/p16-related radiation enhancement effects. *Oncogene,* 36**,** 820-828.

Weichselbaum RR, Liang H, Deng L & Fu YX (2017) Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? *Nat Rev Clin Oncol,* 14**,** 365-379.

Welters MJP, Ma W, Santegoets S, Goedemans R, Ehsan I, Jordanova ES, Van Ham VJ, Van Unen V, Koning F, Van Egmond SI, Charoentong P, Trajanoski Z, Van Der Velden LA & Van Der Burg SH (2018) Intratumoral HPV16-Specific T Cells Constitute a Type I-Oriented Tumor Microenvironment to Improve Survival in HPV16-Driven Oropharyngeal Cancer. *Clin Cancer Res,* 24**,** 634-647.

Willers H, Gheorghiu L, Liu Q, Efstathiou JA, Wirth LJ, Krause M & Von Neubeck C (2015) DNA Damage Response Assessments in Human Tumor Samples Provide Functional Biomarkers of Radiosensitivity. *Semin Radiat Oncol,* 25**,** 237-50.

Windon MJ, D'souza G, Faraji F, Troy T, Koch WM, Gourin CG, Kiess AP, Pitman KT, Eisele DW & Fakhry C (2019) Priorities, concerns, and regret among patients with head and neck cancer. *Cancer,* 125**,** 1281-1289.

Wirth LJ, Burtness B, Nathan C-aO, Grégoire V & Richmon J (2019) Point/Counterpoint: Do We De-escalate Treatment of HPV-Associated Oropharynx Cancer Now? And How? *American Society of Clinical Oncology Educational Book***,** 364-372.

You EL, Henry M & Zeitouni AG (2019) Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: review of current evidence and management. *Curr Oncol,* 26**,** 119-123.

Young RJ, Rischin D, Fisher R, Mcarthur GA, Fox SB, Peters LJ, Corry J, Lim A, Waldeck K & Solomon B (2011) Relationship between epidermal growth factor receptor status, p16(INK4A), and outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,* 20**,** 1230-7.

Zhang M, Kumar B, Piao L, Xie X, Schmitt A, Arradaza N, Cippola M, Old M, Agrawal A, Ozer E, Schuller DE, Teknos TN & Pan Q (2014) Elevated intrinsic cancer stem cell population in human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer,* 120**,** 992-1001.

Zhao J, Guo Z, Wang Q, Si T, Pei S, Qu H, Shang L, Yang Y & Wang L (2019) HPV infection associated DNA damage correlated with cervical precancerous lesions and cancer in the highest area of cervical cancer mortality, Longnan, China. *Cancer Manag Res,* 11**,** 7197-7210.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die an dieser Arbeit beteiligt waren und mich unterstützt haben.

Die *Ex-vivo*-Kultivierung von Kopf-Hals-Tumorfrischgewebe erforderte ein hohes Maß interdisziplinärer Zusammenarbeit zwischen der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie/ Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie und der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Allen Beteiligten bin ich hierfür sehr dankbar.

Ich danke den Leiter meiner Klinik, Prof. Betz, für die großartige Unterstützung dieser und anderer Forschungsvorhaben, für die zeitweise Freistellung von klinischen Aufgaben für die Forschung und die ebenso wichtige Motivation und die wertvollen Ratschläge.

Ich danke allen meinen ärztlichen Kollegen aus der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und dem gesamten OP-Pflege-Team für die funktionierenden Abläufe bei der Tumorprobenentnahme. Den Oberärzten Dr. Möckelmann und PD Dr. Chia-Jung Busch danke ich außerdem für ihren klinischen Rat und den Austausch bzgl. Verbesserungen der Entnahmetechniken. Dass die HNO-Klinik dieses Projekt getragen hat und selbst bei komplexen und langwierigen Tumoroperationen an unsere Probensammlung gedacht wurde, war maßgeblich für den Erfolg dieser Arbeit.

Ein großer Dank für die Möglichkeit der Dissertation gebührt der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter Leitung von Prof. Dr. Cordula Petersen und ebenso dem Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie unter Leitung von Prof. Dr. Kai Rothkamm.

Ihm, meinem Betreuer PD Dr. Thorsten Rieckmann und meinem Doktorvater PD Dr. Malte Kriegs bin ich sehr dankbar für die herzliche Aufnahme sowohl in die Arbeitsgruppe III als auch in die wissenschaftliche Welt der Radioonkologie. Ich danke für die Geduld und die interessanten und mehr als lehrreichen Gespräche. Für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens in einem freundschaftlichen offenen Miteinander danke ich auch den anderen Mitarbeitern des Labors der unterschiedlichen Arbeitsgruppen. Den Wissenschaftlern PD Dr. Wael Mansour, und Dr. Sabrina Köcher und Dr. Joanna Berger danke ich für den Austausch bzgl. des *Ex-vivo*-Projektes und die diesbezüglichen wissenschaftlichen Diskussionen. Ich danke Lena Nordquist, Fruzsina Gatzemeier, Sabrina Christiansen für ihre Hilfe beim Erlernen und Verbessern der Methodik, Thomas Andreas für das Anlernen am Kryotom und Konstantin Hoffer für die Unterstützung bei der gemeinsamen Instandhaltung der Biobank.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich Frau Prof. Wollenberg und Dr. rer nat Ralph Pries aus der „AG Kopf-Hals-Tumorbiologie“ des UKSH Lübeck. Trotz negativer experimenteller Ergebnisse und Promotionsvorhaben habe ich viele positive Erfahrungen und Wissen bzgl. der tumorbiologischen Grundlagenforschung aus dieser Zeit mitnehmen können.

Zuletzt danke ich meiner Familie und Freunden. Meinen Freunden danke ich für die große Toleranz, wenn private Termine wegen Versuchen an Tumorfrischmaterial verschoben werden mussten und ihren wichtigen Rückhalt. Ich danke meinen Eltern, deren Zuspruch ich mir immer – ob mit oder ohne Doktortitel – gewiss sein kann. Ihnen und meinen Geschwistern Matze, Clara und Hannes danke ich dafür, dass sie mir ein nicht ortsgebundenes Zuhause bieten, gerade in stressigen Zeiten.

9 Lebenslauf

Lebenslauf aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

10 Eidesstattliche Erklärung

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.