

**Therapeutische Inhibition der  
DNA-Schadensantwort in  
Kopf-Hals-Tumoren  
zur Verbesserung der  
strahlentherapeutischen Behandlung**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Physik  
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**Agnes Oetting**

**Hamburg**

**2022**

Gutachter der Dissertation:	Prof. Dr. Florian Grüner Prof. Dr. Kai Rothkamm
Zusammensetzung der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Florian Grüner Prof. Dr. Gudrid Moortgat-Pick Prof. Dr. Arwen Pearson PD Dr. Thorsten Rieckmann Prof. Dr. Kai Rothkamm
Vorsitzende der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Arwen Pearson
Datum der Disputation:	06.09.2022
Vorsitzender Fach-Promotionsausschuss PHYSIK:	Prof. Dr. Wolfgang J. Parak
Leiter des Fachbereichs PHYSIK:	Prof. Dr. Günter H. W. Sigl
Dekan der Fakultät MIN:	Prof. Dr. Heinrich Graener

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Mai 2019 und Juni 2022 im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe und unter Anleitung von PD Dr. Thorsten Rieckmann sowie unter Betreuung von Prof. Dr. Kai Rothkamm und Prof. Dr. Florian Grüner durchgeführt.



# Zusammenfassung

Der Einsatz ionisierender Strahlung ist wesentlicher Bestandteil der kurativen Therapie solider Tumore. Die letale Wirkung auf Tumorzellen basiert insbesondere auf der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Dabei ist die Schonung des umliegenden Normalgewebes eine der größten Herausforderungen der Strahlentherapie und häufig kommt es zu starken, teilweise irreversiblen Nebenwirkungen. Oft wird die Bestrahlung zudem noch mit einer Chemotherapie kombiniert, was die Toxizität der Behandlung weiter erhöht. Daher ist die Suche nach alternativen zielgerichteten Therapien das Thema aktueller Forschung in der Radioonkologie.

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereiches (*Head and neck squamous cell carcinomas*, HNSCC) sind eine genetisch komplexe, heterogene Gruppe bösartiger Erkrankungen und weltweit die siebthäufigste Krebsart. Neben jahrelangem starken Tabak- und Alkoholkonsum ist die Infektion mit Hochrisikostämmen des Humanen Papillomvirus (HPV) ein weiterer wichtiger onkogener Faktor. Die Strahlentherapie ist auch bei der Behandlung von HNSCC ein zentrales Element der multimodalen Therapie. Aufgrund der im Kopf-Hals-Bereich vorhandenen Risikoorgane wie z. B. der Speicheldrüsen und Schluckmuskulatur, stellt die Bestrahlungsplanung jedoch eine besondere Herausforderung dar und Patient:innen mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich leiden häufig lebenslang unter den irreversiblen Nebenwirkungen der Bestrahlung. Bezüglich des Ansprechens auf die Strahlentherapie haben sich HPV-positive Tumore als besonders empfindlich erwiesen und diese Patient:innen besitzen eine dementsprechend gute Prognose. Die Mechanismen hinter der erhöhten Strahlenempfindlichkeit sind noch nicht vollständig geklärt, allerdings wurde für HPV-positive Tumore bereits auf zellulärer Ebene eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit, basierend auf einem Defekt in der Doppelstrangbruchreparatur, nachgewiesen. Während das wichtigste Ziel für Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC eine sichere Deintensivierung der Behandlung ist, besteht das Ziel für Patient:innen mit HPV-negativen Tumoren in einer Verbesserung des Überlebens. Vorarbeiten aus dem Labor für Strahlenbiologie zeigen zudem, dass sowohl die Inhibition der DNA-Reparatur als auch die Inhibition des G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Kontrollpunktes HNSCC-Zelllinien radiosensibilisieren kann. Die Inhibition des Enzyms PARP durch Olaparib führt zu zusätzlichen Schäden in der S- und G<sub>2</sub>-Phase; die Inhibition der Kinase Wee1 durch Adavosertib zur Hemmung der Zellzyklus-Kontrollpunkte, was zu einem vorzeitigen Eintritt in die Mitose trotz bestehender Doppelstrangbrüche, sowie zur Induktion von massivem Replikationsstress führt. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Dissertation die kombinierte Inhibition von PARP und Wee1 an drei strahlenempfindlichen HPV-positiven (UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154) und drei radioresistenten HPV-negativen (HSC4, SAS, UT-SCC-60A) Zelllinien untersucht, um die strahlentherapeutische Behandlung von Patient:innen mit HNSCC zu verbessern. Die Inhibition von Wee1 führte in den HPV-positiven Zellen zu einer effektiven Aufhebung des G<sub>2</sub>-Arrestes, in den HPV-negativen Linien war der Arrest sowie seine Inhibition nur schwach ausgeprägt. Die alleinige Inhibition von PARP sowie die Zugabe von Olaparib zu Adavosertib hatten wenig Einfluss auf den G<sub>2</sub>-Arrest. In den HPV-negativen Zellen wurde bei letzterem die Reduktion des Arrestes sogar vermindert. Eine Analyse des Replikationsstressmarkers  $\gamma$ H2AX in der

Durchflusszytometrie zeigte sowohl in HPV-positiven als auch in HPV-negativen Zelllinien einen starken Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in S- und G<sub>2</sub>-Phase-Zellen nach der Inhibition von Wee1 und PARP/Wee1. Bereits eine Einzelgabe der Inhibitoren radiosensibilisierte HPV-positive und HPV-negative Zelllinien im *delayed-plating* Koloniebildungstest, die wirksamste Radiosensibilisierung war allerdings bei dualer Inhibition erkennbar. Die Auszählung residueller strahleninduzierter 53BP1 Reparaturfoci, als Marker für Doppelstrangbrüche in der Immunfluoreszenz, konnte zeigen, dass die Inhibition von PARP/Wee1 in den HPV-negativen Zellen zu einer erhöhten Focizahl führte, wohingegen die Anzahl der Reparaturfoci in den HPV-positiven Zellen nicht anstieg. Allerdings zeigte sich hier eine Abnahme der Foci in der G<sub>2</sub>-Phase und eine Zunahme der Focizahl in der G<sub>1</sub>-Phase. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen trotz nicht-reparierter Doppelstrangbrüche die Mitose durchschreiten, was mit einem besonderen Risiko letaler Chromosomenaberrationen und des mitotischen Zelltodes verbunden ist. Von besonderer Bedeutung für das Zellüberleben ist, dass sich in allen verwendeten HNSCC-Zelllinien die Anzahl der nur gering geschädigten Zellen, welche die größte Überlebenswahrscheinlichkeit besitzen, nach dualer Inhibition verringerte.

Im Rahmen dieser Dissertation wird dargestellt, dass die duale Inhibition von PARP und Wee1 ein hochwirksamer Ansatz zur Radiosensibilisierung von HNSCC-Zelllinien ist. Zwar zeigten sich im Detail Unterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC-Zelllinien, dennoch sollte dieser Ansatz bezüglich seines therapeutischen Nutzens weitergehend untersucht werden. Eine Radiosensibilisierung von HNSCC könnte die Effektivität der Strahlentherapie bei gleichzeitiger Reduktion der strahleninduzierten Nebenwirkungen ermöglichen.

# Summary

The use of ionizing radiation is an essential component of curative therapy for solid tumors. The lethal effect on tumor cells is based on the induction of DNA double-strand breaks. One of the greatest challenges of radiation therapy is the protection of the surrounding normal tissue, which frequently leads to severe, sometimes irreversible side effects. Moreover, radiation is often combined with chemotherapy, which further increases the toxicity of the treatment. Therefore, the search for alternative targeted therapies is the topic of current research in radiation oncology.

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are a genetically complex, heterogeneous group of malignancies and the seventh most common cancer worldwide. In addition to years of heavy tobacco and alcohol use, infection with high risk strains of the human papillomavirus (HPV) is another important oncogenic driver. Radiation therapy is also a key element of multimodality therapy in the treatment of HNSCC. However, due to the presence of organs at risk in the head and neck region, such as e.g. salivary glands and swallowing muscles, radiation treatment planning is particularly challenging and patients with tumors in the head and neck region often suffer lifelong irreversible side effects from radiation. In terms of response to radiotherapy, HPV-positive tumors have been shown to be particularly sensitive and these patients have a correspondingly good prognosis. The mechanisms behind the increased radiosensitivity are not yet fully understood. However, increased radiosensitivity has already been demonstrated for HPV-positive tumors on cellular level, based on a defect in double-strand break repair. While the most important goal for patients with HPV-positive HNSCC is to safely deintensify treatment, the goal for patients with HPV-negative tumors is to improve survival. Preliminary work from the Laboratory for Radiobiology also shows that both inhibition of DNA repair and inhibition of the G<sub>2</sub>-cell-cycle-checkpoint can radiosensitize HNSCC cell lines. Inhibition of the enzyme PARP by Olaparib leads to additional damage in S- and G<sub>2</sub>-phase; inhibition of the kinase Wee1 by Adavosertib to inhibition of cell-cycle-checkpoints, resulting in premature entry into mitosis despite existing double-strand breaks, as well as induction of massive replication stress. In this context, this thesis investigated the combined inhibition of PARP and Wee1 in three radiosensitive HPV-positive (UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154) and three radioresistant HPV-negative (HSC4, SAS, UT-SCC-60A) cell lines to improve the radiotherapeutic treatment of patients with HNSCC. Inhibition of Wee1 effectively abrogated the G<sub>2</sub>-arrest in HPV-positive cells while the arrest as well as its inhibition was weak in HPV-negative lines. Inhibition of PARP alone as well as the addition of Olaparib to Adavosertib had little effect on G<sub>2</sub>-arrest. In the HPV-negative cells, the reduction in arrest was actually diminished in the latter. Flow cytometry analysis of the replication stress marker  $\gamma$ H2AX showed a strong increase in  $\gamma$ H2AX signal intensity in S- and G<sub>2</sub>-phase cells after inhibition of Wee1 and PARP/Wee1 in both HPV-positive and HPV-negative cell lines. Even single doses of the inhibitors radiosensitized HPV-positive and HPV-negative cell lines in the *delayed-plating* colony formation assay, but the most effective radiosensitization was evident with dual inhibition. Enumeration of residual radiation-induced 53BP1 repair foci, as markers of double-strand breaks in immunofluorescence, demonstrated that inhibition of PARP/Wee1

in HPV-negative cells resulted in an increased foci number, whereas the number of repair foci did not increase in HPV-positive cells. However, these showed a decrease in foci number in G<sub>2</sub>-phase cells and an increase in G<sub>1</sub>-phase cells. This indicates that cells undergo mitosis despite unrepaired double-strand breaks, which is associated with a particular risk of lethal chromosomal aberrations and mitotic cell death. Of particular importance for cell survival is the number of only slightly damaged cells, which have the highest probability of survival. This number decreased in all HNSCC cell lines used after dual inhibition.

This thesis presents that the dual inhibition of PARP and Wee1 is a highly effective approach for radiosensitization of HNSCC cell lines. Although differences between HPV-positive and HPV-negative cell lines were shown in detail, this approach should be further investigated regarding its therapeutic benefit. Radiosensitization of HNSCC could improve the effectiveness of radiotherapy while reducing radiation-induced side effects.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>Summary</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1 Physikalische Wechselwirkungen ionisierender Strahlung . . . . .	13
1.1.1 Direkt ionisierende Strahlung . . . . .	13
1.1.2 Indirekt ionisierende Strahlung . . . . .	15
1.2 Energieübertrag ionisierender Strahlung auf Materie . . . . .	18
1.2.1 Der Begriff der Dosis . . . . .	18
1.2.2 Dosis-Wirkungs-Beziehungen . . . . .	20
1.2.3 Mathematische Beschreibung von Überlebenskurven . . . . .	20
1.2.4 Fraktionierung der Bestrahlung . . . . .	22
1.3 Biologische Wechselwirkungen ionisierender Strahlung . . . . .	23
1.3.1 Zellbiologische Grundlagen . . . . .	23
1.3.2 Biologische Strahlenwirkung . . . . .	24
1.4 Die zelluläre Schadensantwort . . . . .	26
1.4.1 Grundlagen der DNA-Reparatur . . . . .	27
1.4.2 DNA-Reparaturwege . . . . .	28
1.4.3 Replikationsstress . . . . .	31
1.4.4 PARP, Wee1 und Chk1 in der zellulären Schadensantwort . . . . .	32
1.5 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereiches (HNSCC) . . . . .	34
1.5.1 Ursachen und Risikofaktoren . . . . .	34
1.5.2 Standardtherapie . . . . .	34
1.5.3 Ansprechen auf die Therapie . . . . .	35
1.5.4 Zielgerichtete Therapie und Deintensivierung . . . . .	36
1.5.5 Radiosensibilisierung in HNSCC - Duale Inhibition von PARP/Wee1 . . . . .	38
1.6 Ziel der Arbeit . . . . .	39
<b>2 Material</b>	<b>41</b>
2.1 Strahlungsquelle und Zubehör . . . . .	41
2.2 Zellkultur . . . . .	41
2.2.1 Zelllinien . . . . .	41
2.2.2 Tumormaterial . . . . .	42
2.2.3 Medien in der Zellkultur . . . . .	43
2.3 Antikörper . . . . .	44
2.3.1 Primäre Antikörper . . . . .	44
2.3.2 Sekundäre Antikörper . . . . .	45
2.4 Chemikalien, Reagenzien und Puffer . . . . .	45
2.4.1 Chemikalien und Reagenzien . . . . .	45
2.4.2 Puffer und Lösungen . . . . .	46
2.5 Verbrauchsmaterialien . . . . .	47

2.6	Geräte . . . . .	48
2.7	Software . . . . .	48
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>49</b>
3.1	Bestrahlung mit Röntgenstrahlung . . . . .	49
3.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	50
3.2.1	Zellkultur . . . . .	50
3.2.2	Proliferation . . . . .	51
3.2.3	Koloniebildungstest . . . . .	51
3.3	Kultivierung der <i>ex vivo</i> Gewebeschnitte . . . . .	52
3.4	Durchflusszytometrie . . . . .	53
3.4.1	Zellzyklusanalyse . . . . .	54
3.4.2	Quantifizierung fluoreszierender Marker: $\gamma$ H2AX und p-H3 . . . . .	54
3.4.3	Analyse der Messdaten aus der Durchflusszytometrie in der FlowLogic Software . . . . .	55
3.5	Immunfluoreszenz - Analyse residueller Doppelstrangbrüche . . . . .	55
3.5.1	Immunfluoreszenz in Zellkultur . . . . .	56
3.5.2	Immunfluoreszenz in <i>ex vivo</i> Gewebeschnitten . . . . .	56
3.5.3	Bildaufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbung am Mikroskop . . . . .	56
3.6	Quantifizierung residueller DNA-Reparaturfoci . . . . .	57
3.7	Auswertung und Statistik . . . . .	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
4.1	Radiosensibilisierung HPV-positiver Zelllinien . . . . .	61
4.1.1	Proliferation nach dualer Inhibition . . . . .	61
4.1.2	Fraktion mitotischer Zellen nach dualer Inhibition . . . . .	62
4.1.3	Untersuchung des Zellzyklus . . . . .	63
4.1.4	Replikationsstress: Messung der $\gamma$ H2AX-Signalintensität . . . . .	65
4.1.5	Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest . . . . .	66
4.1.6	Residuelle Doppelstrangbrüche in der Immunfluoreszenz . . . . .	67
4.1.7	Reduktion des Replikationsstress nach Nukleosid-Zugabe . . . . .	73
4.2	Radiosensibilisierung HPV-negativer Zelllinien . . . . .	77
4.2.1	Proliferation nach dualer Inhibition . . . . .	77
4.2.2	Fraktion mitotischer Zellen nach dualer Inhibition . . . . .	78
4.2.3	Untersuchung des Zellzyklus . . . . .	79
4.2.4	Replikationsstress: Messung der $\gamma$ H2AX-Signalintensität . . . . .	79
4.2.5	Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest . . . . .	80
4.2.6	Residuelle Doppelstrangbrüche in der Immunfluoreszenz . . . . .	81
4.2.7	Reduktion des Replikationsstress nach Nukleosid-Zugabe . . . . .	83
4.3	Vergleich der Ergebnisse von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien . . . . .	85
4.4	Validierung der Daten aus der Zellkultur in <i>ex vivo</i> Gewebeschnitten . . . . .	86
4.5	Vergleich der manuellen und der automatisierten Auszählung in ImageJ . . . . .	88
4.5.1	Automatisierte Auszählung der Zellkerne . . . . .	89
4.5.2	Automatisierte Auszählung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci . . . . .	92

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
5.1	Radiosensibilisierung von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien . . . . .	96
5.2	Validierung der Daten aus der Zellkultur in <i>ex vivo</i> Gewebeschnitten . . . . .	101
5.3	Vergleich der manuellen und der automatisierten Auszählung in ImageJ . . . . .	102
5.4	Ausblick . . . . .	104
5.5	Schlussfolgerung . . . . .	105
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>A</b>	<b>Anlagen</b>	<b>126</b>
A.1	Bestrahlung . . . . .	126
A.1.1	Spektrum der Röntgenröhre . . . . .	126
A.1.2	Dosisverlauf und Dosisverteilung im Strahlungsfeld . . . . .	127
A.2	Verarbeitung der <i>ex vivo</i> Gewebeschnitte . . . . .	127
A.3	Fluoreszenzspektren . . . . .	128
A.3.1	Beispielspektren in der Durchflusszytometrie . . . . .	128
A.3.2	Beispielspektren in der Immunfluoreszenz . . . . .	128
A.4	Übersicht über die ausgesäten Zellzahlen . . . . .	129
A.5	Zellzahlen im <i>delayed-plating</i> Koloniebildungstest . . . . .	130
A.6	Zusätzliches Material der HPV-positiven Zelllinien . . . . .	131
A.6.1	Replikationsstress nach PARP-Inhibition und Bestrahlung . . . . .	131
A.6.2	Replikationsstress nach dualer Inhibition . . . . .	132
A.6.3	Radiosensibilisierung im <i>delayed-plating</i> Koloniebildungstest . . . . .	133
A.6.4	Residuelle 53BP1 Reparaturfoci nach Inhibitorbehandlung . . . . .	135
A.6.5	Reduktion des Replikationsstress nach Nukleosid-Zugabe . . . . .	138
A.7	Zusätzliches Material der HPV-negativen Zelllinien . . . . .	140
A.7.1	Replikationsstress nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung . . . . .	140
A.7.2	Radiosensibilisierung im <i>delayed-plating</i> Koloniebildungstest . . . . .	140
A.7.3	Reduktion des Replikationsstress nach Nukleosid-Zugabe . . . . .	141
A.8	Zusätzliches Material zur automatisierten Auszählung in ImageJ . . . . .	142
A.8.1	Artefakte in der automatisierten Auszählung . . . . .	142
A.8.2	Tabellen zu den Bland-Altman-Diagramme . . . . .	143
A.8.3	Bland-Altman-Diagramme . . . . .	144
A.8.4	Verschiedene <i>Thresholds</i> für die Funktion <i>Analyze Particles</i> . . . . .	145
A.8.5	Protokoll . . . . .	146
	<b>Danksagung</b>	<b>150</b>



# 1 Einleitung

Patient:innen mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich leiden häufig unter den irreversiblen Nebenwirkungen der Strahlentherapie. Aufgrund der in diesem Bereich vorhandenen Risikoorgane stellt die Bestrahlungsplanung eine besondere Herausforderung dar. Um die Nebenwirkungen der Strahlentherapie zu reduzieren, werden neben einer weiteren Optimierung der Bestrahlungspläne auch strahlenbiologische Methoden zur Deintensivierung der Therapie untersucht. Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Radiosensibilisierung verschiedener Kopf-Hals-Tumorzelllinien mittels medikamentöser Inhibition der DNA-Schadensantwort. Um die Ergebnisse möglichst verständlich darstellen zu können, werden in dieser Einleitung die physikalischen und biologischen Grundlagen erläutert. Begonnen wird mit einer Beschreibung der physikalischen Wechselwirkungen ionisierender Strahlung (Abschnitt 1.1), anschließend folgt eine Einführung in den Energieübertrag ionisierender Strahlung auf Materie (Abschnitt 1.2), bevor auf die biologischen Wechselwirkungen ionisierender Strahlung eingegangen wird (Abschnitt 1.3). In Abschnitt 1.4 werden die Grundlagen der zellulären Schadensantwort und die wichtigsten Reparaturwege in menschlichen Zellen beschreiben. Den Abschluss der Einleitung bilden eine Einführung in die Ursachen und Risikofaktoren von Kopf-Hals-Tumoren sowie deren Behandlungsmöglichkeiten und aktuelle Ansätze zur Deintensivierung der Therapie (Abschnitt 1.5).

## 1.1 Physikalische Wechselwirkungen ionisierender Strahlung

Der Einsatz ionisierender Strahlung ist ein elementarer Bestandteil der Therapie von soliden Tumoren. Das Ziel der Strahlentherapie ist dabei die Schädigung der Tumorzellen bei bestmöglicher Schonung des umliegenden Normalgewebes. Generell wird bei der Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Materie zwischen direkt und indirekt ionisierender Strahlung unterschieden. In diesem Abschnitt soll auf beide Strahlungsarten und ihre Wechselwirkungen mit Materie eingegangen werden. Auch wenn es sich bei der in der klinischen Strahlentherapie eingesetzten Photonenstrahlung um indirekt ionisierende Strahlung handelt, kommt es hierbei zur Entstehung von direkt ionisierenden Sekundärelektronen [1]. Auch bei Protonen oder Schwerionen handelt es sich um direkt ionisierende Strahlung. Diese werden in einigen Kliniken auch in der Strahlentherapie eingesetzt, jedoch ist diese Art der Therapie mit hohem Aufwand und Kosten verbunden.

Um dem Leser ein grundlegendes Verständnis für die Vorgänge zu vermitteln, die den Erfolg der Strahlentherapie ermöglichen, wird mit den physikalischen Grundlagen ionisierender Strahlung begonnen.

### 1.1.1 Direkt ionisierende Strahlung

Bei der direkt ionisierenden Strahlung handelt es sich um geladene Teilchen, die auf direktem Weg mit der Materie wechselwirken und diese ionisieren. Dies können Elektronen, Protonen oder Mehrnukleonen-Systeme wie z. B.  $\alpha$ -Teilchen sein. Die Wechselwirkung der geladenen

## 1 Einleitung

Teilchen mit der Materie beruht auf der Coulomb-Wechselwirkung ( $F_C$ ):

$$F_C = \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot \varepsilon_0} \cdot \frac{z \cdot Z \cdot e^2}{r^2} \quad (1.1)$$

wobei  $z$  und  $Z$  die Ladungszahlen der Stoßpartner sind und  $r$  den Abstand zwischen den Ladungen beschreibt [1, 2]. Die Wechselwirkungen geladener Teilchen mit Materie finden vorwiegend im elektrischen Feld der Hüllenelektronen statt. Bei ausreichender Energie der Teilchen kann es aber auch zu Wechselwirkungen im Coulomb-Feld der Kerne kommen [1]. Bei ihrem Weg durch die Materie interagieren die Partikel in vielfältiger Weise, wobei es zu Richtungsänderungen und zur Energieübertragung auf das Medium oder auf Photonen kommt [3]. Der Energieverlust von geladenen Teilchen in Materie wird über das Bremsvermögen charakterisiert. Dieses beschreibt den Energieverlust ( $dE$ ) geladener Teilchen pro Wegstrecke ( $dx$ ) und wird in der Regel in MeV/cm angegeben. Das totale Bremsvermögen (*stopping power*,  $S_{\text{tot}}$ ) setzt sich additiv aus dem Stoßbremsvermögen (*collision stopping power*,  $S_{\text{col}}$ ) und dem Strahlungsbremsvermögen (*radiation stopping power*,  $S_{\text{rad}}$ ) zusammen [1].

$$S_{\text{tot}} = -\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{tot}} = S_{\text{col}} + S_{\text{rad}} \quad (1.2)$$

Das Stoßbremsvermögen ( $S_{\text{col}}$ ) beschreibt die Wechselwirkung mit den Hüllenelektronen, während das Strahlungsbremsvermögen ( $S_{\text{rad}}$ ) die Wechselwirkung mit dem Feld des Atomkerns beschreibt. Die Definition von Stoß- und Strahlungsbremsvermögen erfolgt jeweils analog zum totalen Bremsvermögen:

$$S_{\text{col}} = -\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{col}} \quad S_{\text{rad}} = -\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{rad}}$$

Häufig wird in der Literatur auch das Massenstoßbremsvermögen ( $S_{\text{tot}}/\rho$ ) angegeben. Indem das Bremsvermögen durch die Dichte  $\rho$  des Absorbers geteilt wird, fließen bereits die Materialeigenschaften der Materie in diesen Wert ein [3]. Über die Definition des Bremsvermögens ist es möglich, die Reichweite der Teilchen im Absorber zu berechnen. Da der Energieverlust der Teilchen in der Regel über eine Vielzahl von Wechselwirkungen erfolgt, wird die Berechnung der Reichweite über das Bremsvermögen als *continuous slowing down approximation* ( $R_{\text{CSDA}}$ ) bezeichnet [1]. Diese Reichweite ist abhängig von der Energie sowie von Masse und Ladung der Teilchen und wird berechnet, indem über das reziproke Bremsvermögen von der initialen kinetischen Energie des geladenen Teilchens ( $E_{k0}$ ) bis zum Endpunkt 0 integriert wird [3, 4]:

$$R_{\text{CSDA}} = \int_{E_{k0}}^0 \frac{dE}{S_{\text{tot}}} \quad (1.3)$$

Die  $R_{\text{CSDA}}$  ist nicht mit der Eindringtiefe zu verwechseln, sondern beschreibt die mittlere, im Medium zurückgelegte Wegstrecke. Besonders bei leichten Teilchen kann es deutliche Abweichungen zwischen der Eindringtiefe und  $R_{\text{CSDA}}$  geben, da die Teilchen im Medium keine gerade Strecke zurücklegen, sondern sich auf einer „Zick-Zack“-förmigen Bahn bewegen. Schwere Teilchen hingegen werden weniger stark abgelenkt, sodass es möglich ist, ihre

Eindringtiefe mittels  $R_{\text{CSDA}}$  zu approximieren [3]. Direkt ionisierende Strahlung deponiert einen Großteil ihrer Energie am Ende der Wegstrecke. Dieses Absorptionsmaximum wird als Bragg-Peak bezeichnet und ermöglicht es in der Strahlentherapie, einen Großteil der Dosis im Tumor zu platzieren und das umgebende Normalgewebe zu schonen. Dieser Vorteil wird z. B. bei der Bestrahlung mit Protonen oder Schwerionen genutzt [1].

### 1.1.2 Indirekt ionisierende Strahlung

Bei indirekt ionisierender Strahlung wird zwischen Photonen- und Neutronenstrahlung unterschieden [1]. Die Photonenstrahlung, die in der Medizin standardmäßig in Therapie und Diagnostik eingesetzt wird, ist auch Hauptbestandteil dieser Arbeit, weshalb sich die nachfolgenden Erläuterungen ebenfalls nur auf diese beziehen. Der Wechselwirkungsprozess indirekt ionisierender Strahlung in Materie findet in zwei Stufen statt [1]:

- (1) Über die Prozesse klassische Streuung, Photoeffekt, Comptoneffekt, Paarbildung und Kernphotoeffekt kommt es zur Entstehung geladener Sekundärteilchen. Die Wahrscheinlichkeit für diese Prozesse ist abhängig von der Energie der Photonenstrahlung ( $E_\gamma$ ) und der Ordnungszahl des Absorbers ( $Z$ ).
- (2) Es folgt eine direkte Wechselwirkung der im ersten Schritt entstandenen geladenen Sekundärteilchen mit der Materie.

Bei der Einstrahlung von indirekt ionisierender Photonenstrahlung kommt es aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Photonen und Materie zur Schwächung der Photonenstrahlung. Die Absorption von Strahlung in Materie kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes beschrieben werden:

$$I_x = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot x} \quad (1.4)$$

Dabei ist  $x$  die Materialdicke in cm und  $I_0$  die Intensität der einfallenden Strahlung. Der Schwächungskoeffizient  $\mu$  setzt sich aus den Wechselwirkungskoeffizienten der fünf Wechselwirkungseffekte zusammen: Photoeffekt ( $\tau$ ), Compton-Streuung ( $\sigma_c$ ), Paarbildung ( $\kappa$ ), kohärente Streuung ( $\sigma_k$ ) und Kernphotoeffekt ( $\chi$ ) [1, 2].

$$\mu = \tau + \sigma_c + \kappa + \sigma_k + \chi \quad (1.5)$$

Im Weiteren soll nur auf die wichtigsten Effekte für Photonenstrahlung mit Energien von 10 keV bis 50 MeV, wie sie in der Klinik eingesetzt wird, eingegangen werden. Es handelt sich dabei um den Photoeffekt ( $\tau$ ), die Compton-Streuung ( $\sigma_c$ ) und die Paarbildung ( $\kappa$ ). Die Wahrscheinlichkeiten für diese Wechselwirkungsarten sind in Abbildung 1 in Abhängigkeit von der Photonenenergie und der Ordnungszahl  $Z$  dargestellt.

#### Photoeffekt

Der Wechselwirkungsprozess des Photoeffekts tritt bei Energien von 1 keV bis 150 keV auf, das Photon gibt dabei seine gesamte Energie an ein Hüllenelektron ab und wird absorbiert [4].

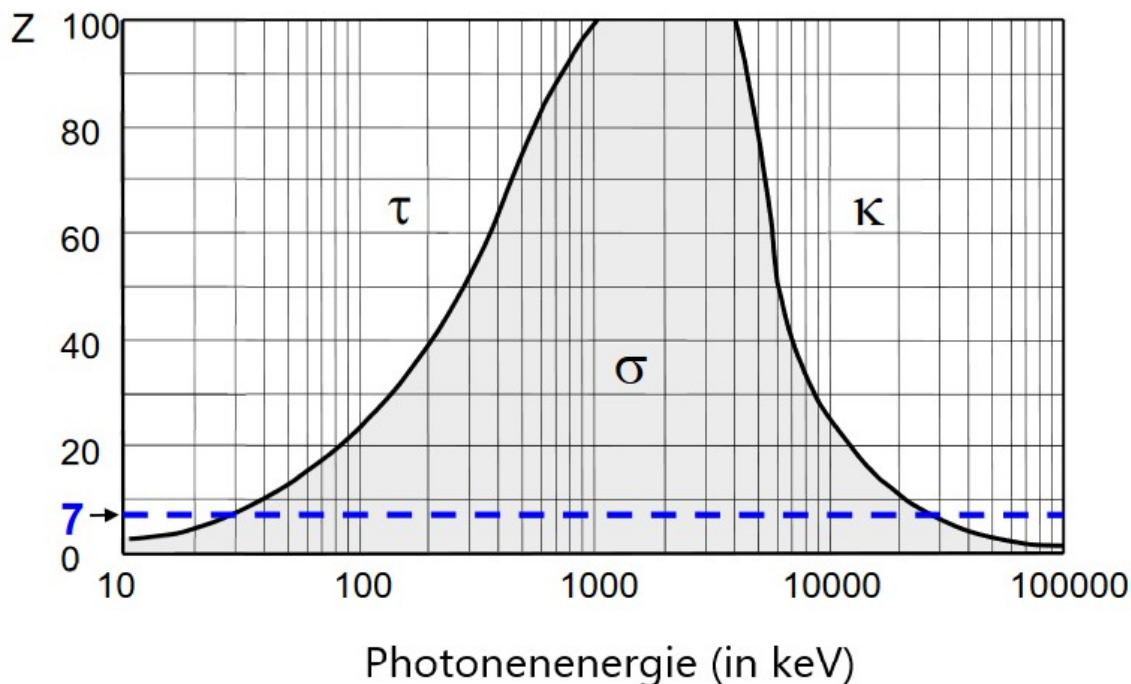


Abb. 1: **Wahrscheinlichkeiten der Wechselwirkungseffekte von Photonenstrahlung in Materie.** Dargestellt sind die Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der Photonenenergie und der Ordnungszahl ( $Z$ ). Die mittlere effektive Ordnungszahl für Weichteilgewebe liegt bei 7 und ist in der Abbildung als blau gestrichelte Linie eingezeichnet. Bei geringen Energien dominiert der Photoeffekt ( $\tau$ ), während die Compton-Streuung ( $\sigma_c$ ) über den gesamten Energiebereich von Bedeutung ist. Die Paarbildung ( $\kappa$ ) dominiert erst bei sehr hohen Photonenenergien und hohen Ordnungszahlen. Die Abbildung ist modifiziert nach [1].

Damit dies möglich ist, muss die Energie des Photons größer sein als die Bindungsenergie ( $E_B$ ) des Hüllenelektrons:  $h \cdot \nu \geq E_B$ . Dabei ist  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $\nu$  die Frequenz des Photons. Das aus der Hülle herausgelöste Elektron verlässt das Atom anschließend mit der kinetischen Energie  $E_{kin} = h \cdot \nu - E_B$ . Bei Emission des Elektrons entsteht ein Elektronenloch in der Elektronenhülle, welches direkt von einem Elektron aus den äußeren Schalen aufgefüllt wird. Die Frequenz der dabei emittierten Photonenstrahlung ist charakteristisch für die Energiedifferenz der beteiligten Elektronenzustände [2]. Der Photoeffekt ( $\tau$ ) weist eine Abhängigkeit von der Dichte ( $\rho$ ), der Ordnungszahl der Materie ( $Z$ ) und der Photonenenergie ( $E_\gamma$ ) auf [1]:

$$\tau \sim \rho \cdot \frac{Z^{n-1}}{E_\gamma^3} \quad (E_\gamma \gg 511 \text{ keV}) \quad (1.6)$$

$$\tau \sim \rho \cdot \frac{Z^{n-1}}{E_\gamma} \quad (E_\gamma \gg 511 \text{ keV}) \quad (1.7)$$

Hierbei hat  $n$  für leichte Elemente einen Wert von ungefähr 4.5, während sich der Wert



für schwere Elemente etwa 4 annähert [1]. Aufgrund der geringen effektiven Ordnungszahl biologischen Gewebes ( $Z \approx 7$ ), dominiert der Photoeffekt nur bei geringen Photonenenergien von etwa 10 keV bis 26 keV, wie sie z. B. in der Röntgendiagnostik vorkommen [4]. Bei Energien, die deutlich über der Ruheenergie von Elektronen ( $E_\gamma \gg 511 \text{ keV}$ ) liegen, nimmt die Wahrscheinlichkeit des Photoeffekts mit steigender Energie langsamer ab (vgl. Verlauf in Abbildung 1). Die Winkelverteilung der emittierten Photonen ist energieabhängig, sodass die Photonen bei höheren Energien fast ausschließlich in Vorwärtsrichtung emittiert werden.

### Comptoneffekt

Der Comptoneffekt tritt bei allen Photonenenergien auf und beschreibt die inelastische Streuung eines Photons an einem schwach gebundenen Elektron. Er stellt insbesondere im Energiebereich von 26 keV bis 25 MeV und bei niedrigen Ordnungszahlen die dominierende Wechselwirkung dar und spielt somit in der Strahlentherapie eine wichtige Rolle [4].

Die Beschreibung des Comptoneffekts erfolgt im Teilchenbild. Ein Photon mit der Energie  $E_{\gamma 0}$  und dem Impuls  $\vec{p}_{\gamma 0}$  trifft auf ein schwach gebundenes und sich in Ruhe befindendes Hüllenelektron. Bei diesem Stoß überträgt das Photon einen Teil seiner Energie und seines Impulses auf das Elektron und wird gestreut [1]. Das Elektron verlässt die Elektronenhülle mit der Energie  $E_{\text{kin}}$  und dem Impuls  $\vec{p}_e$ . Das Atom wird ionisiert und das Photon fliegt nun mit verändertem Impuls  $\vec{p}_{\gamma'}$  und verringerter Energie  $E_{\gamma'}$  weiter. Dabei gilt:  $E_{\gamma'} = E_\gamma - E_{\text{kin}}$ . Der Compton-Wechselwirkungskoeffizient  $\sigma_c$  setzt sich aus dem Compton-Streukoeffizienten ( $\sigma_{\text{streu}}$ ), für die inkohärente Photonenstreuung, und dem Compton-Transferkoeffizienten ( $\sigma_{\text{tr}}$ ), der die auf das Elektron übertragene Energie beschreibt, zusammen.

$$\sigma_c = \sigma_{\text{streu}} + \sigma_{\text{tr}} \quad (1.8)$$

$$\sigma_c \sim \rho \cdot \frac{1}{E_\gamma^n} \quad (1.9)$$

Der Comptoneffekt weist eine lineare Abhängigkeit von der Dichte  $\rho$  des Absorbermaterials auf, ist jedoch kaum von der Ordnungszahl  $Z$  abhängig [1, 3]. Die Abhängigkeit von der Energie der einfallenden Photonenstrahlung  $E_\gamma$  lässt sich nicht einheitlich beschreiben, der Wert für  $n$  liegt bei ungefähr 0.5 bis 1 und kann aus Tabellen entnommen werden [1].

### Paarbildung

Der Effekt der Paarbildung tritt erst bei Photonenenergien von mehr als 1.022 MeV auf. Dies entspricht mehr als der doppelten Ruheenergie eines Elektrons:  $E_\gamma > 2 \cdot m_e \cdot c^2$ . Dabei ist  $m_e$  die Ruhemasse des Elektrons und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit. Bei der Paarbildung wird das Photon in Kernnähe absorbiert und es entsteht ein Elektron-Positron-Paar mit einer Ruheenergie von jeweils 511 keV [5]. Die Differenz von Photonenenergie und doppelter Ruhemasse ( $E_\gamma - 2 \cdot m_e \cdot c^2$ ) steht Elektron und Positron als kinetische Energie zur Verfügung. Für den Wechselwirkungskoeffizienten der Paarbildung ( $\kappa$ ) gilt [1]:

$$\kappa \approx \rho \cdot Z \cdot \log(E_\gamma) \quad (1.10)$$

Die Wahrscheinlichkeit der Paarbildung steigt linear mit der Ordnungszahl  $Z$  und dem Logarithmus der Photonenenergie  $E_\gamma$  an.

## 1.2 Energieübertrag ionisierender Strahlung auf Materie

Die bisherigen Beschreibungen der Wechselwirkungen ionisierender Strahlung mit Materie erlauben keine Abschätzung der auf das Material übertragenen Energie. Eine Möglichkeit, die Veränderung des bestrahlten Materials durch den Energieübertrag zu bestimmen, ist es, die Ionisation zu messen. Die Ionisation ( $I$ ) beschreibt die pro Wegstrecke ( $dx$ ) erzeugten Ionenpaare ( $dQ$ ). Häufig wird in diesem Zusammenhang auch die Ionisationsdichte ( $Q^*$ ) verwendet, bei der die Ionenpaare pro Volumenelement ( $dV$ ) betrachtet werden [1].

$$I = \frac{dQ}{dx} \qquad Q^* = \frac{dQ}{dV} \qquad (1.11)$$

Indem die Ionisationsdichte der Strahlung über die Energieabgabe ( $dE$ ) pro Wegstrecke ( $dx$ ) beschrieben wird, folgt daraus die Definition des linearen Energietransfers (*linear energy transfer*, LET). Dieser beschreibt die mittlere Energieabgabe pro Wegstrecke:

$$LET = \left( \frac{dE}{dx} \right)_\Delta \qquad (1.12)$$

Im Unterschied zum Stoßbremsvermögen werden bei der Definition des LET nur Teilchen mit einer Energie kleiner  $\Delta$  berücksichtigt, da nur diese Teilchen ihre Energie in der Umgebung der Teilchenspur abgeben. Der LET beschreibt somit nur die lokale Energieabgabe und Energieabsorption. Aus diesem Grund ist der LET in der Regel geringer als das Stoßbremsvermögen ( $S_{\text{tot}}$ ), nähert sich aber für  $\Delta \rightarrow \infty$  diesem an [1]. In der Literatur wird für den LET häufig mit der Einheit keV/ $\mu\text{m}$  gearbeitet.

Bei der linearen Energieübertragung durch die Sekundärteilchen auf den Absorber ist besonders in biologischem Gewebe die räumliche Verteilung der Energieabgabe von Bedeutung. Mehrere Einzelstrangbrüche (SSB) innerhalb eines bestimmten Volumens führen zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen (DSB), welche für die Zelle schwieriger zu reparieren sind. Das Muster der DNA-Schädigung ist zudem auch von der Strahlungsart abhängig. Bei Elektronen und Photonen handelt es sich um locker ionisierende Strahlung mit einem niedrigen LET, wohingegen  $\alpha$ -Teilchen und Schwerionen einen hohen LET aufweisen [3]. Weitere Informationen zu Strahlenschäden sowie deren Reparatur finden sich in Abschnitt 1.4.

### 1.2.1 Der Begriff der Dosis

Die Dosis wird genutzt, um die im Gewebe absorbierte Energie zu quantifizieren [6]. Dabei unterscheiden sich die im Strahlenschutz und der Literatur verwendeten Dosisgrößen je nach Anwendungsgebiet. Da eine detaillierte Beschreibung der in der Dosimetrie verwendeten Messgrößen den Rahmen dieser Arbeit überschreitet, soll in diesem Abschnitt nur kurz auf jene Dosisgrößen eingegangen werden, die im Rahmen der Strahlentherapie und zum Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendig sind.

Die zuvor beschriebenen Messgrößen, wie die Ionisationsdichte und der LET, beschreiben ausschließlich physikalische Wechselwirkungen. Dabei werden die Materialeigenschaften der bestrahlten Materie nicht mit einbezogen, welche für die Dosisbestimmung jedoch von Bedeutung sind. Die grundlegende Definition der (Energie-)Dosis erfolgt über mittlere Energie ( $d\bar{E}$ ), die auf die Masse ( $dm$ ) übertragen wird [7]:

$$D = \frac{d\bar{E}}{dm} \qquad (1.13)$$

Bei der Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit Materie spielen stochastische Prozesse eine wichtige Rolle. Um messbare Größen zu erhalten, wird in der Dosimetrie in der Regel mit Mittelwerten gerechnet. So wird für die Dosisbestimmung beispielsweise nicht die Energie  $E$ , sondern die mittlere Energie  $\bar{E}$  genutzt [8]. Die SI-Einheit der Dosis ist J/kg, jedoch wird häufig mit der Sondereinheit Gy gearbeitet [7, 8].

Ein weiterer wichtiger Begriff im Feld der Dosismessgrößen ist die KERMA. Es handelt sich dabei um ein Kunstwort aus der Beschreibung *K*inetic *E*nergy *R*eleased *p*er *u*nit *M*ass. Die KERMA beschreibt die von indirekt ionisierender Strahlung im ersten Wechselwirkungsschritt auf Sekundärteilchen in Materie übertragene Energie  $E_{\text{trans}}$ .

$$KERMA = \frac{d\bar{E}_{\text{trans}}}{dm} = \frac{1}{\rho} \frac{d\bar{E}_{\text{kin}}}{dV} \quad (1.14)$$

Analog zur Dosis wird für die KERMA die Einheit Gy verwendet [1, 7]. Allerdings ermöglicht die KERMA keine Dosisbestimmung, da die Energie der Sekundärteilchen auch außerhalb des betrachteten Volumens deponiert werden kann.

Die räumliche Verteilung der Energieabgabe ionisierender Strahlung hat Einfluss darauf, ob die Zellen in der Lage sind alle Schädigungen fehlerfrei zu reparieren. Um die Strahlenwirkung in biologischem Gewebe abschätzen zu können, ist es daher notwendig, die relative biologische Wirksamkeit (RBW) in die Dosisberechnung einzubeziehen. Diese ist abhängig von LET, Dosis und dem zeitlichen Muster der Bestrahlung und wird experimentell bestimmt [1, 7]. Die Beschreibung der RBW erfolgt über den dimensionslosen Strahlungs-Wichtungsfaktor ( $w_R$ ). Für Röntgenstrahlung mit 250 keV beträgt  $w_R = 1$ . Die Hinzunahme des Strahlungs-Wichtungsfaktor  $w_R$  ermöglicht es, aus der Dosis  $D$ , die Äquivalentdosis  $H$  zu berechnen. Die Äquivalentdosis beschreibt somit die Dosis unter Berücksichtigung der biologischen Wirkung:

$$H = \sum_R w_R \cdot D_{T,R} \quad (1.15)$$

Wie auch die Dosis  $D$ , hat die Äquivalentdosis  $H$  die Einheit J/kg. Um sie von der (Energie-)Dosis und der KERMA zu unterscheiden, wird die Einheit Sievert (Sv) verwendet [1]. Da nicht nur die Eigenschaften der ionisierenden Strahlung, sondern auch die Eigenschaften des bestrahlten Gewebes Einfluss auf die Dosis haben, wird die effektive Dosis  $E$  als zusätzliche Dosismessgröße definiert. Zur Bestimmung der effektiven Dosis  $E$  ist ein weiterer dimensionsloser Wichtungsfaktor ( $w_T$ ) notwendig, der die Eigenschaften des bestrahlten Gewebes berücksichtigt und als organabhängiger Wichtungsfaktor bezeichnet wird. Die effektive Dosis  $E$  berechnet sich über die Aufsummierung der Äquivalentdosis  $H$  aller bestrahlten Gewebe und Organe [7, 8]:

$$E = \sum_T w_T \cdot \sum_R w_R \cdot D_{T,R} = \sum_T w_T \cdot H_T \quad (1.16)$$

Wie auch die Äquivalentdosis wird die effektive Dosis in Sv angegeben. Sie ermöglicht die Berechnung der Dosis unter Einbeziehung der der Gewebeeigenschaften und der Expositionssituation.

### 1.2.2 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Dosis-Effekt- bzw. Dosis-Wirkungskurven werden genutzt, um die biologische Strahlenwirkung in Abhängigkeit von der Dosis zu beschreiben. Sie finden daher im Strahlenschutz ihren Einsatz, um Strahlenschäden abzuschätzen und bestmöglich zu vermeiden. Im Strahlenschutz wird zwischen deterministischen und stochastischen Strahlenschäden unterschieden, welche jeweils einen anderen Verlauf in der Dosis-Wirkungskurve zeigen. Bei den deterministischen Strahlenschäden handelt es sich um Gewebeschädigungen, wie beispielsweise Hautrötungen oder Verbrennungen. Diese Schädigungen weisen eine Dosisabhängigkeit auf und lassen sich über eine Dosis-Effekt-Kurve mit sigmoidalen Verlauf beschreiben. Dies bedeutet, dass es eine Schwellendosis und einen Sättigungsbereich gibt. Die Schwellendosis ist von den Eigenschaften des Gewebes und den Expositionsbedingungen abhängig. Es ist davon auszugehen, dass bei geringen Dosen, die kleiner als die Schwellendosis sind, keine deterministischen Strahlenschäden zu erwarten sind [1]. Für stochastische Strahlenschäden existiert keine Dosischwelle. Mit steigender Dosis nimmt zwar die Wahrscheinlichkeit für Schäden (z. B. Mutationen, Krebs) zu, allerdings ist die Schwere der Schäden nicht von der Dosis abhängig [7]. Bei sehr hohen Dosen kommt es wieder zu einem Abfall der Kurve, da hier die deterministischen Effekte überwiegen [1]. Die Unterteilung in stochastische und deterministische Strahlenschäden ist auf Zellebene wenig zielführend. Dosis-Wirkungskurven werden hingegen auch auf Zellebene eingesetzt, um die Auswirkungen ionisierender Strahlung zu beurteilen. In der experimentellen Strahlenbiologie und insbesondere in der vorliegenden Arbeit, sind Überlebenskurven von besonderer Bedeutung. Dabei wird das Zellüberleben logarithmisch in Abhängigkeit von der Strahlendosis aufgetragen [1, 9]. Der genaue Verlauf der Überlebenskurven ist von intrinsischen Faktoren des bestrahlten Gewebes abhängig, aber auch Strahlungsart und Fraktionierung spielen eine Rolle.

### 1.2.3 Mathematische Beschreibung von Überlebenskurven

Um das Zellüberleben nach Bestrahlung mathematisch zu beschreiben, findet häufig das linear-quadratische Modell (*linear quadratic model*, LQM) Anwendung. Das LQM beschreibt das Zellüberleben bzw. die Überlebensrate (*surviving fraction*, SF) nach Bestrahlung mit der Dosis  $D$  [1, 10, 11]:

$$SF = \exp -(\alpha D + \beta D^2) \quad (1.17)$$

Beim LQM handelt es sich um ein stark vereinfachtes Modell, jedoch ermöglicht die Reduktion auf die lineare Komponente  $\alpha$  und die quadratische Komponente  $\beta$  eine breite Anwendung in der strahlenbiologischen Forschung. Das LQM basiert auf der Poisson-Statistik, die genutzt wird, wenn eine große Anzahl zufälliger Ereignisse auf eine große Anzahl von Objekten (z. B. Zellen) treffen. Das Zellüberleben kann dann über die Anzahl nicht tödlicher Ereignisse abgeschätzt werden.

$$P(0) = \exp - \langle N \rangle \quad (1.18)$$

Jede einzelne Zelle ist demnach einer Anzahl tödlicher Interaktionen  $\langle N \rangle$  ausgesetzt. Beim linearen Anteil  $\alpha$  des LQM (Gleichung 1.17) handelt es sich um *single-hit-kills*, die erste

Interaktion ist also bereits tödlich. Diese Schädigungen treten unabhängig von der Fraktionierung und der Dosisrate auf und können von der Zelle nicht oder nur fehlerhaft repariert werden. Für den linearen Anteil  $\alpha$  gilt demnach:

$$\frac{d \langle N \rangle}{dD} = -\alpha \quad \langle N \rangle = -\alpha D + N_0 \quad (1.19)$$

Dabei ist  $N_0$  die Anzahl toter Zellen zum Zeitpunkt Null. Der quadratische Anteil  $\beta$  beschreibt die potenziell zu reparierenden Schäden, die abhängig von Fraktionierung und Dosisrate sind. Dies sind die *two-hit-kills*, bei denen nicht jedes Ereignis zum Zelltod führt. Für den quadratischen Anteil  $\beta$  in Gleichung 1.17, bei dem zwei Ereignisse für den Zelltod notwendig sind, gilt dementsprechend:

$$\frac{d \langle N \rangle}{dD} = -\beta D \quad \langle N \rangle = -\beta D^2 + N_0 \quad (1.20)$$

Unter der Annahme  $N_0 = \text{Null}$  ergibt sich aus Gleichung 1.19 und Gleichung 1.20:

$$\langle N \rangle = -\alpha D - \beta D^2 \quad (1.21)$$

Unter Berücksichtigung der Poisson-Statistik (Formel 1.18) folgt daraus die Formel 1.17 des LQM, welche die Berechnung des Zellüberlebens nach Bestrahlung ermöglicht [10–12]. In Abbildung 2 A ist die Überlebensrate (*surviving fraction, SF*) für verschiedene Werte von  $\alpha$  und  $\beta$  dargestellt. Unter der Bedingung  $\alpha > \beta$  zeigt sich eine fast lineare Abnahme der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Dosis. Fast jede Schädigung, die durch die ionisierende Strahlung verursacht wird, führt zum Zelltod. Unter der Bedingung  $\beta > \alpha$ , bildet sich in der Überlebenskurve eine Schulter aus.

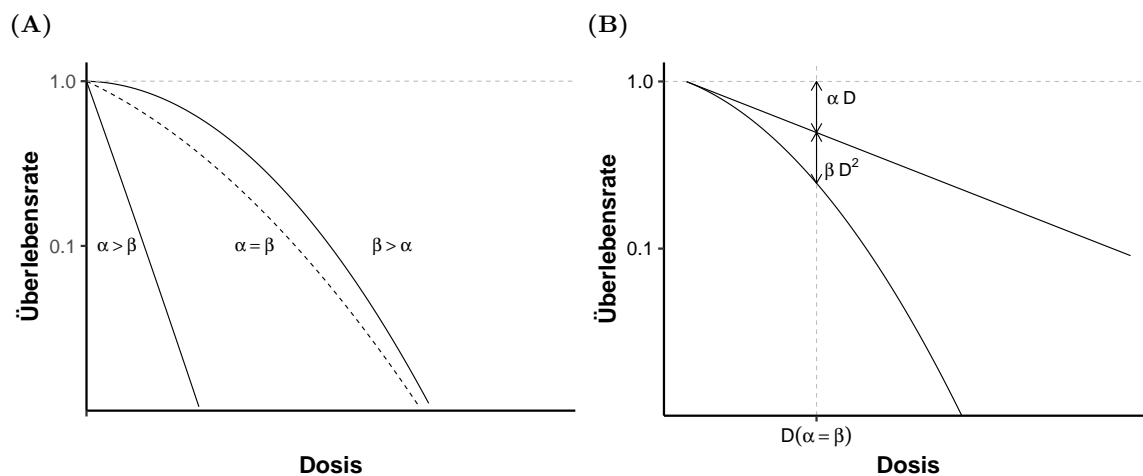


Abb. 2: **Das linear-quadratische Modell (LQM)**. Dargestellt ist die Überlebensrate  $SF$  in Abhängigkeit von der Strahlendosis  $D$  für verschiedene Werte von  $\alpha$  und  $\beta$  im LQM. **(A)**: Gezeigt ist der Kurvenverlauf für verschiedene Werte von  $\alpha$  und  $\beta$ . Unter der Bedingung  $\alpha > \beta$ , zeigt sich im LQM ein fast linearer Kurvenverlauf. Bei einer Zunahme des quadratischen Anteils  $\beta$  wird eine Schulter in der Überlebenskurve sichtbar. **(B)**: Darstellung des Dosispunktes für den gilt  $D(\alpha = \beta)$ . Bei dieser Dosis haben der lineare und der quadratische Anteil des linear-quadratischen Modells den gleichen Einfluss auf die Überlebensrate. Die Abbildungen sind angelehnt an [1].

## 1 Einleitung

Diese entsteht durch subletale Schäden; bei diesen handelt es sich um Schäden, welche von der Zelle potenziell repariert werden können. Der Dosiswert  $D(\alpha = \beta)$ , bei dem der Einfluss der linearen und der quadratischen Komponente auf das Zellüberleben gleich groß sind, wird über das Verhältnis  $\alpha/\beta$  beschrieben (s. Abbildung 2 B). Dieser Wert ist ein Maß für die Reparatureigenschaften des bestrahlten Gewebes. Früh reagierende Gewebe, wie z. B. die Haut oder die Lunge, haben einen  $\alpha/\beta$ -Wert von 6 Gy bis 30 Gy, hier überwiegt die lineare Komponente. Spät reagierendes Gewebe hat einen  $\alpha/\beta$ -Wert von 1 Gy bis 6 Gy, der Einfluss der quadratischen Komponente überwiegt und das Gewebe weist eine hohe Reparaturfähigkeit auf [9]. In den Überlebenskurven ist für dieses Gewebe eine ausgeprägte Schulter zu erkennen. Auch zwischen den verschiedenen Tumor-Entitäten gibt es starke Schwankungen des  $\alpha/\beta$ -Wertes. Nasopharynxkarzinome z. B. haben einen  $\alpha/\beta$ -Wert von 16 Gy, während maligne Melanome einen Wert von 0.6 Gy aufweisen. Diese Differenzen können zum Teil auch das unterschiedliche Ansprechen der Tumore auf die Strahlentherapie erklären. Das LQM ist zwar eine stark vereinfachte Beschreibung des Zellüberlebens, zur Abschätzung der Strahlenwirkung jedoch häufig ausreichend. Besonders im Bereich von hoch-LET-Strahlung und bei sehr niedrigen oder sehr hohen Dosen zeigen sich allerdings die Schwächen des LQM. Daher gibt es in der Literatur eine Vielzahl weiterer Modelle, die in einigen Situationen bessere Ergebnisse liefern können [11].

### 1.2.4 Fraktionierung der Bestrahlung

In der klinischen Strahlentherapie ist es üblich, die Gesamtdosis nicht in einer einzelnen Sitzung zu geben, sondern auf mehrere Einzeldosen aufzuteilen. Dieses Vorgehen wird als fraktionierte Bestrahlung bezeichnet und hat den Vorteil, dass die verbesserte Reparaturkapazität des Normalgewebes ausgenutzt werden kann. Durch diesen Effekt wird der Einsatz der Strahlentherapie erst möglich, da Tumorzellen zerstört werden, während das Normalgewebe in den Bestrahlungspausen regenerieren kann. In den Überlebenskurven des Normalgewebes ist bei der fraktionierten Bestrahlung nach jeder Dosisgabe eine Schulter zu erkennen [9]. Zusätzlich kommt es zwischen den Bestrahlungen zu einer Reoxygenierung der hypoxischen Tumorbereiche, was zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit während der nächsten Bestrahlung führt. Das LQM kann erweitert werden, um Veränderungen in den Überlebenskurven nach fraktionierter Bestrahlung zu beschreiben.

$$\begin{aligned} SF &= \exp[-n(\alpha d + \beta d^2)] \\ SF &= \exp[-D(\alpha + \beta d)] \end{aligned} \tag{1.22}$$

Dabei ist  $d$  die Dosis je Fraktion und  $n$  die Anzahl der Fraktionen und es gilt:  $D = n \cdot d$  [10]. Es ist zu beachten, dass zeitliche Faktoren (z. B. Bestrahlungsdauer, Abstände zwischen den Bestrahlungen) in Formel 1.22 nicht berücksichtigt werden, diese aber ebenfalls Einfluss auf das Zellüberleben haben.

In der Klinik erfolgt die Bestrahlung in der Regel an 5 Tagen die Woche mit jeweils 1.8 Gy bis 2.2 Gy über einen Zeitraum von 4–7 Wochen, was als konventionelle Fraktionierung bezeichnet wird. Somit ergibt sich in der fraktionierten Bestrahlung eine Gesamtdosis, die in der Regel höher ist als die maximal mögliche Dosis einer Einzelbestrahlung [9]. Zusätzlich zur konventionellen Fraktionierung finden in der Strahlentherapie auch die hyper- und

hypofraktionierte Bestrahlung sowie die akzelerierte Bestrahlung Anwendung. Bei der hyperfraktionierten Bestrahlung wird pro Fraktion mit einer geringeren Dosis bestrahlt, dafür mehrmals täglich. Diese Art der Bestrahlung ermöglicht eine höhere Gesamtdosis bei einer Reduktion der Spätnebenwirkungen. Allerdings stellt die Tatsache, dass die Bestrahlung mehrmals täglich stattfindet, die Patient:innen und die Klinik vor Herausforderungen. Bei der hypofraktionierten Bestrahlung werden weniger Einzeldosen mit höher Dosis eingesetzt. Diese Methode findet z. B. bei Kindern oder in der Palliativmedizin Verwendung [9].

### 1.3 Biologische Wechselwirkungen ionisierender Strahlung

In den vorherigen Abschnitten wurde bereits auf die Wechselwirkungen ionisierender Strahlung mit Materie eingegangen und das Zellüberleben in Abhängigkeit von der Dosis beschrieben. Allerdings erfolgte die Betrachtung der Wirkung ionisierender Strahlung bisher vorrangig aus einem physikalischen Blickwinkel. Da in dieser Arbeit der Einfluss ionisierender Strahlung auf biologische Prozesse von besonderer Bedeutung ist, soll in diesem Abschnitt eine Einführung in die Strahlenwirkung auf lebende Zellen gegeben werden. Die biologischen Zusammenhänge, die auch Einfluss auf das Zellüberleben nach dem LQM haben, sollen nun detaillierter erläutert werden. Begonnen wird mit den Grundlagen der Zellbiologie, soweit sie für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Anschließend folgt eine Einführung in die biologische Strahlenwirkung und deren Einflussfaktoren.

#### 1.3.1 Zellbiologische Grundlagen

Die Zelle gilt als kleinste Einheit des Lebens, die zu Stoffwechsel, Reproduktion und Mutabilität fähig ist. Menschliche Zellen haben eine Größe von etwa  $1\ \mu\text{m}$  bis  $50\ \mu\text{m}$  und stehen als offene Systeme im ständigen Austausch mit der Umgebung [13]. Der Zellkern ist vom Zytoplasma umgeben, in dem sich die Zellorganellen befinden und das über eine Membran von der Umgebung abgegrenzt ist [13, 14]. Im Zellkern befindet sich die genetische Information in Form der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA). Die DNA ist ein Makromolekül und setzt sich aus einer Vielzahl von Nukleotiden zusammen. Nukleotide bestehen aus einer Base, einem Zucker und einer Phosphatgruppe. Die DNA liegt als doppelsträngiges Molekül mit Doppelhelix-Struktur vor, in welcher alle Erbinformationen der Zellen gespeichert sind. Ziel der Strahlentherapie ist es, die DNA der Tumorzellen zu schädigen und die Zelle so an der weiteren Replikation zu hindern oder den Zelltod herbeizuführen [4, 13].

#### Zellzyklus

Zur Vermehrung müssen die Zellen ihre Erbinformation, die in Form der DNA vorliegt, verdoppeln. Dies geschieht während des Zellzyklus, den jede Zelle durchläuft und der grob in die Interphase ( $G_1$ -, S- und  $G_2$ -Phase) und in die Mitose unterteilt werden kann. In der  $G_1$ -Phase wächst die Zelle nach der Teilung; zudem werden die Enzyme gebildet, die für die S-Phase (Synthese-Phase), in der die Replikation stattfindet, notwendig sind. Darauf folgt die  $G_2$ -Phase, in der sich die Zelle auf die in der Mitose stattfindende Zellteilung vorbereitet [15,

16]. Die Regulation des Zellzyklus erfolgt über ein fein abgestimmtes Kontrollsystem aus internen und externen Faktoren. Dabei nehmen besonders die Zyklin-abhängigen Kinasen (*cycline-dependent-kinases*, CDKs) eine relevante Rolle ein. Kinasen übertragen Phosphatgruppen auf Proteine, was als Phosphorylierung bezeichnet wird. Sie sind so in der Lage, die biologische Aktivität von Proteinen zu regulieren [4]. Zusammen mit den Zyklinen bilden die CDKs Komplexe, über die der Eintritt in die verschiedenen Zellzyklusphasen reguliert wird. Im Laufe des Zellzyklus ist dabei ein oszillierender Verlauf der Zyklin-Konzentration zu beobachten. Beim Erreichen der maximalen Konzentration kommt es zu einem Vorrücken der Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus; im Anschluss sinkt die Konzentration der Zyklone schnell ab [14, 16].

Schädigungen der DNA, wie sie beispielsweise nach Bestrahlung auftreten, führen zu Zellzyklus-Arrest an den Kontrollpunkten des Zellzyklus. Durch Arretierung des Zellzyklus verschaffen sich die Zellen vor dem Eintritt in kritische Zellzyklusphasen zusätzliche Zeit für die DNA-Reparatur. Die nach Bestrahlung bedeutendsten Kontrollpunkte befinden sich am  $G_1$ -/S-Übergang und am Übergang von der  $G_2$ -Phase in die Mitose. Zudem sind die Zellen in der Lage, die Replikation in der S-Phase zu verlangsamen. Besonders die Phase der Mitose, in der sich der Zellkern teilt, ist für Zellen mit DNA-Schäden kritisch. Nicht kovalent verbundene Chromosomenfragmente können bei der Kernteilung verloren gehen, was zum Zelltod in der Mitose oder im weiteren Zellzyklus führen kann [9, 17]. In vielen Tumoren ist der  $G_1$ -/S-Kontrollpunkt durch Mutation des p53-Proteins oder durch Aktivierung von Onkogenen gestört. Diese Zellen sind demnach stärker als Normalgewebszellen vom Kontrollpunkt am Ende der  $G_2$ -Phase abhängig.

### 1.3.2 Biologische Strahlenwirkung

Die physikalische Wechselwirkungen ionisierender Strahlung wurden bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben; die Wirkung auf lebendes Gewebe und Zellen ist das Feld der Strahlenbiologie. Die Wechselwirkung ionisierender Strahlung in biologischen Systemen kann in drei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase der Wechselwirkungskette ist die **physikalische Phase**. Diese findet auf einer Zeitskala von  $10^{-16}$  s bis  $10^{-13}$  s statt und beschreibt die primäre Wechselwirkung der ionisierenden Strahlung mit Atomen und Molekülen und die lokale Absorption von Teilen der eingebrachten Strahlungsenergie (vgl. Abschnitt 1.1 und 1.2). Am Ende der physikalischen Phase stehen ionisierte oder angeregte Moleküle, wie z. B. die DNA oder Proteine [1, 9]. Auf die physikalische Phase folgt die **chemische Phase**, welche die sekundären Wechselwirkungsprozesse beschreibt. Dabei kann es zur Anregung der Wassermolekülen kommen, die dann zu freien Radikalen dissoziieren. Aufgrund des hohen Wassergehaltes biologischen Gewebes ist dieser Effekt für die indirekte Strahlenwirkung von großer Bedeutung. Die entstandenen Radikale sind stark reaktiv und führen über weitere Reaktionen zur Schädigung der DNA der Zellen [13, 15]. Die chemischen Prozesse finden auf einer Zeitskala von  $10^{-13}$  s bis  $10^{-2}$  s statt. Die darauf folgende **biologische Phase** umfasst Zeiträume von  $10^{-2}$  s bis zu mehreren Jahren und ist für die vorliegende Arbeit von besonderer Relevanz. In dieser Phase wird zwischen der **direkten** und in die **indirekten Strahlenwirkung** unterschieden, diese Unterteilung ist unabhängig von der Einteilung in direkt und indirekt ionisierende Strahlung. Bei der direkten Strahlenwirkung kommt es zur Ionisation und Anregung von Makromolekülen, besondere Relevanz haben dabei die



direkten Schädigungen der DNA. Diese entstehen häufig durch dicht ionisierende Strahlung mit hohem LET. Die indirekte Strahlenwirkung beschreibt die chemischen Sekundärprozesse durch die entstandenen freien Wasserradikale und reaktive Oxygen-Spezies. Zu den vielfältigen Auswirkungen ionisierender Strahlung auf Zellebene gehören [1, 14]:

- Entstehung von DNA-Schäden
- Zellzyklus-Arrest oder Erhöhung der Proliferationsrate
- Änderungen in der Zellkommunikation
- Stoffwechseländerungen
- Zerstörung oder Schädigungen der Membran und von Zellorganellen
- Aktivierung der Immunantwort
- Zelltod/Apoptose

Je nach Ausmaß und Art des Schadens, ist die Zelle in der Lage die entstandenen Schäden zu reparieren. Eine funktionierende DNA-Reparatur ist daher besonders in der biologischen Phase von Bedeutung.

### **Einflussfaktoren auf die biologische Strahlenwirkung**

Die Bestrahlungsplanung vor Beginn der Strahlentherapie ermöglicht es, Einfluss auf die physikalischen Rahmenbedingungen der Bestrahlung zu nehmen. Dazu gehören z. B. Größe und Anzahl der Strahlungsfelder sowie Dosis und Strahlungsart. Die biologischen Einflussfaktoren werden bei der Erstellung der Bestrahlungspläne in geringerem Maße berücksichtigt, dennoch haben auch diese einen Einfluss auf den Erfolg der Therapie. Zudem sind die physikalischen und biologischen Einflüsse häufig nicht klar voneinander zu trennen, wie es z. B. auch bei der Fraktionierung der Bestrahlung der Fall ist. Die zentrale Rolle der Reaktion von Tumorzellen auf Bestrahlung nehmen die 5 Rs der Strahlenbiologie ein. Bei den 5 Rs der Strahlenbiologie handelt es sich um die fünf Faktoren: Reparatur, Redistribution, Reoxygenierung, Repopulation, (intrinsische) Radiosensitivität [1, 18]. Diese sind insbesondere vom Zeitmuster der Bestrahlung und somit bei der fraktionierten Bestrahlung von Bedeutung. Teilweise wird in der Literatur auch die Reaktivierung der anti-Tumor Immunantwort als weiterer bedeutsamer Faktor genannt [19].

**Reparatur:** Diese beschreibt die Fähigkeit des Normal- und des Tumorgewebes, DNA-Schäden zu reparieren. Nicht alle Schädigungen führen zum Zelltod, da die Zellen in der Lage sind, subletale Schäden zu reparieren und weiter zu proliferieren. Die bessere Reparaturkapazität des Normalgewebes im Vergleich zum Tumorgewebe ermöglicht erst den Erfolg der Strahlentherapie. Zudem bietet die eingeschränkte Reparaturfähigkeit von Tumorzellen einen Ansatz für zielgerichtete Therapien.

**Redistribution:** Die Strahlensensitivität von Zellen ist von der Zellzyklusphase abhängig. In der Mitose sind die Zellen besonders strahlenempfindlich, da zu diesem Zeitpunkt die Kernteilung stattfindet. Aber auch in der G<sub>2</sub>- und der frühen S-Phase führt ionisierende Strahlung zu DNA-Schädigungen, die für die Zelle schwierig zu reparieren sind. In der G<sub>1</sub>-

## 1 Einleitung

Phase und zum Ende der S-Phase sind die Zellen relativ strahlenresistent [9]. Aufgrund des strahleninduzierten G<sub>2</sub>-Arrestes kommt es zu einer Umverteilung der Zellpopulationen in den einzelnen Zellzyklusphasen. Dieser Effekt ist therapeutisch jedoch nicht nutzbar, da die Ausprägungen der Veränderungen tumorspezifisch und somit sehr heterogen sind [1].

**Reoxygenierung:** Reaktive Sauerstoff-Spezies tragen im Gewebe einen Großteil zur Dosis bei. Somit hat auch die Oxygenierung des Gewebes Einfluss auf die Strahlenwirkung. Oxygenierte Tumorbereiche reagieren empfindlicher auf Bestrahlung und es kommt vermehrt zur Entstehung von DSB; hypoxische Zonen im Tumor hingegen sind strahlenresistent. In den Bestrahlungspausen der fraktionierten Bestrahlung können diese hypoxischen Bereiche, die häufig tief im Tumolvolumen liegen, reoxygeniert werden. Bisher wurden viele Ansätze untersucht, um die hypoxischen Bereiche im Tumorgewebe zu reduzieren und so den Erfolg der Radiotherapie zu erhöhen. Bis auf wenige Ausnahmen hat bisher keine Methode als Routinemethode Einzug in die Klinik gehalten [20].

**Repopulation:** Die Repopulation beschreibt die Proliferation der Tumorzellen und des Normalgewebes zwischen den Fraktionen der Bestrahlung. Dieser Effekt ist besonders bei schnell wachsenden Tumoren von Relevanz. Zudem weisen einige Tumorentitäten, wie z. B. auch Kopf-Hals-Tumore, nach Beginn der Bestrahlung eine beschleunigte Proliferation auf [4, 21].

(intrinsische) **Radiosensitivität:** Die Radiosensitivität beschreibt die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit verschiedener Tumorentitäten. Die Ursachen der intrinsischen Radiosensitivität sind noch nicht vollständig geklärt, häufig handelt es sich um ein Zusammenspiel vieler Faktoren. Es wird aber vermutet, dass den DNA-Reparaturfähigkeiten der Zellen eine besondere Bedeutung zukommt [22, 23].

**Reaktivierung** der anti-Tumor Immunantwort: Die Strahlentherapie führt nicht nur zu DNA-Schäden in Form von DSB, sondern auch zur Reaktivierung der anti-Tumor Immunantwort. Auch wenn die Auswirkungen der Bestrahlung auf die anti-Tumor Immunantwort in den letzten Jahre viel Aufmerksamkeit erfahren hat, sind die genauen Hintergründe noch unklar [18, 24].

Zusätzlich zu den 5 Rs der Strahlenbiologie und der anti-Tumor Immunantwort hat auch die Temperatur einen Einfluss auf die Strahlenwirkung, da ein Temperaturanstieg die Durchblutung und Oxygenierung des Gewebes erhöht [25]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Hyperthermie Einfluss auf die DNA-Schadensantwort hat und verschiedenen Reparaturwege inhibiert [26]. In den letzten Jahren wurde der Einsatz von Hyperthermie in Radio- und Chemotherapie untersucht, wobei einige Studien vielversprechende Ergebnisse zeigten und sich bei Kopf-Hals-Tumoren auch für HPV-positive Tumore eine Reduktion der Strahlendosis als möglich aufzeigt. Trotz einer Vielzahl von klinischen Studien in verschiedenen Krebsentitäten, hat der Einsatz der Hyperthermie noch keinen Einzug in die Routinebehandlung gefunden [25, 26].

### 1.4 Die zelluläre Schadensantwort

Das Ziel von Radio- und Chemotherapie ist die Schädigung der Tumor-DNA. Schädigungen an Zellorganellen sind für das klonogene Zellüberleben weniger wichtig und werden erst bei sehr hohen Dosen und extremen Schädigungen relevant [1]. Die DNA kann nicht nur durch exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung oder chemisch mutagene Substanzen

geschädigt werden, sondern auch durch endogene Faktoren, wie z. B. Fehler in der Replikation/Rekombination oder reaktive Sauerstoffspezies. Eine funktionierende DNA-Reparatur ist für die Zelle also von immenser Bedeutung [14, 27]. Die DNA-Schadensantwort (*DNA-damage response*, DDR) beinhaltet nicht nur die Reparatur von DNA-Schäden, sondern auch weitere Maßnahmen, wie beispielsweise den Zellzyklus-Arrest und Apoptose [4, 28]. Bei der Schädigung der DNA kann in verschiedene Arten von Schäden unterschieden werden [4, 14]:

- Basenverluste/Basenmodifikationen
- DNA-Schäden durch Oxidation
- DNA-Addukte
- Einzelstrangbrüche
- Doppelstrangbrüche

Für die Strahlentherapie sind insbesondere DSB von Bedeutung, da bereits ein einzelner DSB ein letales Ereignis für die Zelle sein kann [14, 29]. In diesem Abschnitt werden Begriffe und Zusammenhänge der zellulären Schadensantwort dargestellt, die zwingend für das Verständnis der Ergebnisse dieser Dissertation notwendig sind. Um es den Lesern zu ermöglichen, einzelne Themenbereiche nachzuschlagen, wurden diverse Unterkapitel erstellt. Zuerst erfolgt eine Beschreibung der Grundlagen der DNA-Reparatur in den Zellen und der wichtigsten DSB-Reparaturwege. Im Anschluss werden weitere wichtige Komponenten (z. B. PARP, Wee1 und Chk1) und ihre Rolle in der zellulären Schadensantwort vorgestellt.

#### 1.4.1 Grundlagen der DNA-Reparatur

Zellen sind einer Vielzahl an potenziell schädigenden Ereignissen ausgesetzt. Es wird geschätzt, dass in einer Säugetierzelle täglich spontan 10 000–20 000 Basenmodifikationen sowie etwa 55 000 Einzel- und 10–50 DSB entstehen [14]. Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy Röntgenstrahlung führt in Säugetierzellen zu weiteren 2000 Basenschäden sowie 1000 Einzel- und etwa 30 DSB [17]. Diese Zahlen zeigen, dass der menschliche Körper effektive Reparaturmechanismen besitzen muss, die durchgängig im Einsatz sind, um Schädigungen zu reparieren. Solange noch ein Strang der DNA intakt ist, kann dieser als Matrize für die Reparatur genutzt werden. Einzelstrangschäden sind daher für die Zelle in der Regel schnell und fehlerfrei zu reparieren. Die Reparaturmechanismen, die dafür zur Verfügung stehen, sind die Mismatch-Reparatur, die Basenexzisionsreparatur und die Nukleotidexzisionsreparatur [14]. Doppelstrangbrüche hingegen stellen für die Zelle eine deutlich größere Herausforderung dar. Sie entstehen aus Anhäufungen von zeitlich und/oder räumlich dicht beieinander liegenden SSB. Besonders bei hoch-LET Strahlung steigt die Wahrscheinlichkeit von DSB an, allerdings können diese auch durch Fehler während der Replikation entstehen. Doppelstrangbrüche sind für die Zelle nicht immer fehlerfrei zu reparieren und residuelle DNA-Schädigungen durch ausbleibende oder fehlerhafte Reparatur können zu Mutationen, Chromosomenaberrationen und sogar Zelltod führen [30].

Die Antwort der Zelle auf einen DSB kann stark vereinfacht in drei Schritte unterteilt werden [3, 14]:

## 1 Einleitung

- (1) **Erkennung des Schadens:** Die zentralen Kinasen bei der Erkennung von DSB sind *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) und *ataxia-telangiectasia and Rad3 related* (ATR) [3, 31]. Zusammen mit dem MRE11–RAD50–NBS1-Komplex (MRE-Komplex) werden weitere Faktoren, wie z. B. das Histon H2AX, phosphoryliert. Die Phosphorylierung von H2AX zu  $\gamma$ H2AX (*phosphorylated ( $\gamma$ ) H2A histone family member X*) führt anschließend zur Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturproteine [28, 31, 32].
- (2) **Prozessierung der offenen Bruchenden:** Der genaue Ablauf der Prozessierung an den Bruchenden ist dabei vom Reparaturwege abhängig; in Abschnitt 1.4.1 werden die Reparaturwege näher beschrieben.
- (3) **Entscheidung zwischen Reparatur oder Zelltod**

Die Aktivierung von ATM und ATR führt neben der Phosphorylierung von H2AX auch zur Phosphorylierung von Chk1 und p53. Diese beiden Proteine spielen eine bedeutende Rolle für die Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte. Der darauf folgende Zellzyklus-Arrest verschafft der Zelle zusätzliche Zeit, um DNA-Schädigungen zu reparieren. Findet die DNA-Reparatur zeitgleich mit der Replikation statt, führt dies vermehrt zu Fehlern [14, 28, 31]. Die Phosphorylierung von H2AX zu  $\gamma$ H2AX hat eine zentrale Funktion in der DNA-Schadensantwort und findet lokal begrenzt in den Bereichen der DSB statt. Das am Ort des DSB akkumulierte  $\gamma$ H2AX kann in der Immunfluoreszenz (IF) angefärbt werden und ist als sogenannter  *$\gamma$ H2AX Focus* im Mikroskop erkennbar. Somit kann die Anzahl der  $\gamma$ H2AX Foci als Surrogatmarker für die Anzahl von DSB genutzt werden. Die Auszählung von  $\gamma$ H2AX Foci in den Stunden nach der Bestrahlung ermöglicht es die Kinetik der DNA-Reparatur zu untersuchen. Der zweiphasige Verlauf der DNA-Reparatur nach Bestrahlung mit 2 Gy, ist in Abbildung 3 anhand der Anzahl residueller  $\gamma$ H2AX Foci dargestellt. Direkt nach der Bestrahlung kommt es mit der Phosphorylierung von H2AX am Ort des DSB zu einem starken Anstieg der  $\gamma$ H2AX Foci. Anschließend ist in einem Zeitraum von 5 min bis 30 min ein exponentieller Abfall der Anzahl von  $\gamma$ H2AX Foci zu erkennen. Bei diesem Anteil handelt es sich um die schnelle Komponente der Reparatur. Mit einer Halbwertszeit von einigen Stunden folgt daraufhin die langsame Komponente. Nicht reparierte DSB verbleiben als residuelle Foci, die nach 24 h als Plateau zu erkennen sind. Für dicht ionisierende Strahlung zeigen sich Veränderungen in der Reparatur-Kinetik, da sich bei hoch-LET Strahlung die Komplexität der Schäden erhöht und diese für die Zelle schwieriger zu reparieren sind [17].

### 1.4.2 DNA-Reparaturwege

Im diesem Abschnitt werden die wichtigsten DSB-Reparaturwege vorgestellt. In menschlichen Zellen sind dabei besonders die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ), die homologe Rekombination (*homologous recombination*, HR) und die alternative-Endverknüpfung (*alternative end-joining*, alt-EJ) von Bedeutung. Eine vereinfachte Darstellung der Reparaturwege findet sich in Abbildung 4. Die Auswahl des Reparaturweges erfolgt abhängig von der Zellzyklusphase und dem Ausmaß und der Komplexität der Schäden [27, 30]. Bei der Darstellung der Reparaturwege in diesem Abschnitt handelt es sich um eine vereinfachte Übersicht zur Darstellung der prinzipiellen Abläufe inklusive zentraler essentieller Proteine. Die Reparaturwege, insbesondere die HR, sind tatsächlich deutlich komplexer und weiterhin Gegenstand aktueller strahlenbiologischer Forschung [17,

27, 31]. Die medikamentöse Inhibition von DNA-Reparaturwegen kann genutzt werden, um die Wirksamkeit von Strahlen- und Chemotherapie zu verbessern [33].

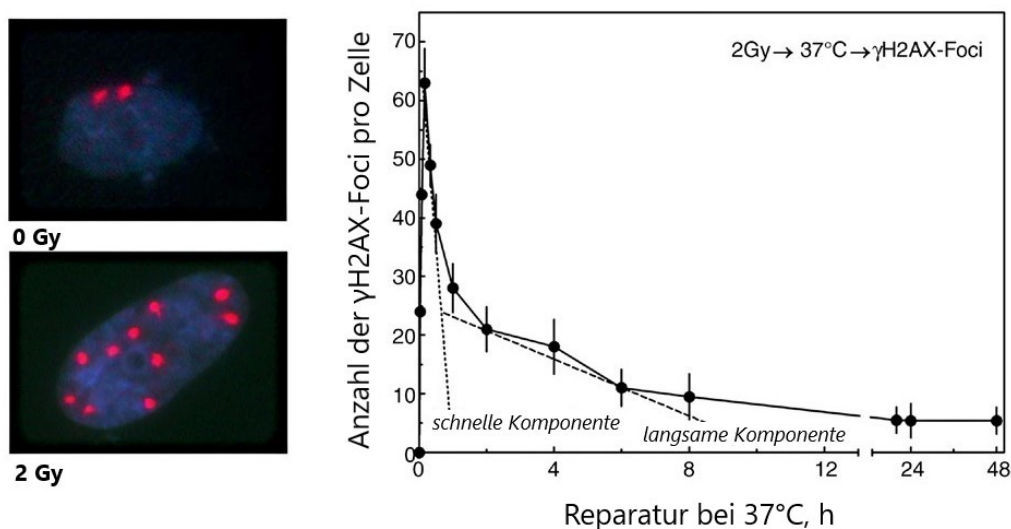


Abb. 3: **Kinetik der DNA-Reparatur.** In den zwei linken Bildern sind exemplarisch Bilder der  $\gamma$ H2AX Foci nach Bestrahlung mit 0 Gy und 2 Gy gezeigt. Die Zellkerne sind blau angefärbt, die  $\gamma$ H2AX Foci darin in rot erkennbar. Die rechte Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der Anzahl an  $\gamma$ H2AX Foci nach Bestrahlung mit 2 Gy dar. Es zeigt sich darin zu Beginn die Ausbildung einer schnellen Komponente mit steilem Abfall der Focizahl. Darauf folgt ein langsamerer Abfall mit der Ausbildung eines Plateaus etwa 24 h nach Bestrahlung. Die Abbildung ist modifiziert nach [17].

### Nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ)

Der am häufigsten benutzte Reparaturweg in menschlichen Zellen ist die NHEJ. Dieser Reparaturweg kann in allen Zellzyklusphasen ablaufen [17, 30]. Nach Induktion eines DSB bindet der Komplex des Heterodimers Ku70/Ku80 an die Bruchenden und schützt diese vor Degradation und Dissoziation. Zudem dient er als Grundgerüst für weitere Proteine, die zur Bruchstelle rekrutiert werden [28]. Zunächst folgt die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*, DNA-PKcs), wodurch es zur Bildung des sogenannten DNA-PK-Komplexes kommt. Die Aktivierung des DNA-PK-Komplexes führt dazu, dass weitere Proteine für den Ligationsvorgang rekrutiert und die DSB-Enden für die Ligation zugänglich gemacht werden. Dabei kommt den Proteinen DNA LigaseIV, XRCC4 (*X-Ray Repair Cross Complementing 4*) und XLF (*XRCC4-Like Factor*) besondere Bedeutung zu [17, 30, 34]. Je nach Komplexität des Schadens ist die Aktivität weiterer Reparaturproteine notwendig. Nach Verknüpfung der Bruchenden kommt es zur Auflösung des NHEJ-Komplexes. Aufgrund der Notwendigkeit der Prozessierung der nach Bestrahlung oxidativ geschädigten Bruchenden, läuft die Reparatur über den NHEJ-Reparaturweg nicht immer fehlerfrei ab; sie führt jedoch nicht zu strukturellen Chromosomenveränderungen oder dem Verlust größerer DNA-Bereiche [30].

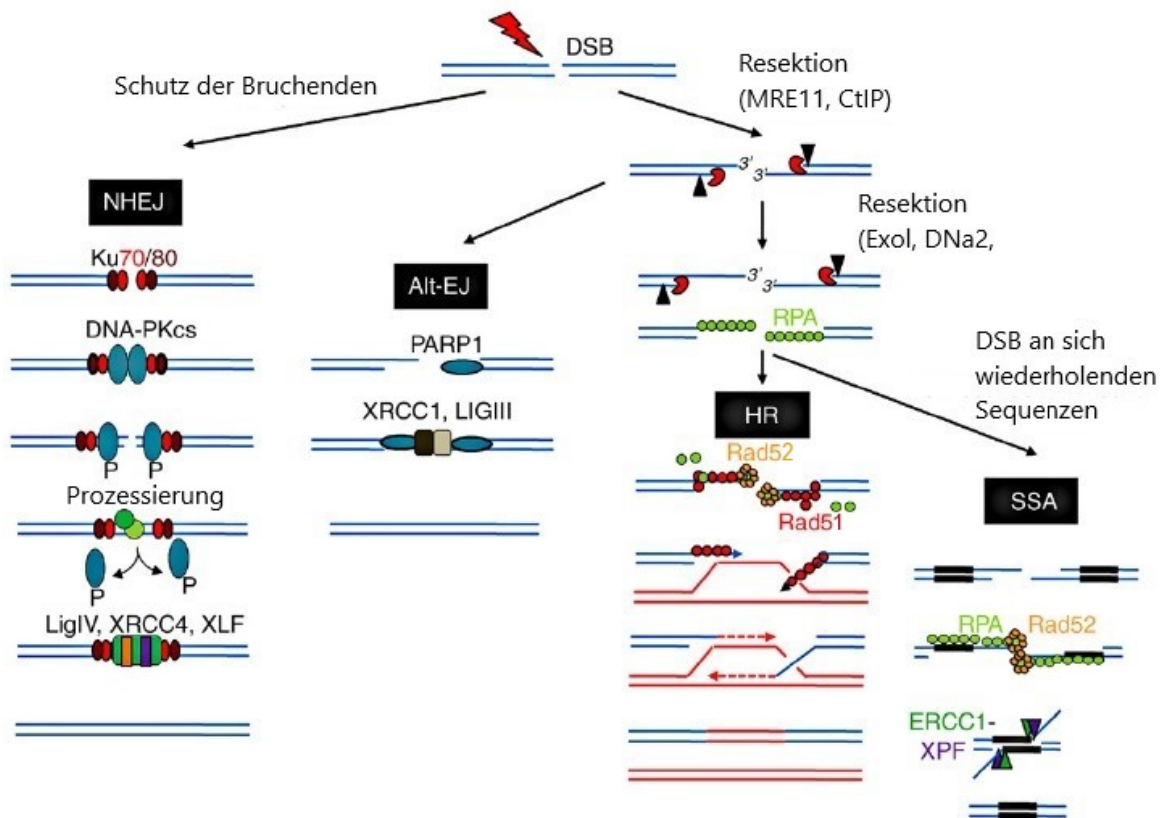


Abb. 4: **Übersicht zu den verschiedenen DNA-Reparaturwegen.** Gezeigt sind die wichtigsten Reparaturwege: die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ), die alternative Endverknüpfung (*alternative end-joining*, alt-EJ), die homologe Rekombination (*homologous recombination*, HR) und das *single-strand annealing* (SSA). Die Abbildung ist modifiziert nach [17].

### Homologe Rekombination (*homologous recombination*, HR)

Die HR ist im Unterschied zum NHEJ-Reparaturweg bei korrektem Ablauf fehlerfrei. Allerdings wird für diesen Reparaturweg das Schwesterchromatid benötigt, sodass die HR nur in der S- und G<sub>2</sub>-Phase stattfinden kann, da die Schwesterchromatiden erst im Zuge der DNA-Replikation in der S-Phase entstehen. [17, 28, 30]. Es handelt sich dabei um zwei identische Chromatiden, sodass in der Mitose beide Tochterzellen jeweils eine vollständige Kopie erhalten [15]. In der HR beginnt die Reparatur des DSB mit der Resektion der 5'-Bruchenden, um einzelsträngige DNA-Bereiche zu generieren, die für die Suche des homologen Sequenzabschnitts auf dem Schwesterchromatid gebraucht werden. Initial erfolgt die Resektion durch die Nukleasen MRE11 (*Meiotic Recombination 11*) und CtIP (*C-terminal binding protein 1 interacting protein*). Im weiteren Verlauf der Resektion sind noch die Proteine Exo1 (*Exonuclease 1*), DNA2 und BLM (*Bloom Helikase*) beteiligt. Die nach der Resektion entstanden Bereiche mit freiem 3'-Bruchende werden anschließend über RPA (*Replication protein A*) stabilisiert und geschützt [14, 17, 35]. Vermittelt von Rad52 und BRCA2

(*BR*east *C*Ancer *G*ene 2) und weiteren Proteinen, wird RPA durch Rad51 wieder von der DNA verdrängt. Rad51 wird auch als Rekombinase bezeichnet und induziert die Bildung von Rad51 Nukleoproteinfilamenten, welche im Schwesterchromatid nach dem Bereich der Homologie suchen. Daraufhin kommt es zur Stranginvasion, indem sich der einzelsträngige DNA-Abschnitt des geschädigten DNA-Stranges mit dem anti-parallelen Einzelstrang des homologen, ungeschädigten Schwesterchromatid-Bereiches paart [14]. Die Formation, die auf diese Weise entsteht, wird als D-loop (*displacement-loop*) bezeichnet [35]. Ausgehend vom 3'-Ende kommt es anschließend zur Synthese der DNA über die Bruchstelle hinweg, wobei es zur Entstehung von sogenannten Holliday-Strukturen (*Holliday junctions*) kommt. Diese Strukturen beschreiben eine Formation, bei der eine Verknüpfung der sich überkreuzenden DNA-Stränge vorliegt [17, 35]. Die HR endet mit der Ligation des invasierenden DNA-Stranges und Auflösung der Holliday Strukturen [17].

### **Alternative Endverknüpfung (*alternative end-joining*, alt-EJ) und *single-strand annealing* (SSA)**

In vielen Tumorzellen sind die NHEJ- und HR-Reparaturfähigkeiten eingeschränkt und so greifen diese Zellen auf alternative, fehleranfällige Reparaturwege zurück. Die beiden wichtigsten sind dabei die alt-EJ und das SSA. Der Weg der alt-EJ wird häufig auch als *microhomology-mediated end-joining* (MMEJ) oder *back-up-NHEJ* bezeichnet. Besonders Zellen mit eingeschränkter NHEJ-Kapazität nutzen diesen Reparaturweg, um DNA-Schäden zu reparieren [17]. Ein vermehrter Einsatz des alt-EJ wurde auch für HPV-positive Kopf-Hals-Tumorzellen beschrieben und könnte eine mögliche Ursache für deren erhöhte Strahlenempfindlichkeit sein [36].

Wie bei der HR kommt es bei der alt-EJ und beim SSA zur Resektion der Bruchenden durch die Nukleasen MRE11 und CtIP, wodurch einzelsträngige Bruchenden entstehen. Beim alt-EJ werden diese Bruchenden von dem Enzym PARP erkannt, welches einen wichtigen Faktor im alt-EJ darstellt, da es zudem LIG3 (*DNA Ligase 3*) und XRCC1 (*X-Ray Repair Cross Complementing 1*) zur Bruchstelle rekrutiert [17, 37]. Das Alignment der Bruchenden erfolgt anhand von auf demselben Strang gelegenen Mikrohomologien, die meist eine Länge von 5–20 Basenpaaren aufweisen [35]. Bei der anschließenden Resektion der Überhänge kommt es zur Deletion der zwischen den Mikrohomologien gelegenen Bereiche, sodass dieser Reparaturweg generell fehlerhaft und mutagen ist [14]. Das SSA kommt zum Einsatz, wenn sich der DSB zwischen zwei sich wiederholenden Sequenzen befindet. Im Unterschied zum alt-EJ sind die Bereiche der Homologien beim SSA größer, zudem erfolgt die Paarung der Homologien über das Protein Rad52 [14, 17, 35]. Beim SSA kommt es immer zum Verlust einer der sich wiederholenden Sequenzen und der dazwischen gelegenen DNA-Abschnitte. Da die sich wiederholenden Sequenzen unter Umständen einige Kilo-Basen auseinander liegen können, ist dieser Reparaturweg stark mutagen. Bisher wurde noch keine gesteigerte Verwendung des SSA in HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren beschrieben.

### **1.4.3 Replikationsstress**

Neben einer effektiven DNA-Reparatur ist eine möglichst reibungslos ablaufende DNA-Replikation ein wichtiger Faktor für das Zellüberleben. Der Replikationsvorgang beschreibt

die Verdopplung der Zell-DNA in der S-Phase. Bei Eintritt der Zelle in die S-Phase kommt es durch Zyklin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) zu einer Aktivierung eines Teils der ruhenden Replikationsursprünge. Bei den Replikationsursprüngen handelt es sich um spezifische DNA-Sequenzen, an denen die Replikation startet. Die DNA-Synthese erfolgt dann mit Hilfe an der DNA entlangwandernder Proteinkomplexe, den sogenannten Replikationsgabeln [38]. Für eine fehlerfreie Replikation muss die Zelle die Aktivierung ruhender Replikationsursprünge, die Geschwindigkeit der Replikationsgabeln und den Verbrauch der benötigten Nukleoside sorgsam regulieren [39]. Exogene und endogene Faktoren können in der Zelle Störungen im Ablauf der Replikation, den sogenannten Replikationsstress verursachen. Dieser kann zu DNA-Schäden und Fehlern in der DNA-Sequenz führen, was weitreichende Konsequenzen auf die genomische Integrität und das Zellüberleben haben kann [39]. Viele Krebszellen sind aufgrund fehlender Zellzyklus-Kontrollpunkte oder eingeschränkter Reparaturfähigkeiten erhöhtem Replikationsstress ausgesetzt [39, 40]. Diese Tatsache wird schon lange in der Krebstherapie genutzt, da auch Chemotherapeutika zu einer massiven Steigerung von Replikationsstress führen können. Mögliche Folgen sind eine stark verlangsamte DNA-Replikation bis hin zum Replikationsstopp und eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase. Unter Replikationsstress entstehen längere einzelsträngige DNA-Bereiche, welche durch die Kinase ATR detektiert werden. Es erfolgt daraufhin durch ATR die Phosphorylierung von H2AX zu  $\gamma$ H2AX, sodass die entsprechenden Bereiche von  $\gamma$ H2AX markiert sind. Dieses kann über Antikörper detektiert und angefärbt und als Marker für Replikationsstress genutzt werden [41]. Im Gegensatz zu DSB werden bei massivem Replikationsstress in S-Phase-Zellen aufgrund der hohen Zahl betroffener Replikationsgabeln größere Kernbereiche und nicht so sehr distinkte Foci beobachtet [40]. In Fällen von langanhaltendem und schwerwiegendem Replikationsstress kann es zum Kollabieren der Replikationsgabeln kommen, woraus sogenannte replikationsassoziierte DSB resultieren können [17, 38]. Die in dieser Arbeit durchgeführte duale Inhibition der nachfolgend beschriebenen Proteine PARP und Wee1 wirkt zwar nicht ausschließlich, aber zum Teil über die Induktion von Replikationsstress und über die Induktion von DSB im Rahmen aberranter Replikationsvorgänge.

### 1.4.4 PARP, Wee1 und Chk1 in der zellulären Schadensantwort

#### PARP

Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARP) sind eine Gruppe von Enzymen, die die Bildung von Poly(ADP-Ribose), einer posttranslationalen Proteinmodifikation, katalysieren. Diese spielt in verschiedenen zellulären Prozessen und auch in der DNA-Reparatur eine prominente Rolle [42]. Poly(ADP-Ribose) markiert hierbei die Läsion und rekrutiert weitere DNA-Reparaturfaktoren. Insbesondere PARP1 ist sowohl an der Reparatur von SSB als auch von DSB, letzteres über den DSB-Reparaturweg der alt-EJ, beteiligt [43, 44]. Aufgrund seiner Bedeutung in den verschiedenen Reparaturwegen, wird die Inhibition von PARP als ein Ansatz zur Radiosensibilisierung untersucht. PARP-Inhibitoren sind insbesondere für ihre Wirksamkeit in Tumoren mit eingeschränkter HR-Reparatur bekannt. Da eine Vielzahl endogener SSB unter PARP-Inhibition nicht effektiv repariert werden kann, kommt es in der S-Phase vermehrt zur Kollision von SSB mit Replikationsgabeln. Dabei entstehen replikationsassoziierte DSB. Um diese aufzulösen ist eine effektive HR notwendig; eine HR-



Defizienz hingegen führt zum wirkungsvollen Abtöten der Tumorzellen. Zudem verhindern die in der Klinik eingesetzten PARP-Inhibitoren, wie z. B. Olaparib, eine Dissoziation des PARP-Proteins von der DNA; dies wird als „PARP-Trapping“ bezeichnet. Der Zusammenstoß von Replikationsgabeln mit diesen Strukturen („trapped PARP“) führt ebenfalls zur Bildung replikationsassoziierter DSB und erfordert den Einsatz der HR [42, 45]. Bei Kombination von PARP-Inhibitoren mit ionisierender Strahlung induziert Letztere eine große Zahl an SSB, sodass in besonderem Maße replikationsassoziierte DSB zu erwarten sind. Zudem wird PARP wie oben beschrieben, ebenfalls für DSB-Reparatur mittels alt-EJ benötigt. Die Inhibition von PARP ist daher, vor allem aufgrund zusätzlicher Schäden in der S- und G<sub>2</sub>, ein effektiver Ansatz zur Radiosensibilisierung proliferierender Zellen. Neben seiner Funktion bei der DNA-Reparatur ist PARP auch eine protektive Rolle an der Replikationsgabel zugeschrieben worden und soll auch am Neustart blockierter Replikationsgabeln beteiligt sein [17, 37].

### Wee1 und Chk1

Nach Bestrahlung ist neben der DNA-Reparatur auch die Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte von entscheidender Bedeutung. Über eine Arretierung des Zellzyklus verschafft sich die Zelle vor Eintritt in die Mitose zusätzliche Zeit für die DNA-Reparatur, wodurch letale Chromosomenaberrationen vermieden werden können [14, 46]. Eine besondere Rolle für die Zellzyklus-Kontrollpunkte spielt die Kinase Wee1, die den Eintritt der Zelle in die kritische Mitosephase reguliert, indem es CDK1 an der Aminosäure Tyrosin 15 (Tyr-15) phosphoryliert und diese so inaktiviert [46]. Da Krebszellen häufig durch eine Mutation oder Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 nicht mehr auf den Kontrollpunkt am G<sub>1</sub>-/S-Phase Übergang zurückgreifen können, sind sie besonders vom G<sub>2</sub>-Arrest abhängig. Aus diesem Grund finden bereits Wee1-Inhibitoren in klinischen Studien, auch in Kombination mit Bestrahlung, Anwendung [47]. Eine weitere Möglichkeiten zur Hemmung des G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Kontrollpunktes stellt die Inhibition der Kinasen ATR/Chk1 dar, welche ansonsten nach Bestrahlung durch Inaktivierung von Wee1-Antagonisten die Auslösung des G<sub>2</sub>-Arrestes induzieren. Die alleinige oder auch kombinierte Inhibition von Wee1 oder ATR/Chk1 führt also direkt oder indirekt zu erhöhter CDK1-Aktivität, die den Übergang von der G<sub>2</sub>-Phase in die Mitose selbst bei Vorhandensein von DNA-Schäden vorantreibt. Zusätzlich zu einem vorzeitigen Eintritt in die Mitose kommt es teilweise zur Induktion von massivem Replikationsstress, da neben CDK1 auch die vor allem in der S-Phase aktive CDK2 in derselben Weise reguliert wird. Unphysiologisch erhöhte CDK2 Aktivität führt zu einem vermehrten Auslösen von ruhenden Replikationsursprüngen und somit zur Aktivität von vielen Replikationsgabeln. In Folge kann es zu einem Mangel der für die Replikation notwendigen Nukleoside und zu einer Verlangsamung und Blockade von Replikationsgabeln kommen [38, 48]. Dieser erhöhte Replikationsstress unter Wee1- sowie ATR/Chk1-Inhibition wird auch unabhängig von der Bestrahlung beobachtet und könnte bei zusätzlicher Bestrahlung ein ungünstiges Umfeld für die Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden schaffen [46]. In der Literatur wurde zudem berichtet, dass die Hemmung von Wee1 auch direkt die Fähigkeit der Tumorzellen zur Durchführung der HR beeinträchtigen kann [49].

## 1.5 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereiches (HNSCC)

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereiches (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) stellen weltweit die siebthäufigste Krebsart dar. Für das Jahr 2020 wird ihre Inzidenz auf fast 880 000 Fälle geschätzt [50].

### 1.5.1 Ursachen und Risikofaktoren

Wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich sind extensiver Tabak- und Alkoholkonsum sowie Infektionen mit Hochrisikostämmen des humanen Papillomvirus (*human papillomavirus*, HPV). Letztere führen in den meisten Fällen zu Oropharynxkarzinomen (*oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OPSCC). Die Inzidenz von HPV-positiven OPSCC unterliegt großen geografischen Schwankungen; in vielen westlichen Ländern konnte in den letzten Jahren jedoch ein starker Anstieg dokumentiert werden [51]. Während es in HPV-negativen Tumoren häufig zu Mutationen und somit zum Funktionsverlust des Tumorsuppressorproteins p53 kommt, ist die Funktion dieses Proteins in HPV-positiven Tumoren durch das Onkoprotein E6 (*early protein 6* des HPV-Virus) degradiert. Dies führt unter anderem zu einem Verlust des strahleninduzierten Zellzyklus-Kontrollpunktes am Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase [51]. In beiden Tumorarten kommt es jedoch noch zu einer weiteren Deregulation des G<sub>1</sub>-/S-Übergangs. In den HPV-positiven Tumoren geschieht dies durch das Onkoprotein E7 (*early protein 7* des HPV Virus), welches zur Degradation des Tumorsuppressors und G<sub>1</sub>-/S-Regulators Retinoblastom-Protein (pRB) führt. Der Tumorsuppressor p16 der innerhalb einer regulatorischen Rückkopplung die pRB-Funktion unterstützt, wird aufgrund des Fehlens von pRB in HPV-positiven OPSCC-Zellen in großen Mengen toleriert. Dies führt dazu, dass diese Tumore erhöhte Mengen an p16 aufweisen [14, 52]. Aus diesem Grund wird die Expression von p16 in der Klinik als Surrogatmarker für HPV-positive HNSCC genutzt. In den HPV-negativen HNSCC ist p16 hingegen meistens durch Genverlust, Mutation oder fehlende Expression aufgrund von Promotormethylierung unterdrückt, sodass diese Tumoren häufig kaum p16 exprimieren und als p16-negativ bezeichnet werden [52, 53].

### 1.5.2 Standardtherapie

In der Regel werden HNSCC erst in lokal fortgeschrittenen Stadien entdeckt und mit multimodalen Therapien, also einer Kombination aus Operation plus Bestrahlung und/oder Chemotherapie behandelt. Die Standardbehandlung der lokal fortgeschrittenen Erkrankung ist die Bestrahlung plus Chemotherapie auf Cisplatin-Basis, entweder in der Primärbehandlung oder als adjuvante Behandlung nach einer Operation. In vielen Fällen ist diese multimodale Therapie mit starken Nebenwirkungen verbunden [54, 55].

Die Maximaldosis in der Strahlentherapie ist immer durch die Strahlentoleranz des umliegenden Normalgewebes begrenzt. Da im Kopf-Hals-Bereich viele grundlegende Vitalfunktionen und Risikoorgane wie z. B. die Speicheldrüsen und die Schluckmuskulatur liegen, ist eine exakte Definition des Bestrahlungsvolumens und der Strahlendosen auf den Risikoorganen essenziell [56, 57]. Eine Möglichkeit, die Dosis im umliegenden Gewebe zu reduzieren,

ist der Einsatz der Intensitätsmodulierten-Radiotherapie (*intensity modulated radiotherapy*, IMRT). Im Unterschied zur konformalen 3D-Radiotherapie werden bei der IMRT sowohl die Feldanzahl als auch die Strahlungsintensität mit Hilfe von Multilamellenkollimatoren moduliert. Dies ermöglicht eine Anpassung des Strahlungsfeldes an beliebige Zielvolumina und eine verbesserte Schonung von Risikoorganen [58, 59]. Durch Einsatz der IMRT kann das Auftreten von Mundtrockenheit in HNSCC-Patient:innen um den Faktor 2 bis 4 reduziert werden [56, 60]. Inzwischen hat die IMRT in Deutschland flächendeckend Einzug in die Strahlentherapie von HNSCC-Patient:innen gefunden [58, 61]. Doch selbst beim bestmöglich ausgearbeiteten Bestrahlungsplan kann eine relevante Bestrahlung des umliegenden Gewebes nie vollständig vermieden werden. Dies resultiert in akuten sowie späten Nebenwirkungen und auch die zum Teil zeitgleich durchgeführte Chemotherapie trägt zur Toxizität der Behandlung bei. Bei den akuten Nebenwirkungen im Kopf-Hals-Bereich handelt es sich unter anderem um Schleimhautentzündungen (Mukositis), Schluckstörungen (Dysphagie), Dermatitis, Schmerzen und Mundtrockenheit (Xerostomie). Dies führt dazu, dass die Lebensqualität der Betroffenen unter der Radiotherapie stark reduziert ist [56, 61]. Auch bei den späten Nebenwirkungen der Radiotherapie kommt es zu Mundtrockenheit (60 % bis 90 % der Patient:innen) und Schluckstörungen, zudem zu Hörverlust, Fibrose, laryngealer Knorpelnekrose und Osteoradionekrose [61]. Diese späten Nebenwirkungen sind irreversibel und beeinflussen die Lebensqualität der Patient:innen bis an ihr Lebensende negativ [55, 61]. Patient:innen, die eine HNSCC-Erkrankung und die Therapie überleben, haben ein bis zu zweimal höheres Suizidrisiko als Überlebende anderer Tumorentitäten [62]. Es ist daher dringend notwendig die Toxizität der Therapie abzuschwächen.

### 1.5.3 Ansprechen auf die Therapie

In Patient:innen mit OPSCC vermittelt die Positivität für HPV-DNA oder den Surrogatmarker p16 eine deutlich günstigere Prognose, und das, obwohl diese Tumoren oft sehr frühzeitig Lymphknotenmetastasen ausbilden [51, 52]. Das verbesserte Überleben (*overall survival*, OS) von HPV-positiven Patient:innen nach Radiochemo-, oder alleiniger Radiotherapie ist in vielen klinische Studien beobachtet worden und exemplarisch in Abbildung 5 A dargestellt. Vor allem in lokal fortgeschrittenen Stadien zeigt sich zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Patient:innen ein unterschiedliches Ansprechen auf die Therapie. Dieses ist unabhängig davon, ob diese mit Chemo- oder alleiniger Strahlentherapie behandelt werden [52, 63]. Die Mechanismen, die dieser erhöhten Strahlenempfindlichkeit zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig geklärt und werden zum Teil kontrovers diskutiert. Zunächst einmal sind Patient:innen mit einer HPV-positiven Erkrankung tendenziell jünger und weisen seltener Komorbiditäten und eine Raucheranamnese auf. Jedoch variieren diese Tendenzen zwischen den Patient:innenkohorten und reichen nicht aus, um das verbesserte Ansprechen, welches in einer Vielzahl von Studien beobachtet wurde, zu erklären [63]. Es gibt zwei Haupttheorien, die versuchen, das verbesserte Therapie-Ansprechen von HPV-positiven Tumoren aus biologischer Sicht zu erklären. Eine Theorie ist die erhöhte Immunogenität HPV-positiver Tumore [18, 64]. Die andere, eine erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit, die durch einen Defekt bei der Reparatur von strahleninduzierten DNA-DSB verursacht wird [23, 65]. Im Labor für Strahlenbiologie konnte in Vorarbeiten bereits auf zellulärer Ebene eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit der HPV-positiven HNSCC-Zelllinien beobach-

## 1 Einleitung

tet werden [22]. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5 B dargestellt. In der Abbildung ist das Zellüberleben nach Bestrahlung für HPV-positive und HPV-negative Zelllinien gezeigt. Es ist zu erkennen, dass HPV-positive HNSCC-Zelllinien im Durchschnitt radiosensibler sind als HPV-negative Zellen. Auch in der Literatur wurde diese Beobachtung mehrfach bestätigt [65, 66]. Als Ursache für die höhere Radiosensibilität konnte in der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Rieckmann, auf Basis der Anzahl residueller Reparaturfoci ein Defekt in der DSB-Reparatur nachgewiesen werden [22]. Seitdem wurden in einer Reihe von Arbeiten verschiedene Mechanismen für den DSB-Reparaturdefekt beschrieben, wie z. B. ein Defekt in der HR [67, 68], eine verstärkte Nutzung der alt-EJ durch einen Mangel an HR [69] oder ein vermehrter Einsatz der alt-EJ aufgrund verringerter NHEJ [36]. Auch wenn die genaue molekulare Natur noch umstritten und die Erklärungen zum Teil widersprüchlich sind, wurde das Vorhandensein einer intrinsischen Radiosensitivität und eines DSB-Reparaturdefekts jedoch wiederholt bestätigt.

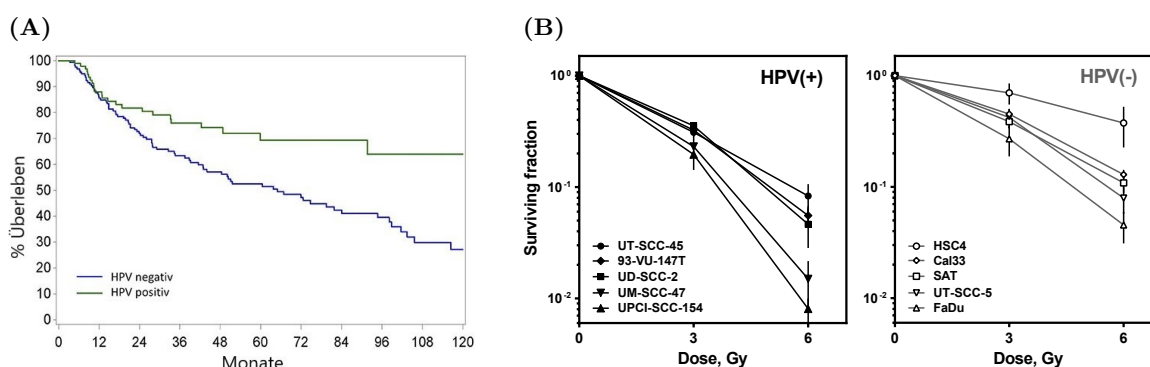


Abb. 5: **Vergleich der Strahlenempfindlichkeit von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC.** (A): Dargestellt ist das Überleben von Patient:innen mit HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC nach Strahlentherapie (plus Chemotherapie). Die Abbildung ist modifiziert aus [70]. (B): Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von HNSCC-Zelllinien. Gezeigt ist das Überleben von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien nach Bestrahlung im *delayed-plating* Koloniebildungstest. Die HPV-positiven Zelllinien sind im Durchschnitt radiosensibler als die HPV-negativen Zellen. Die Abbildung ist entnommen aus [22].

Trotz dieser nachgewiesenen strahlenbiologischen Unterschiede, gibt es bisher noch keine Unterschiede in der Behandlungsstrategie der beiden Patient:innengruppen. Während in HPV-negativen HNSCC die Heilungsraten noch weiter erhöht werden sollten, steht bei Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC eine sichere Deintensivierung der Therapie im Vordergrund. Diese Patient:innen haben meist eine gute Prognose, leiden aber besonders unter der starken Toxizität und den irreversiblen Nebenwirkungen der Therapie.

### 1.5.4 Zielgerichtete Therapie und Deintensivierung

Das einzig zugelassene molekulare Targeting in HNSCC ist der Einsatz des anti-*epidermal growth factor receptor* (EGFR) Antikörpers Cetuximab, nachdem in einer Phase-3-Studie

für HNSCC-Patient:innen bei Radiotherapie plus Cetuximab höhere Überlebensraten beobachtet wurden als bei alleiniger Radiotherapie [71]. Cetuximab sollte das Zytostatikum Cisplatin in der Therapie ersetzen und so die Toxizität der Therapie unter Beibehaltung der vollen Strahlendosis reduzieren. Allerdings wird dies mittlerweile kritisch gesehen, da sich die Kombination aus Radiotherapie plus Cetuximab wiederholt dem aktuellen Standard aus Radiotherapie plus Cisplatin unterlegen gezeigt hat [72]. Besonders deutlich ist dies in den HPV-positiven HNSCC, da drei unabhängige Phase-3-Studien, an denen mehr als 1000 Patient:innen teilnahmen, eine Unterlegenheit dieses Deintensivierungskonzepts zeigten und zudem keine geringere Toxizität nachweisen konnten [73–75]. Im Einklang mit diesen negativen klinischen Ergebnissen konnte im Labor für Strahlenbiologie bereits zuvor gezeigt werden, dass HPV-positive HNSCC-Zellen *in vitro* nicht von Cetuximab radiosensibilisiert werden [76]. Zusätzlich wurde der Einsatz von Cetuximab auch in einer Phase-3-Studie in HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC untersucht; hierbei ersetzte Cetuximab nicht das Cisplatin sondern wurde zusätzlich zum Cisplatin und der Radiotherapie gegeben. Allerdings zeigte sich auch in dieser Studie kein Vorteil von Cetuximab gegenüber dem alleinigen Einsatz von Cisplatin [77]. Neben dem Einsatz von Cetuximab, bietet die Immuntherapie in HNSCC die einzige weitere Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie; bisher allerdings nicht in Kombination mit Bestrahlung. Seit 2016 werden Inhibitoren der *Programmed-cell-death-1* (PD-1)/*Programmed-cell-death-1-ligand-1* (PDL1) Rezeptoren als Therapie bei HNSCC eingesetzt um eine Immunantwort gegen die Tumoren zu aktivieren. Allerdings sprechen nur 10 % bis 20 % aller HNSCC-Patient:innen auf diese Therapieform an und es gibt derzeit noch keine Möglichkeit diese Patient:innengruppe vor Therapiebeginn zu selektieren [78, 79]. Eine Phase-3-Studie zur Kombination von Immuntherapie und Radiochemotherapie an der fast 700 Patient:innen mit HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC teilnahmen, wurde kürzlich abgebrochen, da sich der kombinierte Therapiearm der alleinigen Radiochemotherapie unterlegen zeigte [80]. Ein weiteres Forschungsgebiet ist der Einsatz von Gold-Nanopartikeln, um den Effekt von Bestrahlung und Chemotherapie zu erhöhen. Erste Ergebnisse sind vielversprechend, doch bisher haben diese noch keinen Einzug in die Klinik gehalten [81, 82].

Auf der Suche einer verbesserten Therapie von HNSCC, wird auch intensiv an potenziellen Tumormarkern geforscht. Diese sollen genutzt werden, um die HNSCC-Patient:innen zu identifizieren, welche von einer Intensivierung oder Deintensivierung profitieren würden oder auf spezifische zielgerichtete Therapie ansprechen würden [51, 83, 84]. Insgesamt beschäftigt sich die Mehrzahl der aktuell meist präklinischen Studien zu zielgerichteten Therapien mit spezifischen Tumoreigenschaften und direkter anti-Tumorstoffwirkung und, trotz der hohen Relevanz der Radiotherapie, nur eine Minderheit der Studien mit einer tumorspezifischen Verstärkung der Strahlenwirkung. Der direkteste Ansatz zur Radiosensibilisierung wäre eine Inhibition der DNA-Reparatur und der DNA-Schadensantwort.

### 1.5.5 Radiosensibilisierung in HNSCC - Duale Inhibition von PARP/Wee1

In dieser Arbeit wurde die Radiosensibilisierung von HNSCC-Tumorzelllinien mittels eines dualen Targeting-Ansatzes untersucht. Es erfolgte die Inhibition der DNA-Reparatur und der Zellzyklus-Kontrollpunkte mittels einer kombinierten Inhibition von PARP und Wee1. Das Enzym PARP ist in der DNA-Reparatur von besonderer Relevanz und die Inhibition von PARP kann zu replikationsassoziierten DSB führen. Der in dieser Arbeit eingesetzte Inhibitor Olaparib ist ein bereits klinisch zugelassener PARP-Inhibitor und wird bei der Behandlung von Eierstockkrebs sowie Brust- und Prostata Tumoren eingesetzt; vor allem, wenn diese bestimmte Mutationen aufweisen, die eine Inhibition der DSB-Reparatur über die HR zur Folge haben [45]. Bisher allerdings noch ohne Bestrahlung. Die Inhibition von Wee1 verhindert die Ausführung der strahleninduzierten Intra-S/G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Kontrollpunkte und erhöht den Replikationsstress in den Zellen. In dieser Arbeit wird der Wee1-Inhibitor Adavosertib verwendet, welcher bereits in aktuellen Studien eingesetzt wird [46, 47, 85]. Weitere Informationen zu den molekularen Wirkungsweisen der Inhibitoren finden sich in Abschnitt 1.4.4.

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Rieckmann wurden bereits erste Vorarbeiten zum Konzept der dualen Inhibition von PARP und dem strahleninduzierten Zellzyklus-Arrest an HPV-positiven HNSCC-Zelllinien durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl die Inhibition des G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Kontrollpunktes [86] als auch die Inhibition von PARP die HNSCC-Zelllinien radiosensibilisieren konnte [76]. Die stärkste Radiosensibilisierung zeigte sich allerdings für die Kombination aus dem PARP-Inhibitor Olaparib und den Chk1-Inhibitor PF-00477736 [76]. Die Mechanismen der Radiosensibilisierung sind damals allerdings nicht im Detail untersucht worden und zudem haben sich die damals verfügbaren Chk1-Inhibitoren in der Klinik unabhängig von der Strahlentherapie als zu toxisch erwiesen. Es folgten weitere Arbeiten, in denen auch für die Kombination aus Chk1- und Wee1-Inhibition eine effektive Radiosensibilisierung HPV-positiver HNSCC-Zelllinien erreicht werden konnte [87]. Für die in den Zelllinien beobachtete Sensibilisierung können verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Es wurde beschrieben, dass HPV-positive HNSCC-Zellen Defekte in den vorrangigen DSB-Reparaturwegen HR oder NHEJ aufweisen und daher auf das PARP-abhängige alt-EJ angewiesen sind [36, 69, 88]. Aufgrund ihrer ineffektiven DSB-Reparatur sind diese Zellen zudem auf einen tiefgreifenden und lang anhaltenden G<sub>2</sub>-Arrest angewiesen, um strahleninduzierte DSB vor dem kritischen Durchgang durch die Mitose zu reparieren [22, 87, 89]. Angesichts der potenziellen, auf der S/G<sub>2</sub>-Phase basierenden Mechanismen und der bestehenden Vorarbeiten, ist es leicht vorstellbar, dass die kombinierte Hemmung von PARP und den S/G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Kontrollpunkten eine besonders wirksame Behandlungsoption für HPV-positive HNSCC-Zellen darstellen könnte. Aber auch in einer Reihe anderer Krebsarten wurde für die kombinierte Inhibition von PARP und Wee1 in präklinischen Studien eine radiosensibilisierende Wirkung nachgewiesen [90–92]. Zwar ist der G<sub>2</sub>-Arrest in HPV-negativen Zelllinien weniger stark ausgeprägt, aber auch in diesen Zellen könnte der Mechanismus der dualen Inhibition wirksam sein, zumal die zu erwartenden Schäden durch PARP-Inhibition in der S- und G<sub>2</sub>-Phase die Notwendigkeit für Zellzyklus-Arrest erhöhen könnten. Die Prognose für Patient:innen mit HPV-negativen HNSCC ist schlecht. Eine effektive Radiosensibilisierung könnte möglicherweise helfen, das Überleben dieser Patient:innengruppe zu verbessern. Zudem vertragen nicht alle Patient:innen die Chemotherapie

mit Cisplatin und die Auswahl alternativer Therapieoptionen ist stark begrenzt [51, 93, 94].

## 1.6 Ziel der Arbeit

Es konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC im Vergleich zu solchen mit HPV-negativen HNSCC besser auf die Strahlentherapie ansprechen und daher eine gute Prognose besitzen [51, 94]. Bereits auf zellulärer Ebene konnte die erhöhte Strahlenempfindlichkeit von HPV-positiven HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden [22]. Die Toxizität der multimodalen Therapie von HNSCC ist allerdings hoch und viele Patient:innen leiden noch Jahre später unter den irreversiblen Nebenwirkungen. Zudem steigt die Anzahl an Menschen mit HPV-positiven HNSCC weiterhin stark an und aufgrund ihres oft relativ jungen Alters sind diese Patient:innen durch die Spätfolgen der Therapie für viele Jahre im Alltag und Beruf eingeschränkt [51, 55, 94]. Die Prognose für Patient:innen mit HPV-negativen HNSCC ist deutlich schlechter, allerdings leiden auch diese Patient:innen unter der hohen Toxizität der Therapie. Eine Deintensivierung der Behandlung ist demnach von großer Dringlichkeit, was durch die hohen Suizid-Raten von Kopf-Hals-Tumorpatient:innen nach abgeschlossener Therapie noch verdeutlicht wird [62]. In vielen Fällen ist eine weitere Optimierung der Bestrahlungsplanung und eine vollständige Schonung der umgebenden Risikoorgane und des Normalgewebes nicht möglich. Eine präzisere Positionierung der Dosis im Zielvolumen, z. B. durch Bestrahlung mit Protonen, ist aufgrund der hohen Kosten für viele Kliniken nicht durchführbar. Um die Behandlung dennoch deintensivieren zu können, werden verschiedene molekulare Ansätze einer zielgerichteten Therapie untersucht. Eine Möglichkeit der Radiosensibilisierung ist die Inhibition der DNA-Reparatur und DNA-Schadensantwort. Indem Komponenten der zellulären DNA-Schadensantwort inhibiert werden, könnten die bereits strahlenempfindlichen HPV-positiven Tumoren weiter radiosensibilisiert werden. Dies könnte eine Option darstellen, die Strahlendosis und die damit einhergehenden Nebenwirkungen zu reduzieren. Die HPV-negativen Tumore sind strahlenresistenter und eine Deintensivierung der Therapie für diese Patient:innen keine Option. Eine Radiosensibilisierung der Tumorzellen würde allerdings eine Intensivierung der Therapie bei Beibehaltung der Strahlendosis ermöglichen und könnte somit zu einer besseren Prognose führen. Zudem gibt es eine relevante Gruppe von Patient:innen, die eine begleitende Chemotherapie nicht vertragen und eine wirksame Alternative benötigen. In der vorliegenden Dissertation wurde eine Inhibition der DNA-Reparatur mittels PARP-Inhibition in Kombination mit einer Inhibition der Zellzyklus-Kontrollpunkte mittels Wee1-Inhibition untersucht, um die strahlentherapeutische Behandlung von Patient:innen mit HNSCC zu verbessern. Das Ziel der dualen Inhibition mit den entsprechenden Inhibitoren Olaparib und Adavosertib ist eine Radiosensibilisierung von HPV-positiven und HPV-negativen Kopf-Hals-Tumorzelllinien. Um die Mechanismen der Radiosensibilisierung zu untersuchen, wurde der Einfluss der dualen Inhibition auf die Proliferation, den Zellzyklus und die Reparatur von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen analysiert.





# 2 Material

## 2.1 Strahlungsquelle und Zubehör

Die Bestrahlung erfolgte in einer Gulmay Röntgenröhre (Gulmay RS225, Gulmay Medical Ltd., Suwanee, GA, USA) mit einer 0.8 mm Be + 0.5 mm Cu-Filterung. Das Spektrum der Röntgenröhre ist in Abbildung A.1 im Anhang dargestellt. Die Dosisrate in Abhängigkeit vom Tischabstand ist in Abbildung A.2 A gezeigt. In der Röntgenröhre ist ein wassergekühlter Röntgenstrahler mit Wolfram-Anode (MXR-225/22) verbaut. Dieser erlaubt die Auswahl zwischen zwei Brennfleckgrößen. In dieser Arbeit wurde eine Brennfleckgröße von 5.5 mm genutzt.

Die Gulmay Röntgenröhre wird einmal im Jahr von einer externen Firma gewartet, dabei werden unter anderem die Kühlung, der Röntgenstrahler und die Filter kontrolliert. Zusätzlich zur jährlichen Kontrolle, wurde die Dosisinhomogenität im Bestrahlungsfeld von Dr. Tobias Gauer aus der Medizinphysik des UKE vermessen. Die Kontrolle erfolgte mit Hilfe eines Film-Dosimeters (GafChromic EBT3, GafChromic™, NJ, USA) und eines Plattenphantoms aus wasseräquivalentem weißem Polystyrol (RW3-Material, Easy Slab, LAP, Lüneburg). Getestet wurden entsprechende Bestrahlungszeiten für eine Dosis von 2 Gy beim Fadenkreuz, für Tischabstände von 230 mm, 272 mm, 335 mm und 433 mm. Die relative Dosisabweichung zur Dosis am Fadenkreuz (Tischmittelpunkt) ist in Abbildung A.2 B als Beispiel für einen Tischabstand von 272 mm gezeigt. Basierend auf diesen Messungen wurden auf einer Kunststoffplatte die Bereiche der 95 % Isodosen markiert.

Eine Eichung der Röntgenröhre erfolgt routinemäßig alle 4 bis 8 Wochen sowie nach Reparaturen oder baulichen Veränderungen. Mit Hilfe einer Ionisationskammer und eines Kontrollpräparates ( $^{90}\text{Sr}$ ,  $d_{1/2} = 28.8$  Jahre) wird dabei die Wasserenergiedosis bestimmt. Diese entspricht in etwa der Dosis, die auch Zellen in einer Zellkulturflasche erhalten. Kommt es zu Abweichungen zwischen Soll- und Ist-Dosis, kann es notwendig sein, die Tischabstände bezüglich der Dosisraten anzupassen.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien

In der vorliegenden Dissertation wurde mit sechs humanen strahlenempfindlichen HPV-positiven Zelllinien (UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154, UPCI-SCC-90, 93-VU-147T, UT-SCC-45) und drei humanen radioresistenten HPV-negativen Zelllinien (HSC4, SAS, UT-SCC-60A) gearbeitet. Eine Übersicht zu Ursprungsort und Herkunft der Zelllinien findet sich in der nachfolgenden Tabelle.

Zelllinie	Ursprungsort	Herkunft
UD-SCC-2	Hypopharynx	Prof. Thomas Hoffmann, Universität Düsseldorf, Deutschland
UM-SCC- 47	Zunge, lateral	Prof. Thomay Carey, Universität Michigan, USA
UPCI-SCC-154	Oropharynx/Mundhöhle (Zunge)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ)
UPCI-SCC-90	Oropharynx	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ)
93-VU-147T	Mundhöhle (Mundboden)	Prof. Johann de Winter, Universität Amsterdam, Niederlande
UT-SCC-45	Mundhöhle (Mundboden)	Prof. Reidar Grenman, Universität Turku, Finnland
HSC4	Zunge	Prof. Michael Baumann, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
SAS	Zunge	Prof. Michael Baumann, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
UT-SCC-60A	Tonsille	Prof. Reidar Grenman, Universität Turku, Finnland

### 2.2.2 Tumormaterial

In Ergänzung zu den Versuchen in den Zelllinien wurde in dieser Dissertation mit *ex vivo* Gewebeschnitten gearbeitet. Für diese Gewebeschnitte wurde frisches Tumormaterial von Patient:innen mit Oropharynxkarzinom (OPSCC) verwendet, die am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt wurden. Die Probenentnahme erfolgte während eines chirurgischen Eingriffs oder einer Panendoskopie mit der Methode des scharfen Schneidens, um Scherkräfte am Gewebe zu minimieren. Anschließend wurde das Material zum Transport in steriles *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) überführt und in der Regel spätestens 30 min nach der Entnahme mit der Aufbereitung des Tumormaterials begonnen. Die Probenentnahme und Verarbeitung erfolgten in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes und den Richtlinien für Versuche am Menschen der Landesärztekammer Hamburg. Alle Patient:innen erteilten die schriftliche Einwilligung, dass das ihnen entnommene Gewebe für Forschungszwecke verwendet werden darf. Die Entnahme von Kopf-Hals-Tumorgewebe im Rahmen der HNO-Biobank wurde dem Hamburgischen Beauftragten für Datenschutz und Informationsfreiheit (HmbBfDI) gemäß den Gesetzen (§12 HmbKHG) angezeigt. Die Auswertung der klinischen Daten wurde durch eine Patient:inneneinwilligung und durch lokale Gesetze (§7, §8, §12 HmbKHG) genehmigt. HPV- und p16-Status der Tumore wurden im Rahmen der klinischen Routinecharakterisierung

mittels E6- und E7-Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte sowie durch immunhistochemische Färbung für p16 untersucht. Die Verarbeitung der *ex vivo* Gewebeschnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Henrike Zech [95].

### 2.2.3 Medien in der Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Amniomax	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Amphotericin B	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>EmbryoMax Nucleosides</i> (100x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fötales Rinderserum Superior (FBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primäre Antikörper

#### In Zellkultur

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
Anti-Geminin	Kaninchen	polyklonal	1 : 3000	Invitrogen, Waltham, MA, USA; #10802-1-AP
Anti-phospho-Histone H3 (p-H3)	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	Merck KGaA, Darmstadt; #06-570
Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139)	Maus	monoklonal	1 : 1000	ProteinTech Group, Inc, Rosemont, IL, USA; #05-636-I; Klon JBW301
anti-53BP1	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; #NB100-305
anti-53BP1	Maus	monoklonal	1 : 750	Merck KGaA, Darmstadt; #612522; Klon 19/53BP1

#### In *ex vivo* Gewebekultur

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139)	Maus	monoklonal	1 : 500	ProteinTech Group, Inc, Rosemont, IL, USA; #05-636-I; Klon JBW301
anti-p63 [4A4]	Maus	monoklonal	1 : 500	abcam, Boston, MA, USA; #ab735; Klon [4A4]
anti-53BP1	Kaninchen	polyklonal	1 : 500	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; #NB100-305

## 2.3.2 Sekundäre Antikörper

### In Zellkultur

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 594 <i>goat-anti-mouse</i>	Ziege	polyklonal	1 : 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #A11005
Alexa Fluor® 488 <i>goat-anti-rabbit</i>	Ziege	polyklonal	1 : 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #4412
DyLight® 488 <i>goat-anti-mouse</i>	Ziege	polyklonal	1 : 1000	Jackson ImmunoResearch, Philadelphia, PA, USA; #115-545-146

### In *ex vivo* Gewebekultur

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 594 <i>goat-anti-mouse</i>	Ziege	polyklonal	1 : 500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #A11005
Alexa Fluor® 488 <i>goat-anti-rabbit</i>	Ziege	polyklonal	1 : 500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #4412

## 2.4 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

### 2.4.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton ( <i>Chemsolute</i> )	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Hamburg
Adavosertib (AZD1775, MK-1775)	Selleckchem, Houston, TX, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coulter Isoton™ II Lösung	Beckman Coulter™, Brea, CA, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 2 Material

EdU-Click 488	baseclick GmbH, Neuried
Ethanol ( <i>Chemsolute</i> )	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Hamburg
Ethanol ( <i>absolute for analysis</i> )	Merck KGaA, Darmstadt
Immersionsöl ( <i>Immersol</i> <sup>TM</sup> )	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kristallviolett ( <i>Certistain</i> <sup>®</sup> )	Merck KGaA, Darmstadt
<i>MACS Quant Storage Solution</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>MACS Quant Running Buffer</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>MACS Bleach Solution</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Olaparib (AZD2281, Ku-0059436)	MyBiosource, San Diego, CA, USA
Para-Formaldehyd, in PBS pH 7.4	Morphisto GmbH, Offenbach am Main
Saccharose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tissue-Tek <sup>®</sup>	Sakura Finetek Europe HQ, Niederlande
Triton <sup>TM</sup> X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vectashield ( <i>Antifade-Mounting-Medium</i> )	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

---

### 2.4.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockier-/Permeabilisierungslösung	1 % BSA + 0.2 % Triton X-100 in PBS
Waschpuffer	0.5 % BSA + 0.1 % Triton X-100 in PBS
Blockierlösung <i>ex vivo</i> (IF)	3 % BSA in PBS
Permeabilisierung <i>ex vivo</i> (IF)	1 % SDS in PBS
Waschpuffer <i>ex vivo</i> (IF)	0.5 % Tween20 in PBS
Saccharose 20 %	20 % Saccharose in PBS

---

## 2.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser ( $\varnothing 15$ mm)	Epredia, Portsmouth, NH, USA
Deckgläser (24×60 mm)	Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse)
Filtergewebe ( <i>Gaze</i> )	Sefar AG, Heiden, Schweiz
Kryoröhrchen ( <i>CryoPure</i> )	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Membranen ( <i>Millicell</i> ®)	Merck KGaA, Darmstadt
Nitril-Handschuhe, Gr. S	Ansell, Brüssel, Belgien
Objektträger ( <i>Superfrost</i> )	Epredia, Portsmouth, NH, USA
Pipettenspitzen 0.5 $\mu$ l bis 10 $\mu$ l	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 $\mu$ l bis 100 $\mu$ l	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 100 $\mu$ l bis 1000 $\mu$ l	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1.5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Röhre 15 ml ( <i>Cellstar</i> ®)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röhre 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten 2 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten 10 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten 50 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Skalpell, Fig.10	B. Braun Aesculap®, Tuttlingen
Zellkulturflaschen T25	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T75	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T175	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturplatte 6-wells	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturplatte 12-wells	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

## 2.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gewebezerhacker ( <i>Tissue Chopper</i> )	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Kryostat ( <i>Microm HM550</i> )	Epredia, Portsmouth, NH, USA
Durchflusszytometer (MACSQuant Analyzer 10)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop ( <i>Observer.Z1</i> )	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Pipette 0.5 µl bis 10 µl	Eppendorf SE, Hamburg
Pipette 10 µl bis 100 µl	Eppendorf SE, Hamburg
Pipette 100 µl bis 1000 µl	Eppendorf SE, Hamburg
Röntgenröhre ( <i>RS225</i> )	Gulmay Limited, Byfleet, UK
Rolltisch ( <i>RS-TRD5</i> )	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
sterile Sicherheitswerkbank ( <i>Hera safe</i> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Waage ( <i>Precision Balance</i> )	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Zellzähler (Coulter Counter)	Beckmann-Coulter™, Brea, CA, USA
Zentrifuge ( <i>Centrifuge 5425</i> )	Eppendorf SE, Hamburg
Zentrifuge ( <i>Mega Star 3.0R</i> )	VWR International, Radnor, PA, USA

## 2.7 Software

Programm	Entwicklung
Axio-Vision Rel. 4.9	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Flow Logic 7.2.1	Inivai Technologies Pty. Ltd., Australien
GraphPad Prism 6, Version 6.07	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
ImageJ 1.53k [96]	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
MACSQuantify™ Software	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
ModFit LT, Version 3.2	Verity Software House, Inc., Topsham, ME, USA
R, Version 3.6.3 [97]	The R Core Team, Österreich



# 3 Methoden

## 3.1 Bestrahlung mit Röntgenstrahlung

Die Zellen und die *ex vivo* Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur (RT) mit einer Röntgenröhre (Gulmay RS225, Gulmay Medical Ltd., Suwanee, GA, USA) bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte bei 200 kV und 15 mA mit einer Dosisleistung von 2 Gy/min. Die Dosisleistung kann dabei über den Tischabstand eingestellt werden. Im Bestrahlungsfeld der Röhre liegt eine Kunststoffplatte, auf der die 95 % Isodosen eingezeichnet sind. Innerhalb dieser Bereiche befindet sich ein sehr homogenes Strahlungsfeld mit weniger als 5 % Dosisabweichung (s. Abbildung A.2 B). Das Intensitätsmaximum der eingesetzten 200 keV Röntgenstrahlung liegt bei etwa 60 keV bis 70 keV (s. Abbildung A.1); in diesem Bereich stellt der Photoeffekt die dominierende Wechselwirkung dar. Aufgrund der Abhängigkeit des Photoeffekts von der Ordnungszahl führt das Einbringen von Deckgläsern aus Glas ( $Z = 14$ ) zu einer erhöhten Anzahl von Sekundärelektronen (vgl. Abhängigkeit in Gleichung 1.7). In der Literatur konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl residueller Reparaturfoci bei 80 keV Photonenstrahlung im Vergleich zu auf Kunststoff wachsenden Zellen durch diesen Effekt verdoppeln kann [98]. Mit steigender Energie der Photonen reduzierte sich der Einfluss der Deckgläser wieder deutlich. Die Analyse residueller Reparaturfoci erfolgte in dieser Arbeit entweder in Zellen, die auf Deckgläsern wuchsen oder in *ex vivo* Gewebeschnitten, die auf sich auf Membranen befanden. Es fand kein quantitativer Vergleich zwischen den beiden Systemen statt. Zudem konnten in der Literatur keine Veränderungen in der Reparaturkinetik gezeigt werden [98]. Es ist daher davon auszugehen, dass dieser Effekt für die Analyse der residuellen Reparaturfoci in der vorliegenden Arbeit nicht von Bedeutung ist.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen oder 6-well Platten aus Polystyrol ( $C_8H_8$ , PS). Der Deckel und die Oberseite der Flaschen haben etwa eine Stärke von 1 mm bis 2 mm. Die Zellen sind mit Medium bedeckt, während die *ex vivo* Gewebeschnitte direkt an die Luft grenzen. Polystyrol hat eine Dichte von  $1.060 \text{ g/cm}^3$  und weist ein ähnliches Streu- und Absorptionsverhalten auf wie Wasser. Daher wird es auch als Material wasseräquivalenter Phantome genutzt [1]. Bei Eichung der Röntgenröhre wird mittels Ionisationskammer die Wasserenergiedosis bestimmt, Beeinflussungen der Strahlendosis durch die Zellkulturflasche und das Medium können somit vernachlässigt werden.

Die *ex vivo* Gewebeschnitte haben eine Dicke von  $300 \mu\text{m}$ , die Abnahme der Dosisrate bei Durchgang durch das Gewebe kann vereinfacht über das Lambert-Beersche-Gesetz (Gleichung 1.4) abgeschätzt werden. Unter der Annahme, dass der Massenschwächungskoeffizient und die Dichte des Tumorgewebes etwa dem von Weichteilgewebe bei 200 keV entsprechen ( $\mu/\rho = 2.936 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{g}$ ,  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$  [1]), ergibt sich bei Durchgang der Röntgenstrahlung in den Gewebeschnitten eine Reduktion der Dosisrate um etwa 0.01 %. Demnach erhalten fast alle Bereiche der *ex vivo* Gewebeschnitte die gleiche Dosis. Werden die fixierten Gewebeschnitte am Kryostaten geschnitten, ist es in Bezug auf die im Gewebe deponierte Dosis daher nicht von Bedeutung, ob es sich um die Membran- oder die Luft-zugewandte Seite der Gewebeschnitte handelt. Allerdings kann aufgrund der ausgeprägten Inhomogenität des Tumorgewebes nicht davon ausgegangen werden, dass der Massenschwächungskoeffizient

innerhalb des Gewebes konstant ist. In knorpeligen Tumorbereichen kommt es sehr wahrscheinlich zu einer stärkeren Abschwächung und Streuung. Die Abweichungen der Dosisrate aufgrund dieser biologischen Schwankungen lassen sich nur in begrenztem Maße abschätzen und unterscheiden sich zwischen den einzelnen Gewebeschnitten.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Die Arbeit in der Zellkultur erfolgte unter einer sterilen Sicherheitswerkbank. Sowohl bei den HPV-positiven (UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154, UPCI-SCC-90, 93-VU-147T, UT-SCC-45), als auch bei den HPV-negativen Zelllinien (HSC4, SAS, UT-SCC-60A) handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. Informationen zu HPV-Status und Herkunft der Zelllinien finden sich in Tabelle 2.2.1. Die Kultivierung in Zellkulturflaschen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI Zellkulturmedium) im Brutschrank. Dem RPMI-Medium wurden 10 % fötales Rinderserum (FBS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S) zugesetzt. Im Verlauf dieser Arbeit wird für diese Mediums-Zusammensetzung zur Vereinfachung des Leseflusses nur noch die Bezeichnung *Medium* verwendet. Ein Umsetzen der Zellen erfolgte in der Regel alle 3–5 Tage. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gespült. Um die Zellen abzulösen, erfolgte die Zugabe von Trypsin und die Zellen wurden bei 37 °C für 5 min bis 10 min inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Flasche gelöst haben. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion durch Zugabe des Mediums gestoppt und die Zellen in Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde verdünnt und in frischen Zellkulturflaschen für Versuche oder zur weiteren Kultivierung ausgelegt. Alternativ können die auf diese Weise geernteten Zellen nachfolgend auch für die Messung der jeweiligen Versuchsendpunkte eingesetzt werden. Je nach Verdopplungszeit der Zelllinie wurden unterschiedliche Zellzahlen für die Versuche ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in isotonischer Lösung (*Coulter Isoton II Lösung*) mit Hilfe eines Beckmann-Coulter-Zählers. Die in den Versuchen ausgesäten Zellzahlen finden sich in Tabelle A.1 im Anhang.

### Behandlung der Zelllinien

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die PARP-Inhibition mit 1 µM Olaparib, die Wee1-Inhibition mit 240 nM Adavosertib und die duale Inhibition mit Olaparib und Adavosertib (Ola/Ada) in den gleichen Konzentrationen. Die Inhibitoren sind in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, daher erfolgte die Behandlung der negativen Kontrolle (Mock-Behandlung) ebenfalls mit DMSO. Die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren basieren auf Vorarbeiten [22, 87, 99]. Bei den Versuchen mit Nukleosid-Zugabe erfolgte die Supplementierung mit Nukleosiden (*EmbryoMax Nucleosides* (100x)) in einem Verhältnis von 1 : 12.5 zeitgleich zur Inhibitorbehandlung.

In den HPV-positiven Zelllinien wurden die Zellen zusätzlich zur Nukleosid-Zugabe noch mit Ethinyldesoxyuridin (EdU) behandelt, um die proliferierenden S-Phase-Zellen zu markieren. Dabei zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Zugabe von Nukleosiden und EdU keine

Färbung mit dem EdU-*baseclick* Kit möglich war. Die Ursache dafür könnte sein, dass es sich bei EdU um ein Thymidin-Analogon handelt, wodurch es zur Wechselwirkung mit den zugegebenen Nucleosiden gekommen ist. Um dies zu vermeiden, erfolgten die Behandlung mit EdU und die Zugabe der Nucleoside nacheinander. Zuerst wurde 1 ml des Mediums aus den *wells* abgenommen und in einem sterilen 15 ml Röhrchen aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Zugabe von EdU im Verhältnis von 1 : 10 000 zu dem 1 ml Medium, welches sich noch im *well* befand. Nach 30 min wurde das EdU-behandelte Medium abgesaugt und der Zellrasen vier Mal mit PBS gespült. Das vor der Behandlung abgenommene Medium (1 ml) wurde wieder auf die Zellen gegeben und Nucleoside im Verhältnis 1 : 12.5 hinzugegeben. Die Bestrahlung mit 0 Gy und 2 Gy erfolgte 30 min nach Nucleosid-Zugabe.

### 3.2.2 Proliferation

Um den Einfluss der Inhibitorbehandlung auf das Wachstum der Zelllinien zu untersuchen, wurden Wachstumskurven erstellt. Dafür wurden die Zellen mit 4 ml Medium in T25er-Zellkulturflaschen ausgesät und 4 h später mit den Inhibitoren (1  $\mu$ M Olaparib, 240 nM Adavosertib oder der Kombination Ola/Ada) behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte an Tag eins, Tag drei und Tag fünf in isotonischer Lösung (Coulter Isoton II Lösung) mit Hilfe eines Beckmann-Coulter-Zählers.

Die Untersuchung des Zellwachstums unter Nucleosid-Einfluss erfolgte analog. Die Nucleoside wurden dafür 4 h nach Aussaat im Verhältnis 1 : 12.5 zu den Zellen gegeben.

### 3.2.3 Koloniebildungstest

Die Radiosensibilisierung der Zelllinien durch die Kombination aus Inhibitorbehandlung und anschließender Bestrahlung, wurde im *delayed-plating* Koloniebildungstest untersucht. Koloniebildungstests gelten als Goldstandard, um das klonogene Überleben von Zelllinien zu bestimmen. Dieses beschreibt das Langzeitüberleben und die Fähigkeit der Zellen sich unbegrenzt zu teilen [14, 100]. Für den *delayed-plating* Koloniebildungstest wurden exponentiell wachsende Zellen mit den Inhibitoren behandelt und nach 2 h Inkubationszeit mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy bestrahlt<sup>1</sup>. Die Zellen wurden 24 h nach Bestrahlung in dünn definierter Zellzahl in T25er-Zellkulturflaschen oder 6-*wells* ohne erneute Zugabe von Inhibitoren in frischem Medium ausgesät. Bei diesem Ansatz erfolgt die wesentliche DNA-Reparatur unter den normalen Wachstumsbedingungen und normaler Zelldichte, während die Zellen beim sogenannten *pre-plating* zuerst in dünner Zellzahl vereinzelt ausgesät werden und die DNA-Reparatur nach Bestrahlung im Wesentlichen ohne direkte Zell-Zell-Kontakte stattfindet. Die ausgelegten Zellzahlen sind von der Verdopplungszeit der Zelllinie abhängig und finden sich in in Tabelle A.2 im Anhang. Zusätzlich zur Radiosensibilisierung unter dualer Inhibition, wurde auch der Einfluss der Nucleosid-Zugabe auf das Zellüberleben untersucht. Dabei erfolgte die Nucleosid-Supplementierung zeitgleich mit der Inhibitor-Zugabe.

Es ist bekannt, dass die Kooperation zwischen den Zellen (*cell-cell-cooperation*) im Koloniebildungstest relevant sein kann und zu geringe Zellzahldichten die Ergebnisse verfälschen

<sup>1</sup>Die Bestrahlung der UT-SCC-45, UPCI-SCC-90 und der 93-VU-147T erfolgte mit 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy.

können [100]. Sogenannte *Feederzellen* bieten eine Möglichkeit, diesen Effekt zum Teil auszugleichen. Um die *Feederzellen* zu erhalten, wurden unbehandelte Zellen mit 20 Gy letal bestrahlt. Die Lebensdauer dieser bestrahlten Zellen ist begrenzt, allerdings geben sie bis zu ihrem Tod Wachstumsfaktoren ab und unterstützen so die Proliferation der unbestrahlten Zellen. Die *Feederzellen* sterben im Laufe der Inkubationszeit ab und bilden keine Kolonien. Besonders UM-SCC-47 Zellen zeigen eine niedrige Ausplattierungseffizienz bei geringen Zellzahlen, jedoch sind aufgrund der hohen Strahlenempfindlichkeit für die behandelten Proben hohe Zellzahlen nötig. Daher wurde hier die Zellzahl für alle Proben durch Zugabe von *Feederzellen* auf ungefähr 10 000 eingestellt, um die Ausplattierungseffizienz zu unterstützen. Bei den besonders langsam proliferierenden UPCI-SCC-154 wurde das Medium drei Wochen nach der Aussaat auf eine 1 : 1-Mischung aus RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S und Amniomax C-100 Medium + 7.5 % Amniomax Supplement + 7.5 % FBS umgestellt, um die Koloniebildung zu erleichtern. Die Inkubation der ausgelegten Koloniebildungstests erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Zeit bis zur Koloniebildung variierte zwischen den Zelllinien von 2 bis 4 Wochen; bestrahlte Proben der Zelllinien verblieben länger im Brutschrank, da die Koloniebildung im Vergleich zu den unbehandelten Proben erkennbar verzögert war. Bei ausreichender Koloniegröße erfolgte die Fixation der Zellen, indem das Medium abgesaugt und die Zellen mit 70 %-igen Ethanol fixiert wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von Kristallviolett, um die Kolonien anzufärben. Nach 5 min wurde das Kristallviolett abgenommen und die Zellkulturplatten mit Leitungswasser gespült und über Nacht getrocknet. Zur Analyse des Zellüberlebens wurde die Anzahl der Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt. Zudem wurde die Ausplattierungseffizienz (*plating efficiency*, PE) anhand der Formel 3.1 bestimmt. Die PE beschreibt das Verhältnis der Anzahl (#) der entstandenen Kolonien zu den ausgesäten Einzelzellen und berechnet sich über:

$$PE = \frac{\# \text{ der entstandenen Kolonien}}{\# \text{ ausgesäte Zellen}} \cdot 100 \% \quad (3.1)$$

Aus der Anzahl der Kolonien im Verhältnis zur ausgesäten Zellzahl, lässt sich die Überlebensrate (*survival fraction*, SF) der Zellen nach Bestrahlung berechnen [101]:

$$SF = \frac{\# \text{ der entstandenen Kolonien nach Bestrahlung}}{\# \text{ ausgesäte Zellen} \cdot PE} \quad (3.2)$$

Zur Bestimmung der Überlebensrate wird die Anzahl der Kolonien nach Bestrahlung verwendet, zudem erfolgte eine Normierung der einzelnen Dosispunkte auf die PE der unbestrahlten Zellen.

### 3.3 Kultivierung der *ex vivo* Gewebeschnitte

Die Kultivierung der *ex vivo* Gewebeschnitte erfolgte weitestgehend nach der von Köcher et al. für Gewebe der Prostata [102] und der von Berger et al. für HNSCC [103] beschriebenen Methode. Die frischen Tumorproben wurden bei ausreichender Materialmenge zunächst mit einem Skalpell grob geteilt und dann mit dem *Tissue Chopper* in 400 µm dünne Scheiben geschnitten. In einigen Fällen lies die Textur des Tumors oder ein Mangel an Material ein

maschinelles Schneiden nicht zu. In diesen Fällen wurden die Proben manuell mit einem scharfen Skalpell in dünne Scheiben geschnitten.

Zur Kultivierung der Schnitte wurden die *wells* einer 6-*well* Platte mit jeweils 1.4 ml DMEM, dem 10 % hitzeinaktiviertes (30 min bei 56 °C) FBS, 1 % P/S und 1 % Amphotericin B zugesetzt wurden, befüllt und die Millicell®-Membranen (0.4 µm, Ø30 mm) hineingelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich unter den Membranen keine Luftblasen befinden. Auf diesen Membranen wurden jeweils 2 bis 4 Gewebeschnitte kultiviert. Die wichtigsten Schritte in der Verarbeitung der Tumorstücke sind in einer Abbildung im Anhang gezeigt A.3. Die Inkubation der Gewebeschnitte erfolgte so für 24 h an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert, um sich zu erholen und zu reoxygenieren. Am folgenden Tag erfolgte die Behandlung mit Inhibitoren (DMSO, 240 nM Adavosertib, 1 µM Olaparib, Ola/Ada) und 2 h später die Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy. Die Gewebeschnitte wurden 2 h, bzw. 24 h nach Bestrahlung für 1 h in 4 % Formaldehyd in PBS gelegt, um sie zu fixieren. Anschließend wurden die Tumorproben zweimal 1 h mit PBS + 20 % Saccharose gewaschen und dann in Einbettmedium (Tissue-Tek) eingebettet und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert. Proben, die nicht innerhalb von zwei Wochen weiterverarbeitet werden konnten, wurden bei -80 °C eingefroren.

### 3.4 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen ermöglichen die quantitative Analyse der molekularen Eigenschaften von Zellen. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeführt und die Streuung des Anregungslichtes und das emittierte Fluoreszenzlicht gemessen [14]. Das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht (*forward scatter*, FSC) erlaubt Rückschlüsse auf die Größe der Zellen, während das im rechten Winkel seitwärtsgestreute Licht (*side scatter*, SSC) als Maß für die Granularität der Zellen herangezogen wird. Darüber hinaus ist es möglich, spezifische Proteine mit Fluoreszenzmolekülen zu markieren und die relative Proteinfärbeintensität pro Zelle in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase zu bestimmen [14]. Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte die Messung mit dem Durchflusszytometer MACSQuant10 mit MACSQuantify Software und die Analyse in der Flow Logic Software (Inivai Technologies Pty. Ltd.).

In der vorliegenden Arbeit wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als Kerngegenfärbung verwendet. DAPI färbt den Zellkern an, indem es sich in die DNA einlagert und hat sein Emissionsmaximum bei 461 nm (Filter 405/50 nm) [104]. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor 488 (Filter 525/50 nm) verwendet. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit Lasern mit Wellenlängen von 405 nm und 488 nm. Anregungs- und Emissionsspektren der Farbstoffe sowie das diskrete Spektrum der anregenden Laser, sind in Abbildung A.4 im Anhang gezeigt. In dieser Arbeit wurde mit den Antikörpern gegen phospho-Histon H3 (p-H3) und  $\gamma$ H2AX gearbeitet und diese jeweils mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 detektiert. Alle Proben wurden vor der Messung im Durchflusszytometer durch Filtergewebe (*Gaze*) filtriert, um die Zellen zu vereinzeln und ein Verstopfen des Durchflusszytometers zu vermeiden. Bis zur Messung wurden die Proben dunkel und auf Eis gelagert.

Im folgenden Abschnitt wird häufig vom „Waschen der Zellen“ gesprochen. Ein Waschschritt umfasst: das Zellpellet in PBS (Waschpuffer) mit 0.5 % Bovinem Serum Albumin

### 3 Methoden

(BSA) + 0.1 % Triton X-100 resuspendieren, zentrifugieren (5 min bei 800 g), den Überstand abnehmen.

#### 3.4.1 Zellzyklusanalyse

Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen in 6-*well* Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit Inhibitoren und 2 h später die Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy. Die HPV-negativen Zelllinien wurden 12 h, die HPV-positiven 24 h nach Bestrahlung geerntet und in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach der Zentrifugation (5 min bei 300 g) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 70 %-igem eiskaltem Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Waschpuffer gewaschen und mit 1 % BSA + 0.2 % Triton X-100 in PBS (Blockierlösung) + DAPI (1 ng/ml) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut einmal mit Waschpuffer gewaschen und nun in 300 µl PBS resuspendiert. Der Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen wurde mit der Software ModFit LT™ mit Hilfe der Funktion *Sync Wizard* berechnet.

#### 3.4.2 Quantifizierung fluoreszierender Marker: $\gamma$ H2AX und p-H3

Zur Quantifizierung des Replikationsstressmarkers  $\gamma$ H2AX und des Mitosemarkers p-H3 wurden die Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert. Da die Phosphorylierung des Histon H3 nur in der Mitose stattfindet, erlaubt der Einsatz des phospho-Histon H3 Antikörpers eine Anfärbung der mitotischen Zellen. Der Anstieg von  $\gamma$ H2AX wird als Maß für Replikationsstress verwendet (vgl. Abschnitt 1.4). Dafür wurden die Zellen in T25er Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit den Inhibitoren und 2 h später die Bestrahlung. Die Fixation der Zellen mit PBS + 4 % Formaldehyd (für 10 min) erfolgte 5 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und 6 Gy für die Untersuchung der mitotischen Zellen und 24 h nach Bestrahlung 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy bei Analyse des Replikationsstressmarkers  $\gamma$ H2AX.

Zusätzlich zum Replikationsstress unter dualer Inhibition wurde die Reduktion des Anteils an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellen nach Supplementierung von Nukleosiden untersucht. Dafür erfolgte die Nukleosid-Zugabe gleichzeitig mit der Inhibitorbehandlung. Fixiert wurden die Zellen 4 h nach Inhibitor- und Nukleosid-Behandlung mit PBS + 4 % Formaldehyd.

Nach der Fixation wurden die Zellen mindestens 30 min bei RT (oder alternativ über Nacht bei 4°C) in Blockierlösung blockiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Markierung mit den spezifischen primären Antikörper ( $\gamma$ H2AX bzw. p-H3). Dafür wurden die Zellen für 1 h mit dem primären Antikörper (1:1000) in Blockierlösung bei RT auf dem Rollbrett inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Danach wurden die Proben mit dem sekundären Antikörper (1:1000) für 1 h bei RT auf dem Rollbrett inkubiert. Die DNA-Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (1 ng/ml), das dem sekundären Antikörper zugesetzt wurde. Dann wurden die Proben erneut drei Mal gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in 300 µl PBS resuspendiert.

### 3.4.3 Analyse der Messdaten aus der Durchflusszytometrie in der FlowLogic Software

Die Quantifizierung der Färbeintensität der  $\gamma$ H2AX-Färbung und des Anteils an p-H3-positiven Zellen erfolgte in der FlowLogic Software. Die Messdaten aus dem Durchflusszytometer wurden im *.mqd*-Format in die Software geladen. In der Software wurden die jeweils relevanten Messparameter (SSC, FSC, Fluoreszenzkanal FITC) ausgewählt und die Populationen der  $\gamma$ H2AX und p-H3-positiven Zellen *gated*. Zusätzlich konnten der Mittelwert und der Median der Färbeintensität ausgegeben werden. Die Angabe der Signalintensität erfolgt dabei in willkürlichen Einheiten (*arbitrary units*). In der Regel wurde mit dem Median der Signalintensität gearbeitet, da dieser weniger stark von Ausreißern beeinflusst wird.

## 3.5 Immunfluoreszenz - Analyse residueller Doppelstrangbrüche

Wie auch in der Durchflusszytometrie werden in der Immunfluoreszenz (IF) Proteine mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt. Die Verschiebung von Anregungs- und Emissionmaximum (Stokes-Verschiebung) der Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt die hochauflösende Darstellung mikroskopischer Strukturen [105]. Im Anhang sind die Spektren von drei Fluoreszenzfarbstoffen, die in dieser Arbeit genutzt wurden dargestellt (Abbildung A.5). Die IF kann genutzt werden, um noch nicht reparierte DSB sichtbar zu machen oder Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen zu markieren. Nach der Bildung von DSB kommt es zur Akkumulation von DNA-Reparaturproteinen an der Bruchstelle. Werden diese mit fluoreszierenden Antikörpern sichtbar gemacht, erscheinen sie unter dem Mikroskop als leuchtender Focus. Diese Foci werden als DNA-Reparaturfoci bezeichnet und erlauben eine direkte Quantifizierung von Strahlenschäden [29]. In dieser Arbeit erfolgte die Markierung der DNA-Reparaturproteine  $\gamma$ H2AX und des p53 *binding protein* 1 (53BP1). Zusätzlich zu seiner Funktion als Marker für Replikationsstress, wird  $\gamma$ H2AX von den Zellen für die Markierung von DSB genutzt. Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, wird H2AX zu Beginn der DNA-Reparatur am Ort des DSB zu  $\gamma$ H2AX phosphoryliert. An das  $\gamma$ H2AX lagern sich nun weitere Proteine der DNA-Schadensantwort an, wie beispielsweise 53BP1. Es ist bekannt, dass 53BP1 Foci zuverlässig mit  $\gamma$ H2AX Foci kolokalisieren [29]. Es ist also möglich, 53BP1 Foci alleine oder kolokalisiert mit  $\gamma$ H2AX zu verwenden. Ein Anstieg der Anzahl residueller DNA-Reparaturfoci deutet auf eine höhere Zahl nicht-reparierter DSB hin. Die Auszählung der Reparaturfoci ermöglicht so eine Quantifizierung der nicht-reparierten DSB und kann als Maß für die Radiosensibilisierung herangezogen werden [17]. In den HPV-positiven Zelllinien wurde zusätzlich zur Anfärbung der Reparaturfoci die Verteilung der 53BP1 Foci in den verschiedenen Zellzyklusphasen untersucht. Da das Protein Geminin nur in S- und G<sub>2</sub>-Phase-Zellen exprimiert wird, wurde ein anti-Geminin-Antikörper genutzt, um Zellen in der G<sub>1</sub>- von Zellen in der S/G<sub>2</sub>-Phase unterscheiden zu können [106].

Auch bei Beschreibung der IF-Färbung wird der Begriff des „Waschens“ verwendet. Hierbei bedeutet dieser Begriff, dass 1 ml Waschlösung auf die Deckgläser gegeben wird, die Zellkulturplatten 5 min auf dem Schüttler bewegt werden und dann der Waschlösung abgenommen wird.

#### 3.5.1 Immunfluoreszenz in Zellkultur

Auf die Böden der *wells* einer 12-*well* Platte wurden Deckgläser ( $\varnothing$  15 mm) gelegt und mit 1 ml Medium bedeckt. Je *well* wurde die gewünschte Zellzahl (vgl. Tabelle A.1 im Anhang) ausgesät und die Zellen für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inhibitorbehandlung 2 h vor Bestrahlung mit 0 Gy und 2 Gy. Die Fixation mit PBS + 4 % Formaldehyd für 10 min wurde 24 h nach Bestrahlung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen 30 min lang bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit Blockierlösung blockiert und permeabilisiert. Für die darauf folgende Färbung wurden die Zellen 1 h lang bei Raumtemperatur mit den jeweiligen primären Antikörpern (53BP1,  $\gamma$ H2AX, Geminin) in Blockierlösung inkubiert und dann vier Mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern und DAPI (1 ng/ml) für 1 h. Erneut wurden die Proben viermal mit Waschpuffer gewaschen. Im Falle einer EdU-Behandlung (s. Abschnitt 3.2.1) erfolgte die Färbung mit dem EdU-baseclick-Kit nach Anleitung des Herstellers im Anschluss an die IF-Färbung. Abschließend wurden die Deckgläser mit Vectashield-Mountingmedium auf einem Objektträger eingebettet und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Bis zur Messung lagerten die Proben dunkel bei 4 °C.

#### 3.5.2 Immunfluoreszenz in *ex vivo* Gewebeschnitten

Auch in den *ex vivo* Gewebeschnitten erfolgte die Analyse residueller Reparaturfoci. Zusätzlich zur Färbung der 53BP1 Foci wurde der für HNSCC etablierte Tumormarker p63 genutzt, um die Tumorzellen vom Normalgewebe unterscheiden zu können [107, 108]. Für die IF-Färbung wurden aus dem in TissueTek eingelagertem Material Kryoschnitte von 5  $\mu$ m Dicke am Kryostat (Microm HM550) hergestellt. Die Objektträger mit den Kryoschnitten wurden kurzzeitig bei -20 °C gelagert. Vor Beginn der IF-Färbung lagerten die Kryoschnitte für 10 min in Aceton, wurden 10 min in PBS gewaschen, dann für 1 h mit PBS + 1 % SDS permeabilisiert und über Nacht bei 4 °C mit PBS + 3 % BSA (*ex vivo* Blockierlösung) blockiert. Anschließend wurden die Schnitte 1 h bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern in PBS + 1 % BSA + 0,1 % Tween20 inkubiert und viermal mit PBS + 0,1 % Tween20 (Waschpuffer) gewaschen, bevor sie mit den sekundären Antikörpern für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen wurden. Die DNA-Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (10 ng/ml), das dem sekundären Antikörper zugesetzt wurde. Die Objektträger mit den gefärbten Gewebeschnitten wurden in Vectashield-Mountingmedium eingebettet und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung bis zur Messung erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

#### 3.5.3 Bildaufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbung am Mikroskop

Die IF-Aufnahmen der DNA-Reparaturfoci erfolgten am Mikroskop Zeiss AxioObserver.Z1 unter Nutzung der AxioVision Software. Aufgenommen wurden Z-Stapel (1  $\mu$ m Schichtdicke) von semi-konfokalen Schnittbildern, dafür wurde ein 63er-Objektiv mit Öl genutzt. Innerhalb eines Versuches wurden für alle Bilder dieselben Belichtungszeiten verwendet. Je Versuchsansatz wurden in den Zelllinien 10 Bilder in unterschiedlichen Arealen aufgenommen, so konnten für die unterschiedlichen Behandlungen jeweils ungefähr 100 Zellen ausgezählt werden.



Auch bei den *ex vivo* Versuchen wurden Z-Stapel von semi-konfokalen Schnittbildern aufgenommen. Aufgrund der hohen Schichtdicke wurde hierfür das Apotome verwendet, um Streulicht herauszurechnen. Da das verfügbare Tumormaterial begrenzt war, wurde bei den meisten Tumorproben für jede Bedingung nur eine einzige Schnittkultur bearbeitet. Eine Wiederholung mit frischem Patient:innenmaterial war nicht möglich, somit konnten auch keine individuellen Werte für die Standardabweichung (SD) ermittelt werden [95].

### 3.6 Quantifizierung residueller DNA-Reparaturfoci

Die Auszählung residueller Reparaturfoci nach einer IF-Färbung erfolgt in Tumorzellen meist manuell. Während sich bei der Arbeit mit Lymphozyten und Fibroblasten eine automatisierte Auszählung bereits etabliert hat und eine gute Übereinstimmung zur manuellen Auszählung erreicht, ist die Arbeit mit Tumorzellen aufgrund der starken Heterogenität herausfordernd. Eine manuelle Auszählung ist jedoch oft zeitaufwendig, zudem kann es zwischen verschiedenen Beobachtern zu Schwankungen in der Focizahl kommen. Allerdings wird in diesem Bereich viel geforscht und elaborierte Analysemethoden mit Unterstützung künstlicher Intelligenz getestet [109–111].

#### Manuelle Auszählung residueller Reparaturfoci

Sowohl bei der Auswertung der IF-Bilder der Zellkultur als auch in den *ex vivo* Gewebeschnitten wurden die DNA-Reparaturfoci in den Kernen primär manuell quantifiziert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Bildaufnahmen zu erreichen, wurden die Belichtungseinstellungen der drei Aufnahmekanäle in der AxioVision Software so angepasst, dass die Einstellungen für alle Bilder identisch sind. Anschließend wurden in der AxioVision Software aus den *.zvi*-Dateien der Z-Stapel-Aufnahmen Schnittbilder mit einer Maximumintensitätsprojektion (*maximum intensity projection*, MIP) erzeugt. Die manuelle Auswertung der Reparaturfoci aus den Zellkultur-Daten erfolgte ebenfalls direkt in der AxioVision Software. Zellkerne, die eindeutig deformiert oder mitotisch waren, wurden nicht in die Auszählung einbezogen. Die Ergebnisse für die Zellkulturversuche werden in Focizahl/Zellkern dargestellt.

Für die *ex vivo* Gewebeschnitte erfolgte die Auszählung der 53BP1 Reparaturfoci in dem Programm ImageJ. Dafür wurden die MIP-Schnittbilder als *.jpg*-Datei aus der AxioVision-Software exportiert. Um auszuschließen, dass Zellen des Normalgewebes das Ergebnis verfälschen, wurden nur die Foci in p63-positiven Kernen berücksichtigt. In ImageJ wurden diese zuerst eingekreist und dann über diese Bildmaske die Kernfläche (*Total Area*) in der DAPI-Färbung bestimmt. Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung der 53BP1 Foci dieser Zellen. Diese drei Arbeitsschritte sind in Abbildung 6 gezeigt. Da die Zellkerne in den Kryoschnitten zufällig angeschnitten wurden, wird in der Auswertung mit der Anzahl residueller Foci pro DAPI-Kernfläche gearbeitet. Für die Ergebnis-Darstellung werden die Werte schließlich als Foci pro Kern dargestellt. Dafür wurden diese auf die Fläche eines durchschnittlichen Tumorkerns normalisiert. Diese wurde initial aus mittig angeschnittenen Kernen diverser OPSCC-Tumorproben ermittelt. Im Mittel wurden pro Bedingung Foci auf einer Kernfläche ausgezählt, die 48.0 Tumorkernen entspricht (HPV-negativ: 39.8; HPV-positiv: 54.7) [95].

### Automatisierte Auszählung residueller Reparaturfoci

Um zu untersuchen, ob in den in dieser Arbeit genutzten Kopf-Hals-Tumorzelllinien eine automatisierte Auszählung möglich ist, erfolgte zusätzlich zur manuellen Auszählung der Vergleich mit einer automatisierten Auszählung in ImageJ. Die ImageJ Software ist kostenfrei und plattformübergreifend verfügbar. Im Rahmen dieser Dissertation kann nur ein kurzer Einblick in die automatisierte Foci-Auszählung gegeben werden.



Abb. 6: **Quantifizierung residueller 53BP1 Reparaturfoci in *ex vivo* Gewebeschnitten.** (A): Beispielbild der IF-Färbung. Auswahl der mit dem Tumormarker p63 rot angefärbten Tumorzellen. Die 53BP1 Foci sind in grün erkennbar. (B): DAPI-Fläche der ausgewählten Zellkerne der Tumorzellen im schwarz-weiß Bild. (C): Das invertierte Bild der 53BP1 Reparaturfoci in den ausgewählten Tumorzellen.

Ziel ist es, die Quantifizierung der Reparaturfoci in den verwendeten Zelllinien zu vereinfachen und eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Beobachtern zu ermöglichen. Begonnen wurde mit der automatisierten Auszählung der DAPI gefärbten Zellkerne in drei HPV-positiven Zelllinien. In der Zelllinie, in der die besten Ergebnisse erzielt wurden, erfolgte anschließend die automatisierte Quantifizierung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci. Die ImageJ Software bietet eine Vielzahl an Möglichkeiten, um residuelle Foci zu quantifizieren, für diese Arbeit wurden exemplarisch zwei Methoden betrachtet.

Als erste Methode wurde die Funktion *Find Maxima* eingesetzt, die es ermöglicht, die Focizahl in jeder Zelle zu erhalten. Zudem wurde auch die Funktion *Analyze Particles* mit verschiedenen Grenzwerten für die Pixelgröße genutzt. Auch die Funktion *Analyze Particles* ermöglicht es die Focizahl pro Zellkern zu erhalten, hierbei erfolgt die Nummerierung der Zellkerne allerdings nicht vollständig automatisiert. Eine detaillierte Beschreibung der automatisierten Foci-Auszählung findet sich in Protokoll A.8.5 im Anhang.

### 3.7 Auswertung und Statistik

Sofern nicht anders angegeben, betrug die Anzahl der durchgeführten Versuche  $N \geq 3$ . Das Erstellen der Graphiken und die Berechnung der Bland-Altman-Diagramme im Ergebnisteil erfolgte in der GraphPad Prism-Software. In dieser erfolgte auch die Berechnung der

Signifikanzen mittels ungepaartem t-Test (*students t-test*), sofern nicht anders angegeben. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) markiert. Statistisch signifikante p-Werte dürfen nicht ohne weitere Analysen mit einem großen Effekt oder Einfluss gleichgesetzt werden. Die statistischen Analysen sind daher als explorativ zu betrachten, die angegebenen p-Werte werden nur als deskriptive Maße verwendet.



## 4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zur Radiosensibilisierung von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC-Zelllinien nach dualer Inhibition von PARP und Wee1 in Kombination mit Bestrahlung vorgestellt.

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Rieckmann waren im Falle der HPV-positiven Zelllinien bereits einige Ergebnisse vorhanden [22, 76, 87, 99]. Sofern diese für das Verständnis der vorliegenden Dissertation notwendig sind, werden auch Anteile dieser Vorarbeiten dargestellt. Diese insbesondere am Anfang des Ergebnisteils beschriebenen Versuche (Abbildungen 7, 8, 9, 11, 12) sind am Ende der jeweiligen Legenden unter den Abbildungen klar als nicht oder zum Teil nicht von mir erbracht gekennzeichnet. Alle nicht derart gekennzeichneten Versuche wurden hingegen ausschließlich von mir durchgeführt. Begonnen wird mit dem Einfluss der dualen Inhibition auf HPV-positive Zelllinien, anschließend folgen die Ergebnisse für die HPV-negativen Zelllinien und zusammenfassend ein Vergleich der Ergebnisse der zwei Gruppen. Im darauf folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus der Zellkultur in *ex vivo* Gewebeschnitten validiert. Den Abschluss dieses Kapitels bildet der Vergleich der manuellen und automatisierten Auszählung residueller Reparaturfoci.

### 4.1 Radiosensibilisierung HPV-positiver Zelllinien

Die Wirkung der kombinierten Inhibition von PARP und Wee1 wurde in drei strahlenempfindlichen HPV-positiven Zelllinien (UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154) untersucht [22]. Begonnen wird in diesem Abschnitt mit dem Einfluss der dualen Inhibition auf die Proliferation, die Fraktion mitotischer Zellen und den Zellzyklus. Anschließend folgen Untersuchungen zur Induktion von Replikationsstress, der Radiosensibilisierung und der Quantifizierung residueller Doppelstrangbrüche. Der zentrale Endpunkt des Langzeitüberlebens im Koloniebildungstest wurde zur Abschätzung der Allgemeingültigkeit der Radiosensibilisierung zusätzlich noch in drei weiteren HPV-positiven HNSCC-Zelllinien (UT-SCC-45, 93-VU-147T, UPCI-SCC-90) getestet.

#### 4.1.1 Proliferation nach dualer Inhibition

Um zu testen, ob die Kombination der Inhibitoren möglicherweise bereits ohne Bestrahlung eine besondere Wirksamkeit erzielt, wurde ihr Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der drei HPV-positiven Zelllinien an Tag eins, drei und fünf nach Inhibitor-Zugabe untersucht. Für die Behandlung der Zelllinien wurde Olaparib mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in allen Zelllinien verwendet; diese Konzentration hat in Vorarbeiten die poly(ADP)-Ribosylierung in HPV-positiven Zelllinien nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung vollständig unterdrückt [76, 87]. Adavosertib wurde in Konzentrationen von 480 nM (UD-SCC-2, UPCI-SCC-154) und 960 nM (UM-SCC-47) eingesetzt, die in den jeweiligen Zelllinien in Vorarbeiten moderate Wachstumsverzögerungen bewirkt hatten. Die Zellzahl an Tag fünf nach Inhibitorbehandlung ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Proliferation unter Inhibitorbehandlung ist in allen

drei Zelllinien vermindert, allerdings gibt es keine Hinweise auf einen synergistischen Effekt der Inhibitoren. Da der Fokus des Projektes eine mögliche Radiosensibilisierung war und diese initialen Ergebnisse keinen klaren Hinweis auf synergistische Effekte zeigten, wurde von detaillierteren Untersuchungen ohne Bestrahlung abgesehen.

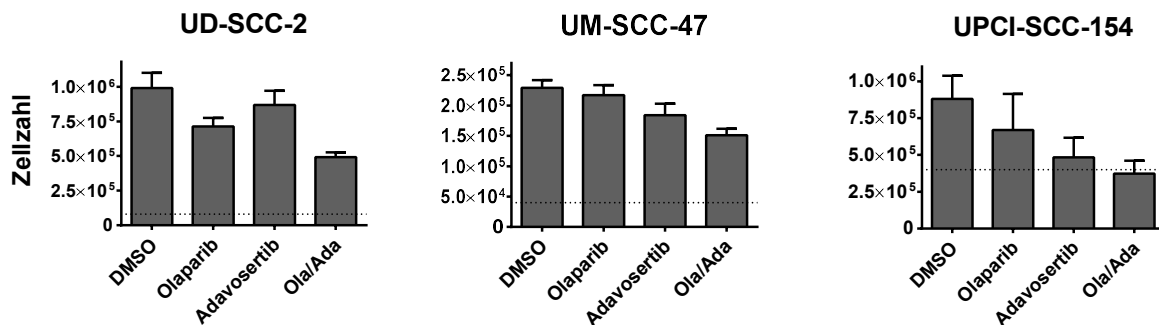


Abb. 7: **Proliferation nach Inhibitorbehandlung (HPV-positiv)**. Dargestellt ist die Zellzahl an Tag fünf nach der Inhibitorbehandlung. Die gestrichelte Linie zeigt die an Tag null ausgesäte Zellzahl. Behandelt wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M Olaparib und 480 nM (UD-SCC-2, UPCI-SCC-154) und 960 nM (UM-SCC-47) Adavosertib. Die Versuche zur Proliferation der HPV-positiven Zelllinien wurden zum Teil von K. Hintelmann durchgeführt [99].

#### 4.1.2 Fraktion mitotischer Zellen nach dualer Inhibition

Aufgrund einer eingeschränkten DNA-Reparaturkapazität weisen HPV-positive Zelllinien nach Bestrahlung einen besonders ausgeprägten G<sub>2</sub>-Arrest auf [22, 65, 87]. Dieser G<sub>2</sub>-Arrest ist Teil der zellulären Schadensantwort und verschafft den Zellen zusätzliche Zeit für die DNA-Reparatur vor der kritischen mitotischen Teilung. Die Unterdrückung des Zellzyklus-Arrestes ist daher eine Komponente zur Radiosensibilisierung durch duales Targeting. Um den direkten Einfluss der dualen Inhibition auf den G<sub>2</sub>-Arrest zu untersuchen, erfolgte die Färbung des Mitosemarkers p-H3 und die Quantifizierung p-H3-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 2 h später mit 0 Gy und 6 Gy bestrahlt. Die Fraktion der mitotischen Zellen wurde 5 h nach Bestrahlung bestimmt, ein Beispiel für das *Gating* der p-H3-positiven Zellen ist in Abbildung 8 A gezeigt. Bei den in rot eingefärbten Zellen handelt es sich um die Zellen, die sich in der Mitose befinden. Aus der Quantifizierung (Abbildung 8 B) ist zu erkennen, dass die Behandlung mit dem Wee1-Inhibitor Adavosertib in den unbestrahlten Zellen zu einer leichten Erhöhung der Anzahl mitotischer Zellen führt, was auf einen deregulierten Eintritt in die Mitose hindeutet. Die Bestrahlung mit 6 Gy blockiert den Eintritt in die Mitose in allen drei Zelllinien fast vollständig. Die Anzahl der mitotischen Zellen kann durch Inhibition von Wee1 und die duale Inhibition jedoch wieder deutlich erhöht werden. Bei den UM-SCC-47 und den UPCI-SCC-154 wird die Anzahl der mitotischen Zellen zum Teil sogar über das Ausgangsniveau der Kontrolle bei 0 Gy hinaus gesteigert, während in den UD-SCC-2 nur ein kleiner Anteil der Zellen durch Wee1-Inhibition aus dem G<sub>2</sub>-Arrest zurückgeholt werden konnte. Um dies weiter zu untersuchen, wurde der Anteil mitotischer Zellen in den UD-SCC-2 zusätzlich noch zu einem späteren Zeitpunkt (8 h) nach Bestrahlung quantifiziert.

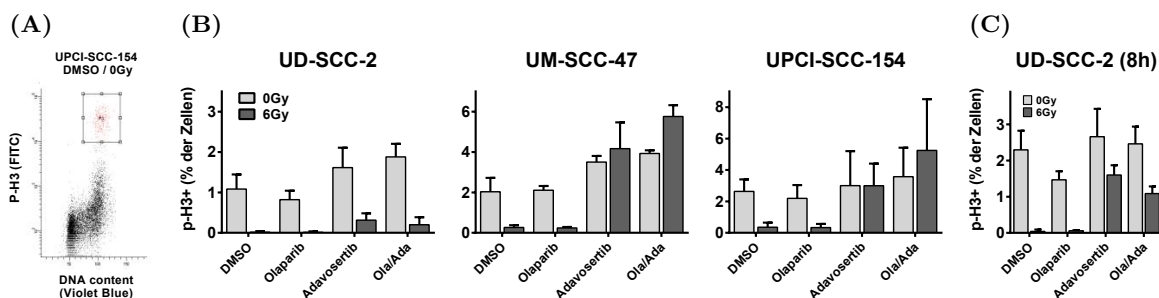


Abb. 8: **Fraktion der mitotischen Zellen (HPV-positiv)**. (A): Beispiel für das *Gating* der p-H3-positiven Zellen; diese sind in der Abbildung rot eingefärbt. (B): Quantifizierung der p-H3-positiven Zellen aus der Durchflusszytometrie; gezeigt ist der Median der p-H3-Signalintensität. Die Zellen wurden 2 h nach Inhibitorbehandlung mit 0 Gy und 6 Gy bestrahlt und 5 h später fixiert. (C): Quantifizierung der p-H3-positiven UD-SCC-2 Zellen 8 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und 6 Gy. Die Versuche zur Untersuchung der Fraktion mitotischer Zellen wurden zu einem Teil von K. Hintelmann durchgeführt [99].

Aus Abbildung 8 C ist zu erkennen, dass die Anzahl der Zellen in der Mitose im Vergleich zu den Ergebnissen 5 h nach Bestrahlung weiter gesteigert werden konnte. Die Wirksamkeit der Wee1-Inhibition zur Aufhebung des  $G_2$ -Arrestes ist in den UD-SCC-2 somit zwar deutlich geringer ausgeprägt als in den UM-SCC-47 und den UPCI-SCC-154, jedoch verlassen auch diese den  $G_2$ -Arrest zu einem für sie klar verfrühten Zeitpunkt.

#### 4.1.3 Untersuchung des Zellzyklus

Um die Zellzyklusverteilung und das Auftreten des  $G_2$ -Arrestes nach Bestrahlung weiter zu untersuchen, erfolgte die Analyse des Zellzyklus noch zu einem späteren Zeitpunkt (24 h) nach Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy. Die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen ist in Abbildung 9 dargestellt.

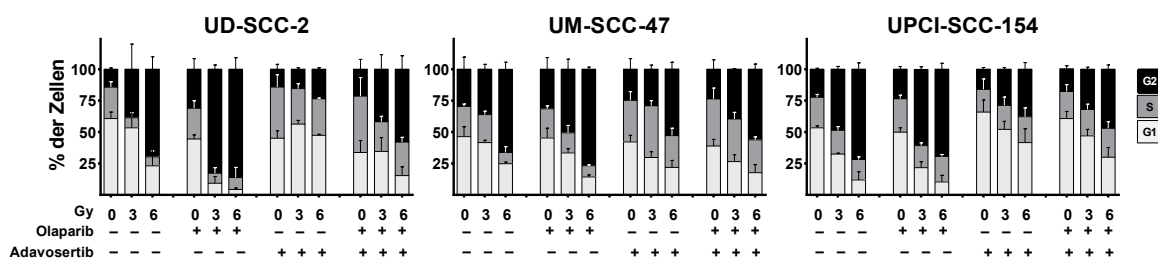


Abb. 9: **Zellzyklus 24 h nach PARP/Wee1-Inhibition und Bestrahlung (HPV-positiv)**. Analyse der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ( $G_1$ -, S- und  $G_2$ -Phase). Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 2 h später mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy bestrahlt. Die Fixation erfolgte 24 h nach Bestrahlung. Die Experimente zur Analyse des Zellzyklus HPV-positiver Zelllinien nach dualer Inhibition wurden zum Teil von K. Hintelmann und T. Behrens durchgeführt [99].

#### 4 Ergebnisse

Nach Bestrahlung ist ein deutlicher Anstieg an Zellen, die sich in der G<sub>2</sub>-Phase befinden, erkennbar. Diese Zunahme des G<sub>2</sub>-Arrestes ergänzt die Ergebnisse der Mitose-Experimente nach kürzeren Zeiträumen in denen bereits eine Abnahme mitotischer Zellen zu beobachten war (vgl. Abbildung 8). Die Inhibition von Wee1 bzw. PARP/Wee1 führt hier ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion des langfristigen G<sub>2</sub>-Arrestes. Außerdem ist zum Teil eine Zunahme an Zellen in der S-Phase zu erkennen, was auf eine reduzierte Geschwindigkeit der Replikationsgabeln und Replikationsstress hindeuten kann [38, 112, 113]. Dieser Effekt zeigt sich vor allem in den unbestrahlten UD-SCC-2 und den UM-SCC-47. Zudem lässt sich besonders in den UD-SCC-2 ein verstärkter G<sub>2</sub>-Arrest nach Olaparib-Behandlung beobachten, was auf erhöhte DNA-Schadenslevel hinweist. Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden die drei HPV-positiven Zelllinien mit dem PARP-Inhibitor Olaparib behandelt und 2 h später mit 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy bestrahlt. Wie zuvor wurde der Zellzyklus 24 h nach Bestrahlung analysiert. Die Ergebnisse der Zellzyklusverteilung 24 h nach PARP-Inhibition und Bestrahlung finden sich in Abbildung 10. In allen drei Zelllinien war nach PARP-Inhibition ein verstärkter G<sub>2</sub>-Arrest zu beobachten; dieser deutet auf erhöhte DNA-Schäden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hin.

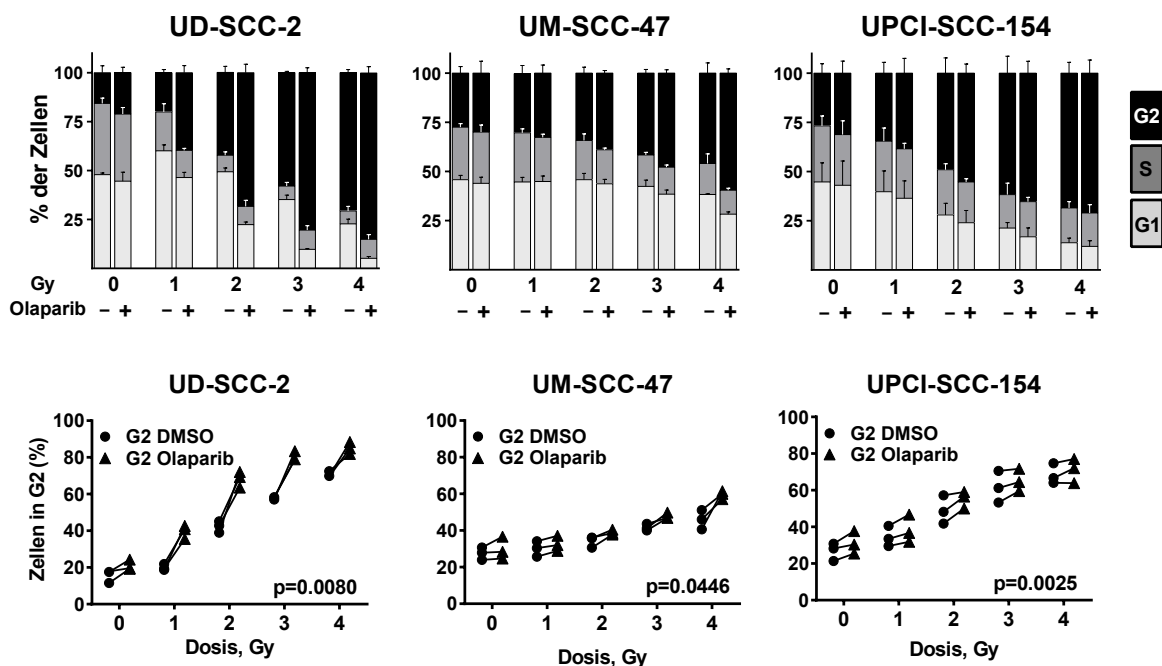


Abb. 10: Zellzyklus 24 h nach PARP-Inhibition und Bestrahlung (HPV-positiv). Analyse der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Die Zellen wurden mit dem PARP-Inhibitor Olaparib behandelt und 2 h später mit 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy bestrahlt. Die Fixierung der Zellen erfolgte 24 h nach Bestrahlung. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI und die Analyse in der Durchflusszytometrie. Nach PARP-Inhibition ist ein verstärkter G<sub>2</sub>-Arrest zu beobachten. Die Zunahme an G<sub>2</sub>-Phase-Zellen in den einzelnen Experimenten ist in der unteren Abbildung gezeigt. Der Effekt war zwar nur schwach ausgeprägt aber reproduzierbar und erreichte im gepaarten t-Test bei Einbeziehen aller Dosispunkte Signifikanz.



Zwar ist dieser Effekt in den UM-SCC-47 und den UPCI-SCC-154 nur schwach ausgeprägt, allerdings war der Anstieg der G<sub>2</sub>-Phase-Zellen nach PARP-Inhibition reproduzierbar und prinzipiell in jedem Experiment sichtbar.

#### 4.1.4 Replikationsstress: Messung der $\gamma$ H2AX-Signalintensität

Um zu untersuchen, in welchem Maße die Zellen nach der Inhibitorbehandlung Replikationsstress ausgesetzt sind, erfolgte die Quantifizierung des Replikationsstressmarkers  $\gamma$ H2AX in der Durchflusszytometrie. Die Zelllinien wurden mit den Inhibitoren behandelt und 24 h später fixiert; anschließend erfolgte die Quantifizierung des prozentualen Anteils an S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen mit hoher  $\gamma$ H2AX-Signalintensität. In Abbildung 11 A ist ein Beispiel für das *Gating* der  $\gamma$ H2AX-positiven S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen gezeigt. Aus Abbildung 11 B ist zu erkennen, dass die Wee1-Inhibition in allen drei Zelllinien zu einem starken Anstieg des prozentualen Anteils an Zellen mit hoher  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in S- und G<sub>2</sub>-Phase-Zellen führt. Die Darstellung des Mittelwertes der normierten  $\gamma$ H2AX-Intensität in S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen ist in Abbildung A.7 im Anhang gezeigt. Auch hier zeigt sich ein Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität nach Wee1-Inhibition. Diese Beobachtung ist in Einklang mit den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Mechanismen, wodurch es nach Inhibition des S/G<sub>2</sub>-Kontrollpunktes zur Induktion von Replikationsstress kommt. Die Kombination aus PARP- und Wee1-Inhibition erhöhte den Anteil der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellen allerdings nicht weiter und nur in den UD-SCC-2-Zellen ist bereits nach alleiniger PARP-Inhibition ein Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität zu messen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zellen im Falle zusätzlicher Bestrahlung die strahleninduzierten DNA-Schäden unter Bedingungen von Replikationsstress reparieren müssen. Zugleich ist unter Wee1-Inhibition die Fähigkeit der Zellen, den Zellzyklus in der G<sub>2</sub>-Phase zu arretieren, stark eingeschränkt, sodass sie kaum zusätzliche Zeit für die DNA-Reparatur haben, bevor sie in die kritische Phase der Mitose eintreten. Aus den vorliegenden Daten ergibt sich kein Hinweis auf eine weitere Verstärkung des Replikationsstress bei zusätzlicher Hemmung von PARP durch Olaparib.

Weitergehend erfolgte die Untersuchung der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität nach PARP-Inhibition und Bestrahlung mit 0 Gy und 6 Gy. Dabei erfolgte im Unterschied zu den Daten aus Abbildung 11 das *Gating* der  $\gamma$ H2AX positiven Zellen nur in der G<sub>2</sub>-Phase, bzw. im Falle der bestrahlten Proben in den G<sub>2</sub>-arretierten Zellen. Das Vorgehen ist exemplarisch in Abbildung A.6 A im Anhang gezeigt. In allen drei Zelllinien konnte dabei ein statistisch signifikanter Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in G<sub>2</sub>-Zellen nach Olaparib-Behandlung und Bestrahlung gemessen werden (s. Abbildung A.6 B im Anhang). Wie auch der verstärkte Zellzyklus-Arrest (vgl. Abbildung 10) deutet der Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität auf eine Zunahme von DNA-Schäden nach PARP-Inhibition hin.

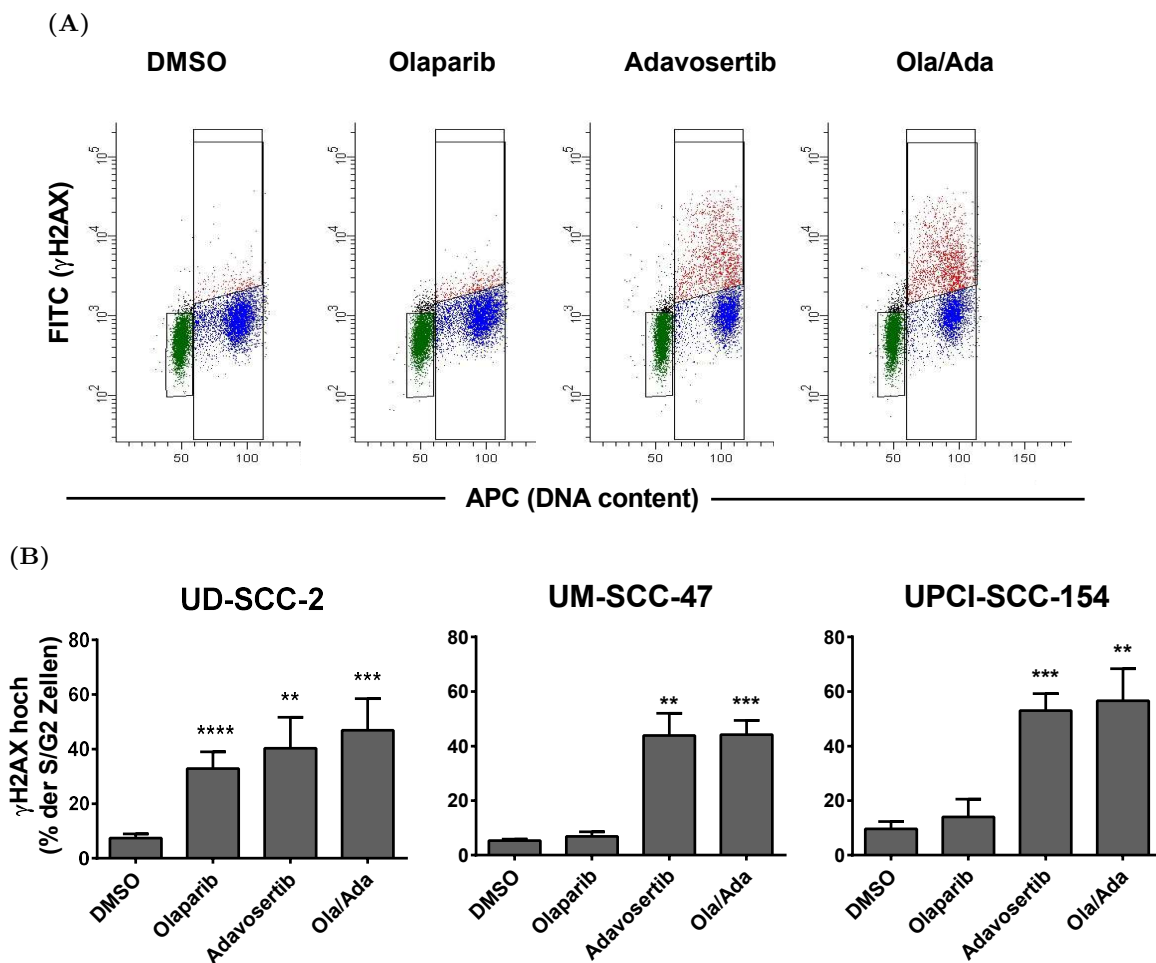


Abb. 11: **Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Färbung 24 h nach Inhibitorbehandlung (HPV-positiv)**. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 24 h später fixiert. (A): Beispiel für das *Gating* der  $\gamma$ H2AX-positiven S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen. (B): Quantifizierung des prozentualen Anteils an S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen mit hoher  $\gamma$ H2AX-Signalintensität (rote Zellen aus A). Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001) markiert. Die Versuche zur Messung des Replikationsstresses nach Inhibitorbehandlung wurden von K. Hintelmann durchgeführt [99].

#### 4.1.5 Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest

Das Zellüberleben nach Einzel- und Kombinationsbehandlung mit den Inhibitoren und Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy wurde im *delayed-plating* Koloniebildungstest untersucht und ist in Abbildung 12 dargestellt. In den drei HPV-positiven Zelllinien war nach der kombinierten PARP/Wee1-Inhibition im Vergleich zur Einzelbehandlung eine statistisch signifikante Verringerung der Anzahl von Kolonien zu beobachten. Auch nach den Einzelbehandlungen zeigte sich ein verringertes Zellüberleben, das Ausmaß der Radiosensibilisierung war allerdings deutlich geringer ausgeprägt als nach der dualen Inhibition.

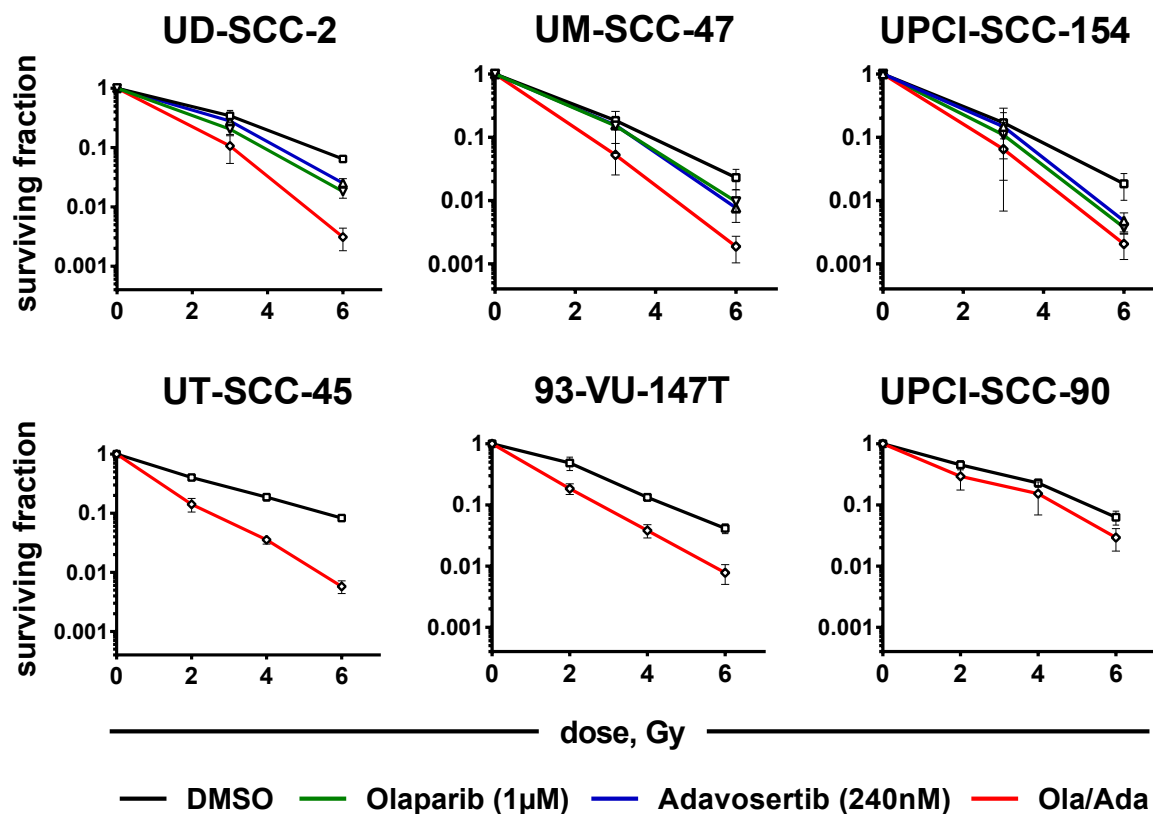


Abb. 12: Überleben im *delayed-plating* Koloniebildungstest (HPV-positiv). Dargestellt ist die Radiosensibilisierung der sechs HPV-positiven Zelllinien nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy. Die Koloniebildungstests zur Untersuchung der Radiosensibilisierung der HPV-positiven Zelllinien wurden zum Teil von K. Hintelmann und T. Behrens durchgeführt [99].

Um zu untersuchen, ob sich diese Ergebnisse auch auf andere Stämme HPV-positiver HNSCC-Zellen übertragen lassen, wurde die duale Inhibition von PARP/Wee1 auf drei weitere Zelllinien (UT-SCC-45, 93-VU-147T, UPCI-SCC-90) angewandt. Dabei zeigte sich, dass sowohl die UT-SCC-45 als auch die 93-VU-147T durch die duale Inhibition effektiv radiosensibilisiert werden konnten, während der Effekt in den UPCI-SCC-90 geringer ausgeprägt war. Die Ausplattierungseffizienz (PE) der untersuchten HPV-positiven Zelllinien ist in Abbildung A.9 im Anhang gezeigt.

#### 4.1.6 Residuelle Doppelstrangbrüche in der Immunfluoreszenz

Bisher wurden in den Ergebnissen nur indirekte Auswirkungen der Bestrahlung wie z. B. Veränderungen im Zellzyklus und das Zellüberleben betrachtet. Um die direkten Schädigungen ionisierender Strahlung zu quantifizieren, ist eine Anfärbung der residuellen DSB in der IF-Mikroskopie möglich. In der vorliegenden Arbeit erfolgte dafür in den HPV-positiven Zelllinien die Färbung residueller 53BP1 Reparaturfoci. Diese können ebenso wie  $\gamma$ H2AX Foci als Surrogatmarker zur Quantifizierung von residuellen DSB genutzt werden, jedoch

werden sie kaum von Replikationsstress beeinflusst. Im Unterschied zu den klassischen Methoden der direkten Quantifizierung von DNA-Schäden (wie z. B. der Gelelektrophorese), kann die Methode der Foci-Analyse bereits bei niedrigen, therapierelevanten Bestrahlungsdosen eingesetzt werden [111, 114].

Die Ursache für die verminderte DSB-Reparaturkapazität von HPV-positiven HNSCC-Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. In der Literatur wird diese häufig auf einen Defekt im DNA-Reparaturweg der HR zurückgeführt, allerdings wird auch von einer Reduktion des NHEJ berichtet, was zu einem Wechsel zum fehleranfälligen alt-EJ-Weg führt [23, 36, 69, 88]. Das Enzym PARP1 ist eine Schlüsselkomponente des Letzteren [43] und Wee1 wurde als relevanter HR-Faktor beschrieben [49]. In Vorarbeiten zu diesem Projekt konnte allerdings keine Reduktion in der HR nach Wee1-Inhibition beobachtet werden [99]. Um die Effektivität der DNA-Reparatur mit und ohne PARP/Wee1-Inhibition näher zu untersuchen, erfolgte die Analyse residueller DSB in der IF nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung mit 2 Gy; die Zellen wurden 24 h nach Bestrahlung fixiert. Zu diesem Zeitpunkt sind die zellulären DSB-Reparaturvorgänge weitestgehend abgeschlossen. Anschließend erfolgte die IF-Färbung der 53BP1 Reparaturfoci und des Proteins Geminin. Geminin ist ein Zellzyklusmarker und ermöglicht die Anfärbung von S- und G<sub>2</sub>-Phase-Zellen. Da sich in den HPV-positiven Zelllinien nach Wee1-Inhibition eine Aufhebung des G<sub>2</sub>-Arrestes zeigte und die PARP-Inhibition vor allem zu zusätzlichen Schäden in der S- und G<sub>2</sub>-Phase führt, wurde diese Färbung eingesetzt, um mögliche Unterschiede in den residuellen Foci-Leveln der einzelnen Zellzyklusphasen beobachten zu können. Ein Beispielbild der IF-Färbung ist in Abbildung 13 A gezeigt, darin sind die 53BP1 Reparaturfoci in rot, die Geminin-positiven Zellen in grün und die DAPI-gefärbten Zellkerne in blau erkennbar. Bei den Geminin-positiven Zellen handelt es sich um S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen, bei den Geminin-negativen Zellen um G<sub>1</sub>-Phase-Zellen.

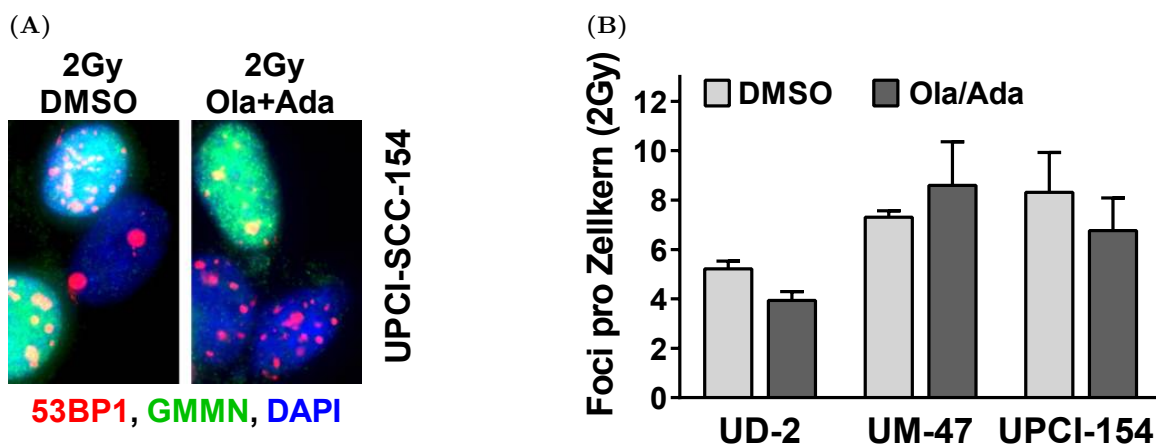


Abb. 13: Residuelle 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-positiv). (A): Beispielbild der IF-Färbung in den UPCI-SCC-154. Die Zellkerne sind mit DAPI in blau eingefärbt und die 53BP1 Foci in rot erkennbar. Die Geminin(=GMMN)-positiven Zellkerne sind grün eingefärbt; es handelt sich bei diesen um Kerne von S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen. (B): Quantifizierung residueller 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung mit 2 Gy.

Die Abbildung 13 B zeigt die 53BP1 Reparaturfoci der Zellen unabhängig von der Geminin-Färbung und somit die Anzahl residueller DSB aller Zellzyklusphasen. Es handelt sich dabei um strahleninduzierte 53BP1 Foci, der Hintergrund bei 0 Gy wurde bereits abgezogen. Überraschenderweise konnte unter der kombinierten Inhibition von PARP/Wee1 trotz der deutlichen Radiosensibilisierung keine Zunahme residueller 53BP1 Reparaturfoci beobachtet werden. Nur in den UM-SCC-47 zeigte sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Focizahl. Die im Koloniebildungstest beobachtete Radiosensibilisierung nach PARP/Wee1-Inhibition ist anscheinend nicht ausschließlich auf eine Zunahme residueller DSB zurückzuführen. Zusätzlich zu den physikalischen Schädigungen an der DNA scheint es in den HPV-positiven Zellen zu weiteren zellbiologischen Veränderungen zu kommen.

Bei Bestrahlung der Zellen mit Photonenstrahlung ist davon auszugehen, dass die DSB stochastisch verteilt sind und die strahleninduzierten Foci einer Poisson-Verteilung folgen [115, 116]. Dies gilt allerdings nur für die Induktion der strahleninduzierten DSB und für kurze Zeiträume nach der Bestrahlung. Im Rahmen der DNA-Schadensantwort kommt es zu Zellzyklusveränderungen, wodurch die Verteilung der Reparaturfoci nicht mehr rein zufällig ist und es zu deutlichen Abweichungen von der Poisson-Verteilung kommen kann. Die Zellen arretieren in der  $G_2$ -Phase um Strahlenschäden zu reparieren bevor sie in die Mitose eintreten; zudem weisen die S/ $G_2$ -Phase-Zellen einen höheren DNA-Gehalt auf als  $G_1$ -Phase-Zellen. Es ist in der Population der S/ $G_2$ -Phase-Zellen somit von einer höheren Anzahl residueller Foci auszugehen. Diese Beobachtungen wurden auch in der Literatur beschrieben [115, 116]. Auch die Reparaturkapazität der Zellen und die Art der Strahlung hat Einfluss auf die Verteilung der residuellen DSB. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem eine maximale Focizahl von 20 genutzt, da Zellen mit solch einer Anzahl residueller DSB mit großer Wahrscheinlichkeit bereits letal geschädigt und weitere Brüche für das Zellüberleben nicht von Bedeutung sind. Eine Regression mittels Poisson-Verteilung ist daher auf Basis der vorliegenden Daten nicht sinnvoll. Es erfolgte allerdings die eine detaillierte Analyse der residuellen Reparaturfoci im Histogramm, um die Verteilung der residuellen Reparaturfoci nach Behandlung und Bestrahlung zu untersuchen. In Abbildung 14 ist die Verteilung residueller Reparaturfoci exemplarisch für die UPCI-SCC-154 gezeigt. Mit Hilfe der Geminin-Färbung erfolgte eine Aufteilung in  $G_1$ - (schwarze Balken) und S/ $G_2$ -Phase-Zellen (graue Balken). In den Abbildung A.11 und A.12 im Anhang finden sich die Ergebnisse für die UD-SCC-2 und die UM-SCC-47. Aus Abbildung 14 ist zu erkennen, dass in der unbehandelten Kontrolle (A) die Anzahl residueller Foci in den S/ $G_2$ -Phase-Zellen tatsächlich über der Focizahl in den  $G_1$ -Phase-Zellen liegt (vgl. auch Tabelle A.5). Nach Bestrahlung mit 2 Gy kommt es sowohl in der  $G_1$ -Population als auch in der S/ $G_2$ -Population zu einem Anstieg residueller Foci (B). In der unbehandelten Kontrolle fällt zudem eine Ansammlung an Zellen mit mindestens 20 residuellen 53BP1 Foci in der S/ $G_2$ -Population auf. Nach der Inhibition von PARP/Wee1 ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in beiden Populationen eine Verschiebung zu höheren Focizahlen erkennbar (C und D). Außerdem ist zu beobachten, dass sich die Verteilungen der beiden Populationen einander annähern. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt für die  $G_1$ -Phase-Zellen. Während in der unbehandelten Kontrolle bei 0 Gy etwa 48 % Prozent der Zellen keinen oder nur einen einzelnen residuellen Fokus aufweisen, sind dies nach Behandlung nur noch 26 %. Zwar reduziert sich nach PARP/Wee1-Inhibition die Anzahl an Zellen mit mindestens 20 Foci, die Anteil Zellen mit nur wenigen residuellen Foci verringert sich jedoch ebenfalls. Median, Mittelwert und SD der Foci-Verteilungen für die drei HPV-positiven Zelllinien finden sich in den Tabellen A.3 bis A.5 im Anhang.

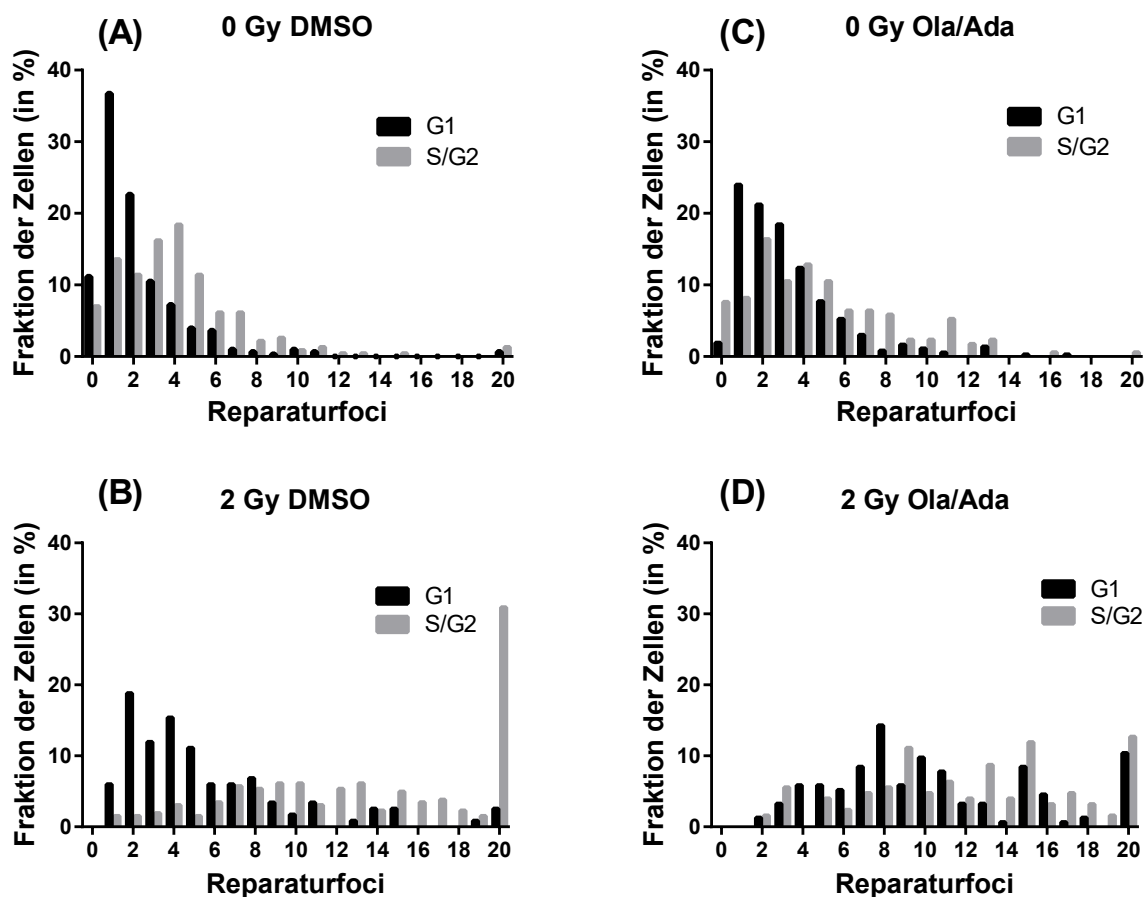


Abb. 14: **Distribution residueller 53BP1 Reparaturfoci (UPCI-SCC-154).** Gezeigt sind die residuellen 53BP1 Reparaturfoci in  $G_1$ -Phase-Zellen (schwarze Balken) und S/ $G_2$ -Phase-Zellen (graue Balken) 24 h nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung mit 0 Gy und 2 Gy. Bestrahlung mit 2 Gy führt zu einem Anstieg der Anzahl residueller Reparaturfoci (B). Nach Behandlung mit der PARP/Wee1-Inhibition ist in den  $G_1$ -Phase-Zellen eine Verschiebung zu höheren Focizahlen erkennbar (C und D). In den S/ $G_2$ -Phase-Zellen hingegen nimmt die Anzahl an Zellen mit mindestens 20 residuellen Foci ab. Zudem gleichen sich die Verteilungen der Zellzyklusphasen einander an. Der Median und die Mittelwerte der Verteilungen finden sich in Tabelle A.5 im Anhang.

Die mittlere Anzahl residueller 53BP1 Reparaturfoci, aufgeschlüsselt auf die einzelnen Zellzyklusphasen, ist in Abbildung 15 dargestellt. Daraus zeigt sich in Übereinstimmung mit den Histogrammen, dass die durchschnittliche Anzahl residueller 53BP1 Foci in den  $G_1$ -Phase-Zellen aller Zelllinien nach kombinierter PARP/Wee1-Inhibition signifikant und zum Teil deutlich zunahm, während die Anzahl an 53BP1 Foci in den S/ $G_2$ -Phase-Zellen abnahm. In Übereinstimmung mit den entsprechenden Zellzyklusdaten (vgl. Abbildung 9) unterstreichen diese Beobachtungen, dass Zellen unter dualer Inhibition mit nicht-reparierten DSB den  $G_2$ -Arrest verlassen. Die anschließende Passage durch die Mitose trägt das erhöhte Risiko eines akuten oder verzögerten Zelltodes.

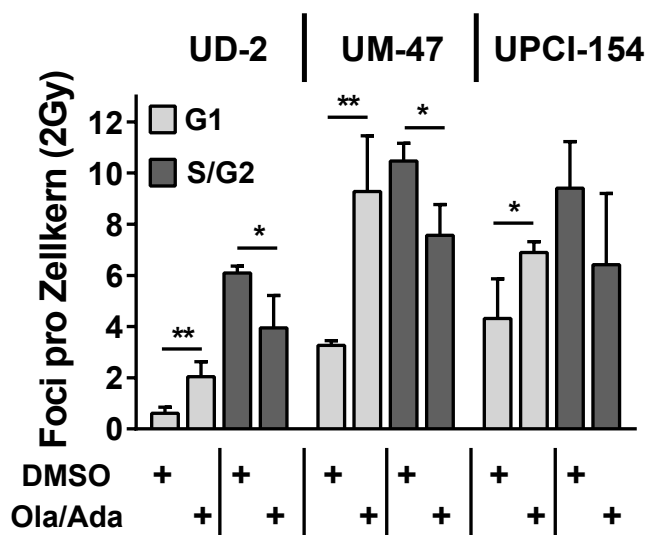


Abb. 15: Darstellung residueller 53BP1 Reparaturfoci, aufgeschlüsselt in G<sub>1</sub>- und S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen. Die Zellen wurden mit der PARP/Wee1-Inhibition behandelt, 2 h später mit 2 Gy bestrahlt und 24 h nach Bestrahlung fixiert. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001) markiert.

Aus Abbildung 14 ist zu erkennen, dass sich die Fraktion an Zellen mit einer geringen Anzahl residueller Foci reduziert, so kamen nach dualer Inhibition und Bestrahlung (D) Zellen mit keinem oder einem einzelnen Fokus überhaupt nicht mehr vor. Allerdings haben gerade Zellen mit der geringsten Anzahl residueller DSB die größten Chancen dem mitotischen Zelltod zu entgehen und stellen die wichtigste Fraktion für das Zellüberleben nach Behandlung. In der vorliegenden Dissertation wurde als Grenze für gering geschädigte Zellen ein Wert von maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen 53BP1 Foci gewählt. Hier ist zu erwähnen, dass es keinerlei festgelegte Grenzwerte gibt und diese somit immer etwas willkürlich sind. Ideale Grenzwerte können sich gegebenenfalls auch von Zelllinien zu Zelllinie unterscheiden. Ein Hochsetzen der Grenze auf maximal 5 ( $\leq 5$ ) Foci führte in den vorliegenden Daten nur zu geringen Veränderungen der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt), sodass der gewählte Bereich sinnvoll erscheint. Aus Abbildung 16 A ist zu erkennen, dass sich der prozentuale Anteil solcher potenziell überlebender Zellen nach dualer PARP/Wee1-Inhibition und Bestrahlung mit 2 Gy in den drei HPV-positiven Stämmen verringert. Wird die Anzahl residueller Reparaturfoci auf die Zellzyklusphasen aufgeschlüsselt (Abbildung 16 B), zeigt sich in allen Zelllinien nach PARP/Wee1-Inhibition eine Reduktion der Anzahl an gering geschädigten Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, was die vorzeitige mitotische Passage untermauert (vgl. Abbildung 15). Überraschenderweise war bei den UD-SCC-2 der Anteil an Zellen mit wenigen Foci in der S/G<sub>2</sub>-Phase nach der dualen Inhibition statistisch signifikant reduziert, obwohl die durchschnittliche Anzahl der Foci in dieser Fraktion (vgl. Abbildung 16 B) ebenfalls reduziert war. Aus dem Histogramm der UD-SCC-2 in Abbildung A.11 im Anhang ist analog zu dem Histogramm der UPCI-SCC-154 in Abbildung 14 nach PARP/Wee1-Inhibition eine Verschiebung zu höheren Zahlen residueller 53BP1 Foci erkennbar, bei gleichzeitiger Reduktion der Zellen mit mindestens 20 Foci.

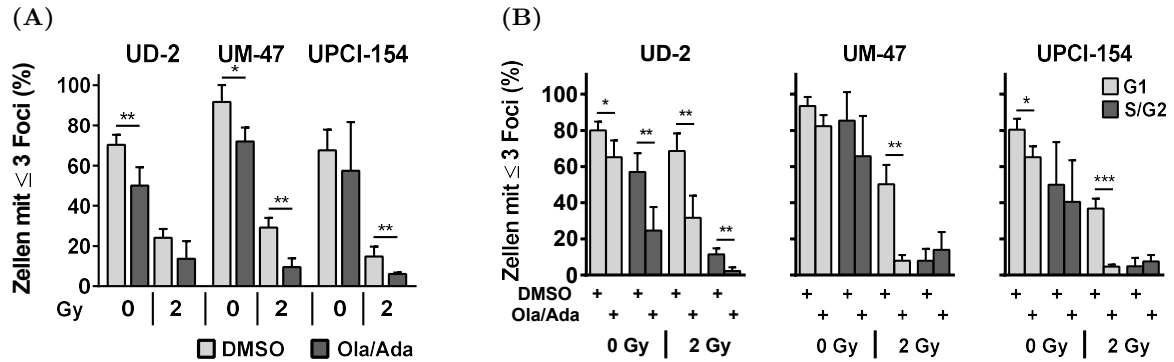


Abb. 16: Anteil der Zellen mit maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-positiv). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen, die 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy maximal drei residuelle 53BP1 Foci aufweisen. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) markiert.

Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, erfolgte zusätzlich zur Quantifizierung der Anzahl an nur gering geschädigten Zellen, eine Betrachtung der stark geschädigten Zellen mit mindestens 20 Foci ( $\geq 20$ ). In dieser Arbeit wurde eine maximale Focizahl von 20 quantifiziert, da Zellen mit 20 residuellen Foci bereits eine nur minimale Überlebenschance besitzen und weitere Foci daher als irrelevant für das Zellüberleben angesehen werden können. Dabei bestätigt sich, dass nur in den UM-SCC-47 ein Anstieg an stark geschädigten Zellen nach dualer Inhibition zu beobachten ist. Im Anhang findet sich dazu die Abbildung A.13 A. Aus den Histogrammen der UPCI-SCC-154 und UD-SCC-2 ist zu erkennen, dass der Anteil an Zellen mit mindestens 20 residuellen Foci in den S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen nach dualer Inhibition verringert ist. In diesen beiden Zelllinien gibt es zudem kaum G<sub>1</sub>-Phase-Zellen mit mindestens 20 residuellen Foci. Die Ursache hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eventuell haben die besonders stark geschädigte Zellen ohne die Möglichkeit zum G<sub>2</sub>-Arrest, durch z. B. fehlgeschlagene Zellteilung und nachfolgende Apoptose einen unmittelbaren mitotischen Zelltod erlitten, sodass sie hier nicht mehr detektiert wurden.



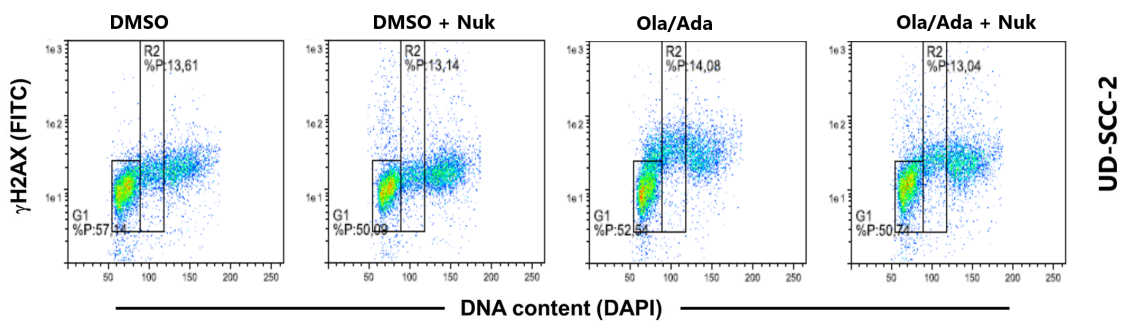
#### 4.1.7 Reduktion des Replikationsstress nach Nukleosid-Zugabe

Anhand der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.4 konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Wee1 und PARP/Wee1 in den HPV-positiven Zelllinien zur Induktion von Replikationsstress führt. Inwieweit dieser zu der beobachteten Radiosensibilisierung nach dualer Inhibition beiträgt, war bisher noch unklar. Dass die Inhibition der Intra-S/G<sub>2</sub>-Kontrollpunkte zu Replikationsstress und in Folge vieler aktiver Replikationsursprünge und laufender Replikationsgabeln in der Zelle zu einem Mangel an Nukleotiden führt, wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Zudem konnte beobachtet werden, dass die externe Gabe von Nukleosiden diesen Replikationsstress teilweise kompensieren kann [48, 90, 99, 117]. Aus extern hinzugegebenen Nukleosiden kann die Zelle über Phosphorylierung Nukleotide herstellen. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Nukleosid-Zugabe auf Replikationsstress, die Radiosensibilisierung und die Anzahl residueller DNA-Reparaturfoci untersucht. Die Ergebnisse waren zum Teil überraschend; leider war es im Rahmen der Arbeit nicht möglich, diese vertiefend zu untersuchen.

#### Replikationsstress nach Nukleosid-Zugabe

Um zu untersuchen, ob der Replikationsstress nach dualer Inhibition in HPV-positiven HNSCC-Zellen durch Zugabe von Nukleosiden reduziert werden kann, wurde die  $\gamma$ H2AX-Signalintensität mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dafür wurden die Zellen, anders als in den Versuchen aus Abbildung 11, bereits 4 h nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe fixiert. Dies entspricht dem Zeitpunkt von 2 h nach Bestrahlung im Koloniebildungstest und ist ein Zeitpunkt, zu dem die DSB-Reparatur besonders aktiv ist (vgl. Reparaturkinetik in Abbildung 3). Da besonders die  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in S-Phase-Zellen als Marker für Replikationsstress gilt [41], erfolgte das *Gating* und die Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellen in der mittleren S-Phase (*mid-S*), sodass weder G<sub>1</sub>- noch G<sub>2</sub>-Phase-Zellen die Messungen beeinflussen. Das *Gating* ist exemplarisch in Abbildung 17 A dargestellt. In der Quantifizierung (Abbildung 17 B) ist nach dualer Inhibition ein Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in S-Phase-Zellen zu erkennen, was die Induktion von Replikationsstress bestätigt. Dieser kann durch die zusätzliche Gabe von Nukleosiden zwar nicht vollständig, aber teilweise reduziert werden. In den UM-SCC-47 ist die Reduktion weniger stark ausgeprägt, aber ebenfalls signifikant. Die Zugabe von Nukleosiden hat in der DMSO-Kontrolle keinen Effekt auf die basale  $\gamma$ H2AX-Signalintensität. Die Ergebnisse für die Reduktion des Replikationsstress nach Einzelgabe der Inhibitoren sind in Abbildung A.14 im Anhang dargestellt. Daraus ist zu erkennen, dass es durch die Inhibition von PARP in den drei HPV-positiven Zelllinien zu diesem frühen Zeitpunkt zu einem geringen Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Intensität kommt und die Zugabe von Nukleosiden diese in zwei der drei Linien leicht reduzieren kann. Nach der Inhibition von Wee1 mittels Adavosertib ist ein deutlicher Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Intensität zu erkennen. In allen drei Zelllinien führt die Zugabe von Nukleosiden zu einer teilweisen Reduktion des Replikationsstress.

(A)



(B)

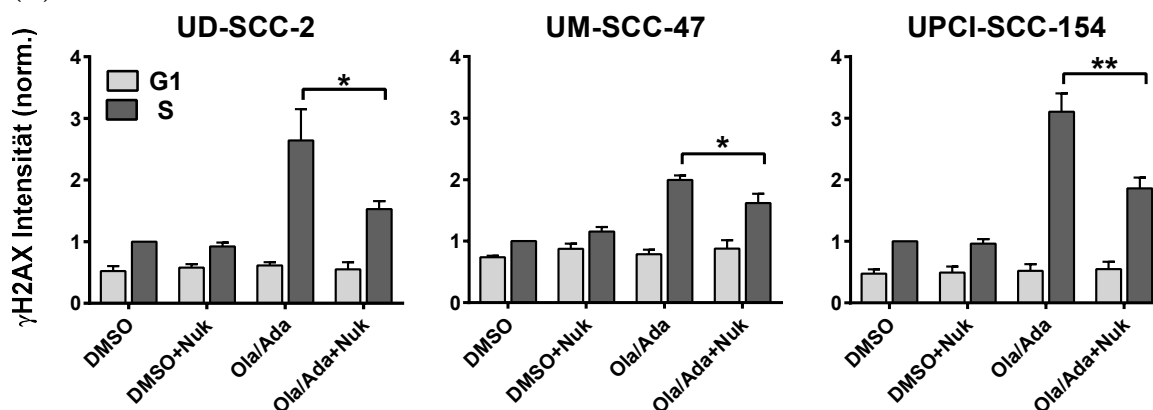


Abb. 17: Intensität der  $\gamma$ H2AX-Färbung nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv). (A): Beispiel für das Gating der  $\gamma$ H2AX-positiven UD-SCC-2 Zellen in der mittleren S-Phase (*mid-S*). (B): Quantifizierung  $\gamma$ H2AX-positiver S-Phase-Zellen 4 h nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe. Dargestellt ist der Median der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in der mittleren S-Phase; normiert auf die unbehandelte Kontrolle im Vergleich zur nicht-replikativen G<sub>1</sub>-Phase, in der keine Effekte zu erwarten sind. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) markiert.

### Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest nach Nukleosid-Zugabe

Die Zugabe von Nukleosiden konnte den Replikationsstress in den HPV-positiven Zelllinien sowohl nach alleiniger Wee1- als auch nach PARP/Wee1-Inhibition reduzieren. Um den Einfluss des Replikationsstresses auf die Radiosensibilisierung zu untersuchen, wurde das Zellüberleben im Koloniebildungstest nach PARP/Wee1-Inhibition und Nukleosid-Zugabe bestimmt. Aus Abbildung 18 A ist zu erkennen, dass die Reduktion des Replikationsstresses durch Nukleosid-Zugabe nur in den UD-SCC-2 einen Einfluss auf die Radiosensibilisierung nach PARP/Wee1-Inhibition hat. Dies ist unerwartet, da in der Literatur für andere Entitäten Replikationsstress als Faktor für die Radiosensibilisierung beschrieben wurde [48, 90]. Es zeigt sich allerdings, dass in diesen Publikationen hauptsächlich die Inhibition von Wee1

alleine getestet wurde. Daher wurde auch im Rahmen dieser Arbeit der Effekt der Nukleoside auf die Radiosensibilisierung nach alleiniger Wee1-Inhibition getestet. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 18 B dargestellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Parsels et al. [90] zeigte sich in allen drei Zelllinien eine Reduktion der Radiosensibilisierung nach Wee1-Inhibition.

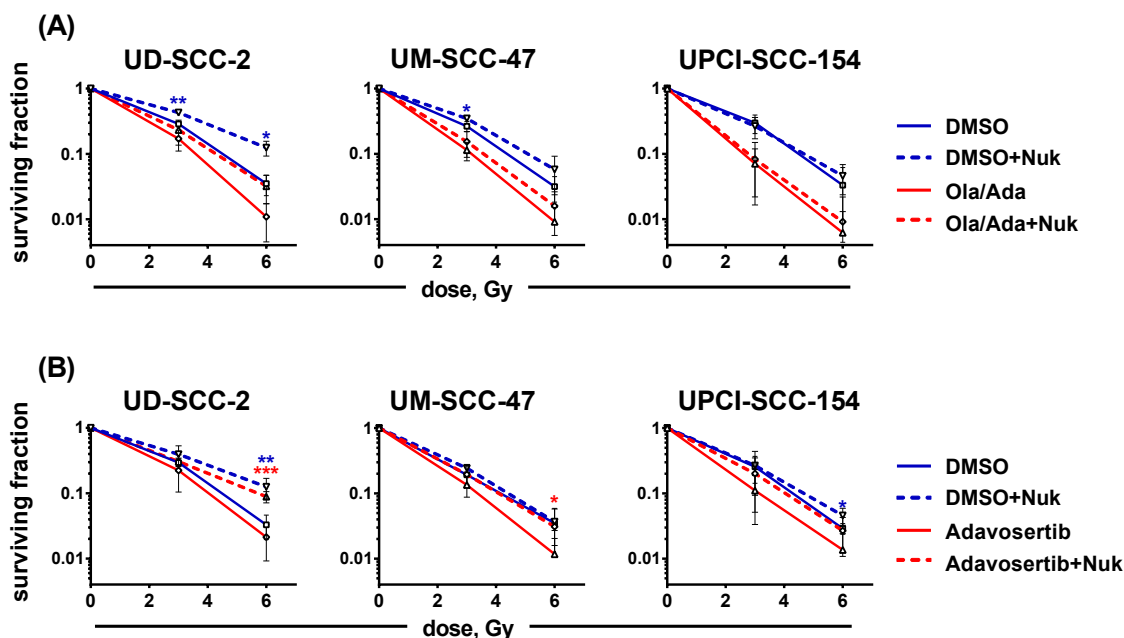


Abb. 18: Zellüberleben nach PARP/Wee1- oder Wee1-Inhibition und Nukleosid-Zugabe im *delayed-plating* Koloniebildungstest (HPV-positiv). Zugabe von Nukleosiden nach (A): PARP/Wee1-Inhibition oder (B): alleiniger Wee1-Inhibition sowie Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy. Die durchgezogenen Linien zeigen das Zellüberleben ohne Nukleoside, die gestrichelten Linien das Überleben nach Nukleosid-Zugabe. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001) markiert.

Unerwarteterweise kam es auch in den DMSO-behandelten Kontrollen in sehr ähnlichen Ausmaß zur Induktion einer Radioresistenz, welche in den UD-SCC-2 für die 3 Gy und 6 Gy Dosispunkte Signifikanz erreichte. Auch in den UM-SCC-47 ist ein Trend zur Radioresistenz beobachten. Während diese Daten also stark darauf hindeuten, dass Replikationsstress aufgrund von Nukleotidmangel eine wichtige Rolle bei der Radiosensibilisierung unter alleiniger Wee1-Inhibition spielen kann, stellen sie die Bedeutung für die Radiosensibilisierung unter kombinierter PARP/Wee1-Inhibition in den untersuchten Zelllinien in Frage. Die PE für den Koloniebildungstest der HPV-positiven Zelllinien nach Nukleosid-Zugabe findet sich in Abbildung A.10 im Anhang.

### Radioresistenz nach Nukleosid-Zugabe

Im Koloniebildungstest wurde bei Zugabe von Nukleosiden in den unbehandelten Kontrollen überraschend die Induktion von Radioresistenz beobachtet. Da dies bisher noch nicht beschrieben worden ist, wurde eine Reihe von Pilot-Experimenten durchgeführt und Proliferation, Zellzyklus und residuelle 53BP1 Reparaturfoci nach Nukleosid-Zugabe untersucht. Dabei zeigte sich in den drei HPV-positiven Zelllinien nach Nukleosid-Zugabe initial eine leichte Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, die nur für die UD-SCC-2 an Tag fünf noch deutlich ausgeprägt war (vgl. Abbildung A.15 im Anhang). Auch auf die Zellzyklusverteilung haben die Nukleoside in den UM-SCC-47 und den UPCI-SCC-154 wenig Einfluss. In den UD-SCC-2 zeigte sich jedoch ein erhöhter Anteil an G<sub>1</sub>-Phase-Zellen auf Kosten von S-Phase-Zellen. Außerdem wird insbesondere in den UD-SCC-2 der strahleninduzierte G<sub>2</sub>-Arrest durch die Zugabe von Nukleosiden reduziert, was darauf hindeutet, dass weniger residuelle DSB vorhanden waren, um den G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Kontrollpunkt auszulösen (vgl. Abbildung A.16 im Anhang). Um diese Hypothese näher zu untersuchen, erfolgte in dieser Zelllinie eine Quantifizierung residueller 53BP1 Reparaturfoci. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, mit den Nukleosiden und EdU behandelt, um eine Anfärbung der S-Phase-Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen mit 0 Gy und 2 Gy bestrahlt und 24 h nach Bestrahlung fixiert. Um den Anteil potenziell überlebender Zellen zu untersuchen, erfolgte die Quantifizierung von Zellen mit weniger als drei residuellen 53BP1 Reparaturfoci. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

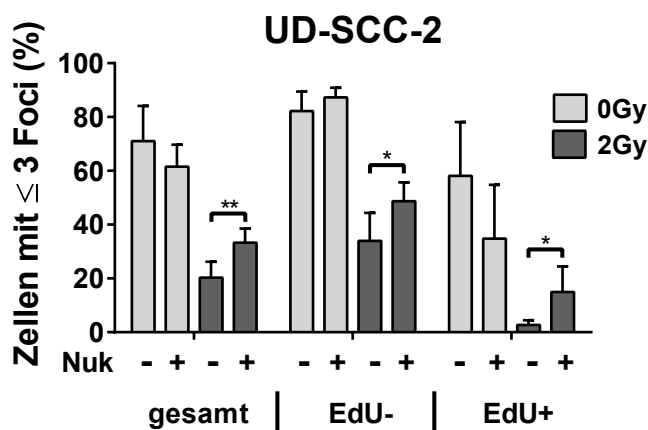


Abb. 19: Zellen mit maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen Reparaturfoci nach Nukleosid-Behandlung (HPV-positiv). Quantifizierung der Zellen mit maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen 53BP1 Foci 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und 2 Gy. Die Nukleosid-Zugabe erfolgte 2 h vor Bestrahlung. Dargestellt ist die Anzahl dieser gering geschädigten Zellen über alle Zellzyklusphasen (gesamt), aber auch aufgeschlüsselt in EdU+ und EdU- Zellen. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001) markiert.

Aus Abbildung 19 ist zu erkennen, dass sich die Anzahl der Zellen mit einer geringen Anzahl residueller 53BP1 Reparaturfoci ( $\leq 3$  Foci) nach Bestrahlung mit 2 Gy bei zusätzlicher Nukleosid-Zugabe erhöhte. Dieser Effekt lässt sich sowohl in Zellen beobachten, die zum Zeit-

punkt der Bestrahlung aktiv replizieren (EdU+), als auch in der Fraktion der Zellen, die dies nicht macht (EdU-). Der Anstieg potenziell überlebender Zellen nach Nukleosid-Behandlung bestätigt die Induktion von Radioresistenz, die in den unbehandelten UD-SCC-2 im Koloniebildungstest beobachtet wurde. Die Anzahl der stark geschädigten Zellen mit mindestens 20 ( $\geq 20$ ) residuellen Foci ist in den UD-SCC-2 unabhängig von der Nukleosid-Zugabe. Dies ist in Abbildung A.13 B im Anhang gezeigt.

Weitere Analysen sind notwendig, um diesen bemerkenswerten Befund der Radioresistenz durch Nukleosid-Supplementierung in den ansonsten unbehandelten Zellen zu klären. Da diese Beobachtung nicht im Fokus dieses Projektes lag, war es nicht möglich, weitergehende Experimente durchzuführen.

## 4.2 Radiosensibilisierung HPV-negativer Zelllinien

In den HPV-positiven Zelllinien hat die duale Inhibition von PARP/Wee1 zu einer hochwirksamen Radiosensibilisierung geführt. Für Patient:innen mit HPV-negativen HNSCC ist eine Deintensivierung der Therapie, wie sie für HPV-positive Patient:innen anvisiert ist, allerdings keine Option. Diese Patient:innen sprechen weniger gut auf die (Radio-)Therapie an, was oft mit einer schlechten Prognose einhergeht. Eine Radiosensibilisierung der HPV-negativen Tumorzellen jedoch könnte zu einem besseren Ansprechen auf die Therapie und somit zu einem verbesserten Überleben der Patient:innen führen. Aus diesem Grund wurde der Ansatz der kombinierten Inhibition von PARP/Wee1 auch in HPV-negativen Zelllinien getestet; dabei wurden die gleichen Inhibitor-Konzentrationen wie für den HPV-positiven Zelllinien eingesetzt. Die Untersuchungen erfolgten in drei radioresistenten HPV-negativen Zelllinien (HSC4, SAS, UT-SCC-60A) [22, 118]. Wie in den HPV-positiven Zelllinien wurde mit dem Einfluss der dualen Inhibition auf Proliferation, Mitose und Zellzyklus begonnen. Anschließend wurden die Induktion von Replikationsstress, die Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest und die Anzahl residueller DSB untersucht.

### 4.2.1 Proliferation nach dualer Inhibition

Der Einfluss der Inhibition von PARP und Wee1 auf die Wachstumsgeschwindigkeit der drei HPV-negativen Zelllinien wurde an Tag eins, drei und fünf untersucht. Die Ergebnisse für die Zellzahl an Tag fünf sind in Abbildung 20 dargestellt. In allen drei Zelllinien zeigte sich unter Inhibitorbehandlung eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit. Es gibt keine Hinweise auf einen synergistischen Effekt der Inhibitoren.

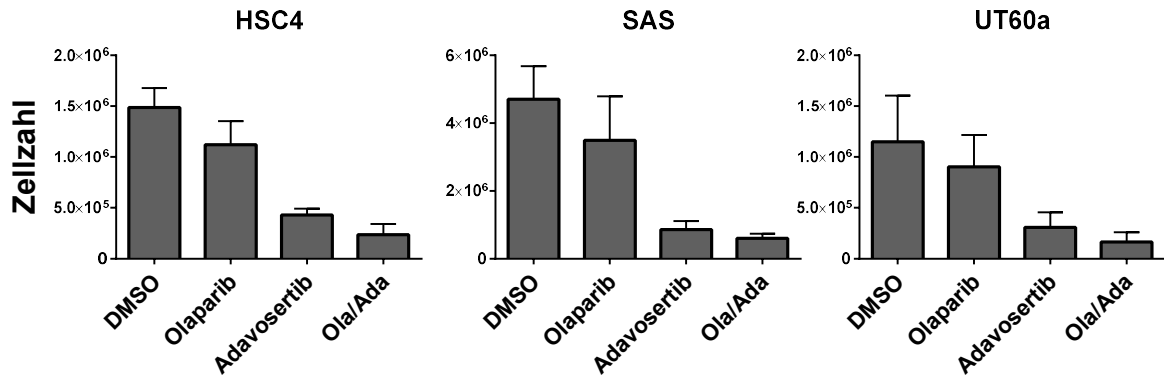


Abb. 20: Proliferation nach Inhibitorbehandlung (HPV-negativ). Gezeigt ist die Zellzahl an Tag fünf nach Inhibitorbehandlung.

#### 4.2.2 Fraktion mitotischer Zellen nach dualer Inhibition

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten HPV-negativen Zelllinien nach Bestrahlung nur einen schwach ausgeprägten  $G_2$ -Arrest ausbilden [22]. Dennoch soll der Einfluss der dualen Inhibition auf den  $G_2$ -Arrest im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Analog zu den HPV-positiven Zelllinien wurde dabei mit der Fraktion der mitotischen Zellen begonnen und die p-H3-positiven Zellen 5 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und 6 Gy quantifiziert. Aus Abbildung 21 ist zu erkennen, dass die Bestrahlung mit 6 Gy den Eintritt in die Mitose auch in den HPV-negativen Zellen fast vollständig blockiert und sich die Fraktion der p-H3-positiven Zellen auf fast null reduziert. Die Inhibition von Wee1 und die duale Inhibition von PARP/Wee1 konnte die Anzahl mitotischer Zellen in den drei Zelllinien zwar leicht erhöhen, aber in keiner der Zelllinien wieder auf das Ausgangsniveau der Kontrolle bei 0 Gy zurückbringen.

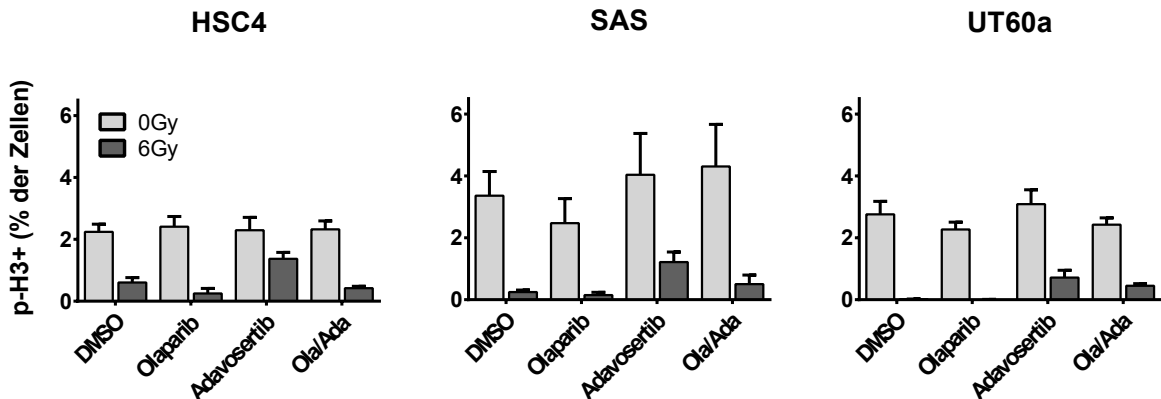


Abb. 21: Fraktion der mitotischen Zellen (HPV-negativ). Quantifizierung der p-H3 positiven Zellen in der Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden 2 h nach Inhibitorbehandlung mit 0 Gy und 6 Gy bestrahlt und 5 h später fixiert. Das *Gating* erfolgte analog zu den HPV-positiven Zellen in Abbildung 8 A. Gezeigt ist der Median der p-H3-Signalintensität.

Der Effekt der dualen Inhibition auf die Hemmung des G<sub>2</sub>-Arrestes war deutlich geringer als der Effekt der Wee1-Inhibition alleine. Im Unterschied zu den HPV-positiven Zelllinien hat eine Inhibition von Wee1 in den HPV-negativen Zelllinien nur einen sehr geringen Einfluss auf den S/G<sub>2</sub>-Kontrollpunkt und den Anteil der mitotischen Zellen.

### 4.2.3 Untersuchung des Zellzyklus

Aufgrund des schwach ausgeprägten G<sub>2</sub>-Arrestes erfolgte die Analyse der Zellzyklusverteilung in den HPV-negativen Zelllinien bereits 12 h nach Bestrahlung [22]. Die Ergebnisse der Zellzyklusverteilung sind in Abbildung 22 dargestellt. In allen drei Zelllinien zeigt sich nach Bestrahlung ein Anstieg an G<sub>2</sub>-Phase-Zellen; das Ausmaß des G<sub>2</sub>-Arrestes variiert allerdings zwischen den Zelllinien.

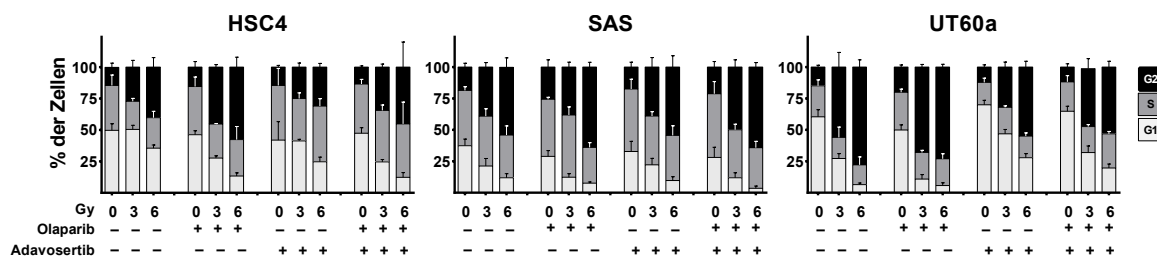


Abb. 22: Zellzyklus 12 h nach Bestrahlung (HPV-negativ). Analyse der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 2 h später mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy bestrahlt. Die Fixation erfolgte 12 h nach Bestrahlung.

Die Inhibition von Wee1 führt nur zu einer minimalen Reduktion des G<sub>2</sub>-Arrestes, nach dualer Inhibition ist diese sogar nur in den UT-SCC-60A erkennbar. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Mitose-Experimenten, bei denen der Anteil der mitotischen Zellen durch Wee1- und PARP/Wee1-Inhibition ebenfalls nur in geringem Maße gesteigert werden konnte (vgl. Abschnitt 4.2.2).

### 4.2.4 Replikationsstress: Messung der $\gamma$ H2AX-Signalintensität

Um den Replikationsstress nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung zu quantifizieren, erfolgte die Messung der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in der Durchflusszytometrie. Die drei HPV-negativen Zelllinien wurden mit den Inhibitoren behandelt und 2 h später mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy bestrahlt. Die Fixation erfolgte 24 h nach Bestrahlung. Das Gating der  $\gamma$ H2AX-positiven S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen wurde analog zu den HPV-positiven Zelllinien durchgeführt (vgl. Abbildung 11 A). Der prozentuale Anteil an S/G<sub>2</sub>-Phase mit hoher  $\gamma$ H2AX-Signalintensität nach Inhibitorbehandlung ist in Abbildung 23 dargestellt. Wie auch in den HPV-positiven Zelllinien ist in den HPV-negativen Zelllinien nach Wee1-Inhibition zu einem Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität zu beobachten. Die Kombination aus PARP- und Wee1-Inhibition führt in den drei Zelllinien zu keinem weiteren Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität im Vergleich zur alleinigen Wee1-Inhibition. Die Gabe von Olaparib führt nur in den HSC4 zu einem leichten Anstieg des Replikationsstressmarkers  $\gamma$ H2AX.

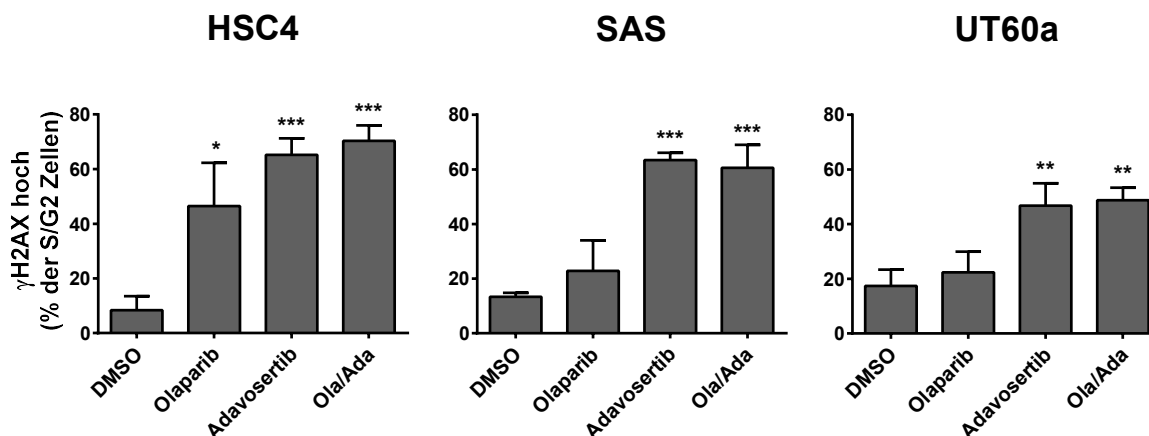


Abb. 23: **Intensität der  $\gamma$ H2AX-Färbung 26 h nach Inhibitorbehandlung (HPV-negativ)**. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 26 h später fixiert. Die Messung der  $\gamma$ H2AX-Intensität erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist die Quantifizierung des Anteils an S- und G<sub>2</sub>-Phase-Zellen mit hoher  $\gamma$ H2AX-Signalintensität. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001) markiert. In Abbildung A.17 im Anhang ist die  $\gamma$ H2AX-Signalintensität einschließlich der bestrahlten Proben dargestellt.

Eine Erweiterung des Versuches aus Abbildung 23 um die Daten der bestrahlten Proben findet sich in Abbildung A.17 im Anhang. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass die Bestrahlung nur einen geringen Einfluss auf die  $\gamma$ H2AX-Signalintensität hat. Zudem ist aus Abbildung A.17 auch die Heterogenität der Zelllinien in Bezug auf Behandlung und Bestrahlung erkennbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibition von Wee1 oder PARP/Wee1 in den HPV-negativen Zelllinien zu Replikationsstress führt; zusätzliche Bestrahlung erhöht diesen jedoch nicht weiter. Die Hemmung von PARP hat keinen nennenswerten Einfluss auf die  $\gamma$ H2AX-Signalintensität.

#### 4.2.5 Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest

Die Untersuchung der Radiosensibilisierung durch die duale Inhibition von PARP/Wee1 erfolgte auch in den HPV-negativen Zelllinien im *delayed-plating* Koloniebildungstest. Das Zellüberleben nach Einzel- und Kombinationsbehandlung mit den Inhibitoren und Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy ist in Abbildung 24 dargestellt. Aus Abbildung 24 ist in allen drei Zelllinien nach Behandlung mit den Inhibitoren eine Radiosensibilisierung erkennbar. Auch unter Einzelbehandlung ist das Zellüberleben verringert, am deutlichsten ist die Radiosensibilisierung jedoch für die kombinierte Inhibition von PARP/Wee1. Der größte Effekt der dualen Inhibition ist in den SAS zu erkennen, aber auch für die UT-SCC-60A zeigt sich nach Bestrahlung mit 6 Gy noch eine statistisch signifikante Radiosensibilisierung. Die PE für die HPV-negativen Zelllinien findet sich in Abbildung A.18 im Anhang.



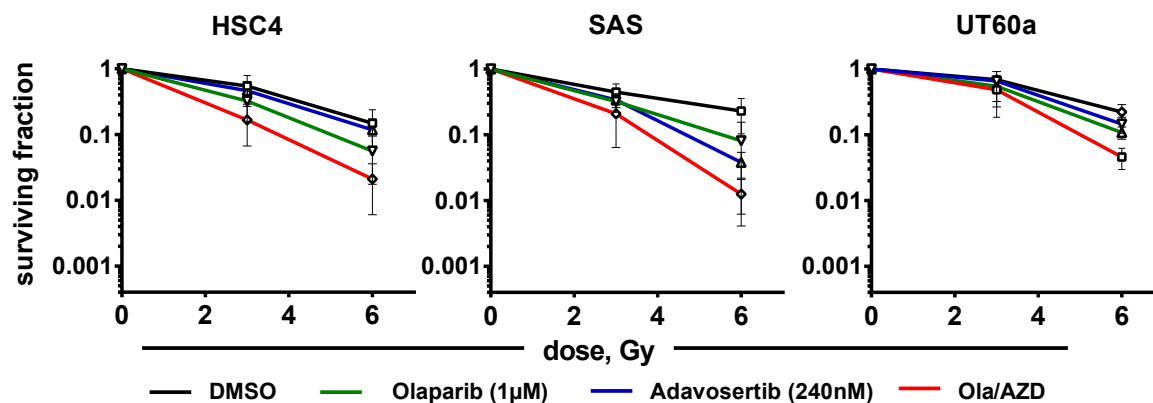


Abb. 24: Überleben im *delayed-plating* Koloniebildungstest (HPV-negativ). Radiosensibilisierung der Zellen nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy.

#### 4.2.6 Residuelle Doppelstrangbrüche in der Immunfluoreszenz

Um die Ursachen der im Koloniebildungstest beobachteten Radiosensibilisierung nach dualer Inhibition näher zu untersuchen, erfolgte die Auszählung residueller DSB in der IF. Die drei HPV-negativen Zelllinien wurden mit den Inhibitoren behandelt und 2 h später mit 0 Gy und 2 Gy bestrahlt. Die Fixation erfolgte 24 h nach Bestrahlung. Da in den HPV-negativen Zelllinien nach Wee1- und PARP/Wee1-Inhibition nur geringe Veränderungen des Zellzyklus festgestellt wurden, erfolgte keine Anfärbung des Zellzyklusmarkers Geminin. Stattdessen wurden die beiden DSB-Marker 53BP1 und  $\gamma$ H2AX eingesetzt. In Abbildung 25 A ist die IF-Färbung exemplarisch für HSC4-Zellen dargestellt.

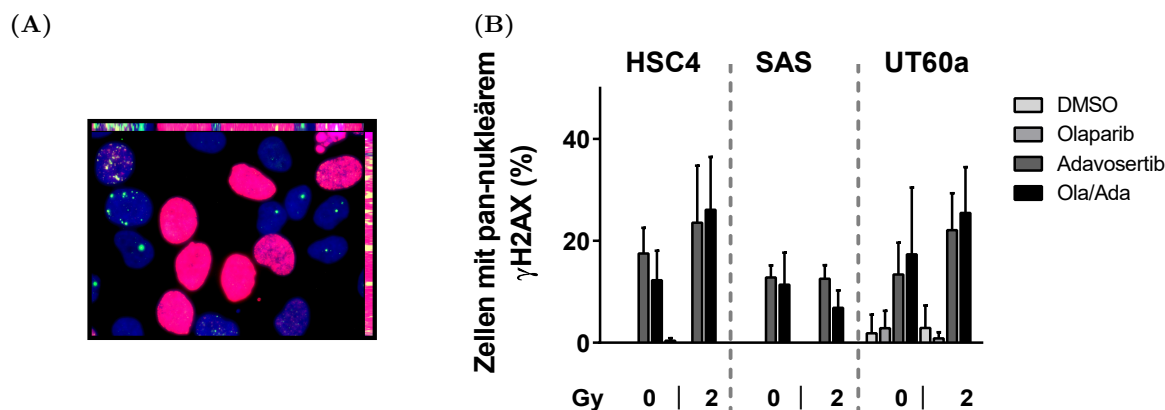


Abb. 25: Färbung und Quantifizierung pan-nukleär gefärbter  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen (HPV-negativ). Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 2 h später mit 2 Gy bestrahlt. Die Fixation erfolgte 24 h nach Bestrahlung. (A): Beispielbild der IF-Färbung in HSC4 Zellen. Die Zellkerne sind in DAPI blau eingefärbt, die 53BP1 Foci in grün und  $\gamma$ H2AX in rot. (B): Quantifizierung der Zellen mit pan-nukleärer  $\gamma$ H2AX-Färbung.

Die Zellkerne sind in blau, die 53BP1 Foci in grün und die  $\gamma$ H2AX-Färbung in rot erkennbar. Nach der Inhibition von Wee1 und PARP/Wee1 zeigten auffällig viele Zellen nicht, wie erwartet, singuläre  $\gamma$ H2AX Foci, sondern einen vollständig  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkern. Diese Zellen mit einer pan-nukleären Färbung sind als rote Kerne in Abbildung 25 A erkennbar. Ursache für diese pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Färbung ist erhöhter Replikationsstress in den S-Phase-Zellen. Die Quantifizierung dieser  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkerne ist in Abbildung 25 B dargestellt und bestätigt die Ergebnisse der Messungen im Durchflusszytometer, in denen ebenfalls ein Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Intensität zu beobachten war (vgl. Abbildung A.17). Aufgrund der hohen Anzahl an  $\gamma$ H2AX pan-nukleär gefärbter Kerne war eine Auszählung der kolokalisierten 53BP1/ $\gamma$ H2AX Foci nicht möglich; es erfolgte daher ausschließlich die Quantifizierung der residuellen 53BP1 Foci. Die Auszählung wurde einmal einschließlich der  $\gamma$ H2AX pan-nukleär-positiven Zellen und einmal ohne diese durchgeführt. Aus Abbildung 26 ist zu erkennen, dass bereits die Einzelbehandlungen mit den Inhibitoren in den HPV-negativen Zelllinien zu einem Anstieg residueller Reparaturfoci führen. Der stärkste Anstieg residueller DSB kann allerdings für die kombinierte PARP/Wee1-Inhibition beobachtet werden. Ob die  $\gamma$ H2AX pan-nukleären Kerne in die Auswertung mit einbezogen werden, führt nur zu geringen Unterschieden in der Auswertung.

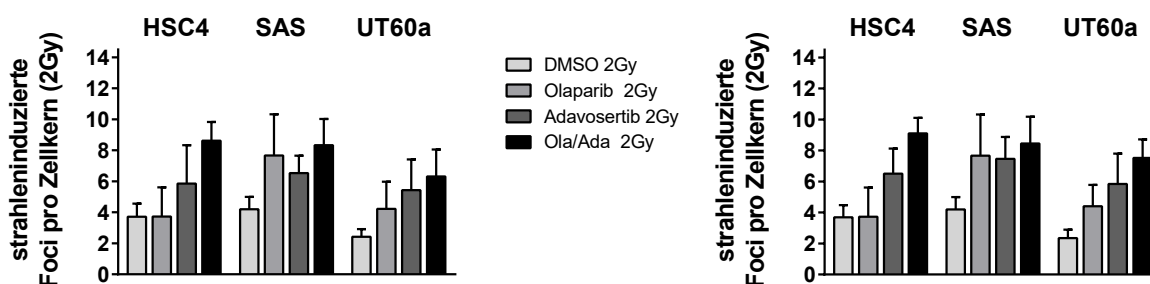


Abb. 26: **Residuelle 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-negativ)**. Quantifizierung residueller 53BP1 Reparaturfoci mittels IF. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 2 h später mit 2 Gy bestrahlt. Die Fixation erfolgte 24 h nach Bestrahlung.

Wie auch in den HPV-positiven Zelllinien erfolgte eine Analyse der nur gering geschädigten Zellen; dafür wurden die Kerne mit maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen 53BP1 Foci quantifiziert. Die nur wenig geschädigten Zellen sind für das Zellüberleben von besonderer Bedeutung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt; in der linken Abbildung einschließlich der  $\gamma$ H2AX pan-nukleären Kerne, rechts ohne diese. Nach dualer Inhibition zeigt sich eine deutliche Abnahme der nur gering geschädigten Zellen in allen drei Zelllinien. Auch die Einzelgabe der Inhibitoren führt zu einer Abnahme der Zellen mit maximal drei Foci, allerdings variiert hierbei der Effekt der Inhibitoren zwischen den Zelllinien. Abschließend erfolgte in den HPV-negativen Zelllinien die Betrachtung der am stärksten geschädigten Zellen, da diese für das Zellüberleben von besonderer Bedeutung ist. In Abbildung A.20 im Anhang ist die Anzahl der Kerne mit mindestens 20 ( $\geq 20$ ) Foci dargestellt. Auch hier zeigt sich ein geringer Anstieg der stark geschädigten Zellen nach den Einzelbehandlungen und die duale Inhibition hat in allen drei Zelllinien den stärksten Effekt und führt zu einem deutlichen Anstieg an stark geschädigten Zellen.

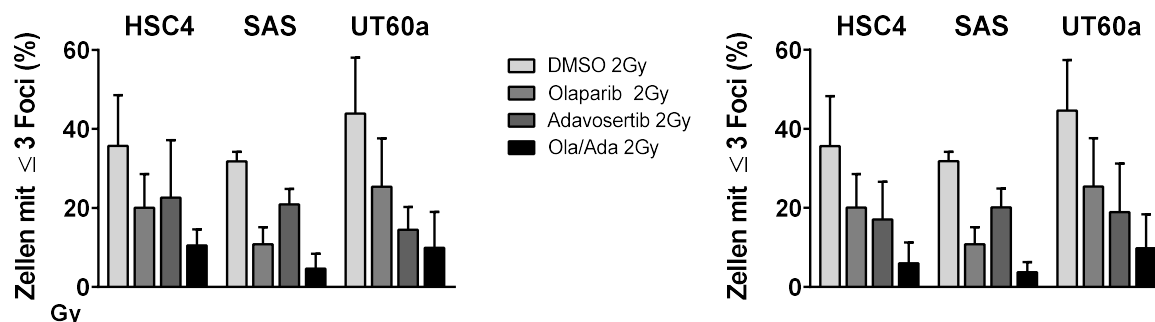


Abb. 27: Anteil der Zellen mit maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen 53BP1 Foci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-negativ). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen mit maximal drei residuellen 53BP1 Foci. In der linken Abbildung sind die pan-nukleär gefärbten Kerne in die Auswertung eingezogen, in der rechten Abbildung sind diese Kerne aus der Auswertung ausgeschlossen. Zwischen den beiden Möglichkeiten der Auswertung zeigen sich nur geringe Unterschiede.

#### 4.2.7 Reduktion des Replikationsstress nach Nukleosid-Zugabe

Auch in den HPV-negativen Zelllinien konnte nach Inhibition von Wee1 und PARP/Wee1 ein Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität gemessen werden, was auf erhöhten Replikationsstress hindeutet. Allerdings zeigte die Inhibition von Wee1 nur einen sehr geringen Einfluss auf die Intra-S/G<sub>2</sub>-Kontrollpunkte und die Fraktion mitotischer Zellen erhöhte sich nach der Inhibition von Wee1 oder dualer PARP/Wee1-Inhibition nur geringfügig.

Analog zu den HPV-positiven Zelllinien wurde auch in den HPV-negativen Zelllinien untersucht, inwieweit die Zugabe von Nukleosiden den Replikationsstress reduzieren kann. Die Untersuchung der Induktion von Replikationsstress nach Nukleosid-Zugabe erfolgte mittels Messung der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in der Durchflusszytometrie. Die Zugabe der Nukleoside zu den Zellen erfolgte zeitgleich mit der Inhibitor-Zugabe, die Fixation 4 h später. Das *Gating* zur Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-positiven S-Phase-Zellen erfolgte analog zu den HPV-positiven Zelllinien (vgl. Abbildung 17 A). Der Median der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in den Zellen der mittleren S-Phase nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe ist in Abbildung 28 dargestellt. Im Unterschied zu den HPV-positiven Zelllinien lässt sich der Replikationsstress nach Wee1- und PARP/Wee1-Inhibition durch die Zugabe von Nukleosiden in den HPV-negativen Zellen kaum reduzieren. Aus Abbildung 28 ist nur in den HSC4 Zellen nach Nukleosid-Zugabe und Wee1-Inhibition eine statistisch signifikante Reduktion der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in den Zellen der mittleren S-Phase zu beobachten.

Da 4 h nach Nukleosid-Zugabe kaum eine Reduktion des Replikationsstress erkennbar war, erfolgte eine weitere Messung zu einem späteren Zeitpunkt. Die  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in S-Phase-Zellen 24 h nach Nukleosid-Behandlung ist in Abbildung A.19 im Anhang gezeigt. Auch hier ist nur eine geringe Reduktion der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität nach Wee1-Inhibition und Nukleosid-Zugabe messbar.

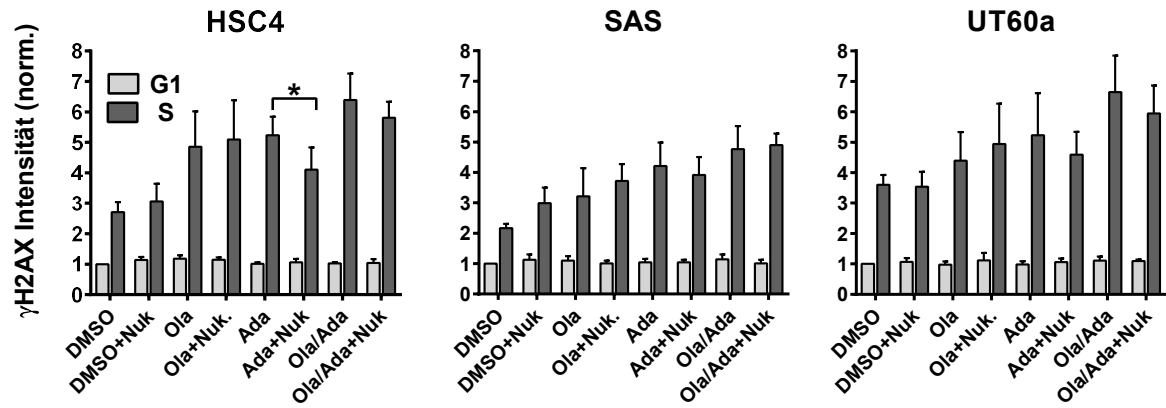


Abb. 28: Intensität der  $\gamma$ H2AX-Färbung 4 h nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe (HPV-negativ). Quantifizierung  $\gamma$ H2AX-positiver S-Phase-Zellen 4 h nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe. Die Normierung erfolgte auf die G<sub>1</sub>-Phase der unbehandelten Kontrolle. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001) markiert.

### 4.3 Vergleich der Ergebnisse von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien

Tabelle 12: **Vergleich der Ergebnisse von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien.** Übersicht der Ergebnisse zur Radiosensibilisierung HPV-positiver und HPV-negativer Zelllinien mittels Inhibition von PARP und Wee1.

Versuch	HPV-positiv	HPV-negativ
<b>Fraktion mitotischer Zellen</b>	Bestrahlung mit 6 Gy unterdrückt Mitose fast vollständig. Inhibition von Wee1 und PARP/Wee1 erhöht den Anteil mitotischer Zellen zum Teil über das Ausgangsniveau hinaus (Abschnitt 4.1.2).	Bestrahlung mit 6 Gy unterdrückt Mitose fast vollständig. Inhibition von Wee1 und PARP/Wee1 erhöht den Anteil mitotischer Zellen hingegen kaum (Abschnitt 4.2.2).
<b>Zellzyklus</b>	Ausgeprägter G <sub>2</sub> -Arrest nach Bestrahlung; Reduktion durch Inhibition von Wee1 und PARP/Wee1. Zunahme von S-Phase-Zellen (Abschnitt 4.1.3).	Schwach ausgeprägter G <sub>2</sub> -Arrest nach Bestrahlung; kaum Reduktion durch Inhibition von Wee1 und PARP/Wee1 (Abschnitt 4.2.3).
<b>Replikationsstress</b>	Inhibition von Wee1 führt zu einem starkem Anstieg der $\gamma$ H2AX-Signalintensität in S/G <sub>2</sub> -Phase-Zellen. Duale Inhibition von PARP/Wee1 erhöht den Anteil der $\gamma$ H2AX-positiven Zellen allerdings nicht weiter (Abschnitt 4.1.4).	Inhibition von Wee1 führt zu einem Anstieg der $\gamma$ H2AX-Signalintensität in S/G <sub>2</sub> -Phase-Zellen. Duale Inhibition von PARP/Wee1 erhöht den Anteil der $\gamma$ H2AX-positiven Zellen nicht weiter (Abschnitt 4.2.4).
<b>Radiosensibilisierung</b>	Ausgeprägte Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest; stärkster Effekt für die duale Inhibition (Abschnitt 4.1.5).	Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest; stärkster Effekt für die duale Inhibition (Abschnitt 4.2.5).

<b>Residuelle DSB</b>	Anzahl residueller Reparaturfoci erhöht sich nach PARP/Wee1-Inhibition nicht. Verschiebung der residuellen Foci von der G <sub>2</sub> - in die G <sub>1</sub> -Phase; dies ist ein Hinweis für die Passage durch die Mitose trotz unreparierter DSB. Zahl der Zellen mit maximal drei residuellen Foci verringert sich nach der dualen Inhibition (Abschnitt 4.1.6).	Anzahl residueller Reparaturfoci erhöht sich nach PARP/Wee1-Inhibition; zudem verringert sich die Zahl der Zellen mit maximal drei residuellen Foci (Abschnitt 4.2.6).
<b>Replikationsstress (nach Nukleosiden)</b>	Zugabe von Nukleosiden reduziert den Replikationsstress nach Wee1- und nach PARP/Wee1-Inhibition (Abschnitt 4.1.7).	Zugabe von Nukleosiden reduziert den Replikationsstress nach Wee1- und nach PARP/Wee1-Inhibition nicht (Abschnitt 4.2.7).
<b>Radiosensibilisierung (nach Nukleosiden)</b>	Nukleoside verringern den radiosensibilisierenden Effekt der Wee1-Inhibition. Nach dualer Inhibition ist dieser Effekt nur noch in den UD-SCC-2 zu beobachten. Induktion von Radioresistenz in der unbehandelten Kontrolle zu beobachten (Abschnitt 4.1.7).	Da Nukleoside den Replikationsstress nicht zuverlässig reduzieren konnten, erfolgten keine Untersuchungen zur Radiosensibilisierung nach Nukleosid-Zugabe.

---

#### 4.4 Validierung der Daten aus der Zellkultur in *ex vivo* Gewebeschnitten

Bisher beruhen die Nachweise der Radiosensibilisierung von Kopf-Hals-Tumorzelllinien in der Literatur weitgehend auf etablierten HNSCC-Zelllinien. Vor allem im Fall von HPV-positiven HNSCC-Zelllinien gibt es nur wenige und meist stammen diese nicht aus dem Oropharynx. Zudem zeigt sich immer wieder, dass sich die Ergebnisse aus der Zellkultur nicht zuverlässig in die Klinik übertragen lassen. Um die Ergebnisse aus der Zellkultur zu validieren, wurde die Wirkung der dualen Inhibition auch in HPV-positiven und HPV-negativen *ex vivo* Gewebeschnitten untersucht. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Zech durchgeführt [95]. Dafür wurden die *ex vivo* Gewebeschnitte mit der Kombination aus PARP/Wee1-Inhibition behandelt und 2 h später mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy bestrahlt. Die Fixation der Gewebeschnitte erfolgte 24 h nach Bestrahlung, um die Anzahl residueller DSB zu analysieren. Zusätzlich wurde eine Probe bereits 2 h nach Bestrahlung

fixiert, um die Induktion von DSB zu überprüfen. Anschließend erfolgte die IF-Färbung in 5  $\mu$ m Kryoschnitten des Gewebes. Dabei wurden die Tumorzellen über den Tumormarker p63 und die residuellen DSB als 53BP1 Reparaturfoci detektiert. In Abbildung 29 ist ein Beispiel der Gewebeschnitte 24 h nach Bestrahlung mit 3 Gy gezeigt.

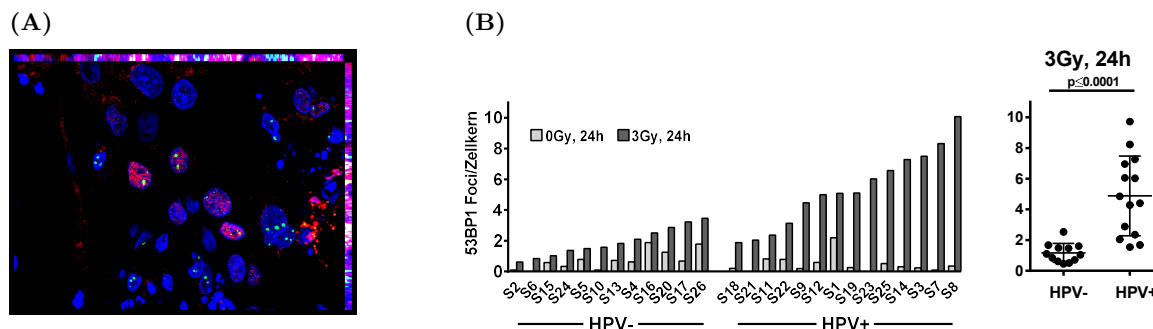


Abb. 29: **Quantifizierung residueller 53BP1 Reparaturfoci nach Bestrahlung in *ex vivo* Gewebeschnitten.** (A): Beispielbild der Färbung eines *ex vivo* Gewebeschnittes 24 h nach Bestrahlung mit 3 Gy: Die Zellkerne sind mittels DAPI in blau angefärbt, die Tumorzellen wurden mit dem Tumormarker p63 (rot) markiert. Die 53BP1 Foci sind in grün erkennbar. (B): Quantifizierung residueller 53BP1 Reparaturfoci in HPV-positiven und HPV-negativen *ex vivo* Gewebeschnitten 24 h nach Bestrahlung mit 3 Gy. Die HPV-positiven *ex vivo* Gewebeschnitte weisen nach Bestrahlung mit 3 Gy eine signifikant höhere Anzahl residueller 53BP1 Foci auf. Die Versuche zur Quantifizierung residueller 53BP1 Foci wurden zum Teil von Dr. H. Zech durchgeführt.

In Abbildung 29 A ist ein Beispielbild der IF-Färbung gezeigt. Darin sind die 53BP1 Foci in grün erkennbar, bei den rot eingefärbten Zellkernen handelt es sich um p63-positive Zellkerne. Diese sind Tumorzellen, welche zudem häufig größer und stärker deformiert sind als die Zellen des Normalgewebes. Im unteren Bildrand in Abbildung 29 A sind p63-negative Zellkerne des Normalgewebes zu erkennen. In Abbildung 29 B ist die Quantifizierung der 53BP1 Foci für HPV-negative und HPV-positive *ex vivo* Gewebeschnitte nach Bestrahlung mit 3 Gy aufgetragen. Die Tumorproben der Patient:innen sind in der Abbildung 29 B mit S1 bis S26 benannt. Die HPV-positiven Tumore weisen nach Bestrahlung mit 3 Gy, bei großer Varianz, eine im Durchschnitt erheblich höhere Anzahl residueller Foci auf als die HPV-negativen (s. Abbildung 29 C). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Experimenten in Zellkultur und die Beobachtungen aus der Klinik, da in HPV-positiven HNSCC wiederholt ein DNA-Reparaturdefekt nachgewiesen werden konnte, der mit einer erhöhten Anzahl residueller DSB einhergeht [22]. In Abbildung 30 ist die Anzahl residueller 53BP1 Foci nach dualer Inhibition von PARP/Wee1 dargestellt. In dieser Abbildung sind weniger Patient:innenproben dargestellt als in Abbildung 29, da nicht von jedem Tumor ausreichend Material für alle Versuchsansätze vorhanden war. Aus Abbildung 30 zeigt sich, dass die duale Inhibition in vier von sechs HPV-negativen Tumoren zu einem klaren Anstieg residueller 53BP1 Foci führt, während dies in einem Großteil der HPV-positiven Tumoren nicht der Fall ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate aus der Zellkultur: In den HPV-positiven

Zellen war dort ebenfalls kein Anstieg der residuellen Focizahl nach dualer Inhibition erkennbar, sondern es kam zu einer Verschiebung der residuellen 53BP1 Foci von der S/G<sub>2</sub>-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase (vgl. Abbildung 15). In den HPV-negativen Zelllinien hingegen war ein Anstieg der absoluten Foci-Zahl messbar (vgl. Abbildung 26); dieser ist auch in der Mehrzahl der *ex vivo* Gewebeschnitten zu beobachten.

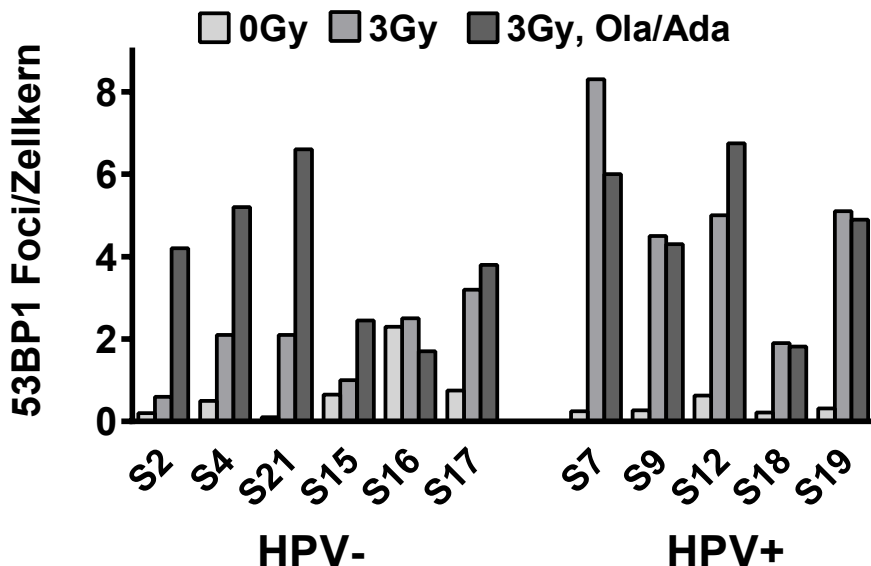


Abb. 30: Residuelle 53BP1 Reparaturfoci nach PARP/Wee1-Inhibition und Bestrahlung mit 3 Gy in *ex vivo* Gewebeschnitten. Die *ex vivo* Gewebeschnitte wurden mit der PARP/Wee1-Inhibition behandelt und 2 h später mit 3 Gy bestrahlt. Dargestellt sind die residuellen 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung.

Für die HPV-negativen Tumorproben, die nach der Inhibition von PARP/Wee1 keine erhöhte Anzahl residueller Reparaturfoci zeigen (vgl. Tumorprobe Nummer S16), ist zu vermuten, dass eine Radiosensibilisierung mittels dualer Inhibition nicht sinnvoll ist. Da alle untersuchten Zelllinien erhöhte Focizahlen und Radiosensibilisierung gezeigt haben, ist dies allerdings bisher noch nicht experimentell zu belegen. Trotzdem scheint bei der Auswahl von Patient:innen zur Tumorradiosensibilisierung Achtsamkeit geboten.

#### 4.5 Vergleich der manuellen und der automatisierten Auszählung in ImageJ

Die Auszählung residueller Reparaturfoci ermöglicht es, die Schädigungen ionisierender Strahlung in Form der entstandenen DSB zu quantifizieren. Eine manuelle Auszählung der Reparaturfoci, wie sie auch in der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurde, ist jedoch sehr zeitintensiv. Das Ergebnis wird zudem durch den Beobachter beeinflusst, da die Entscheidung welche Zellen in die Auswertung einbezogen und auch der Grenzwert der minimalen Größe residueller Foci subjektiv sind. Dies führt zu mangelnder Reproduzier-



barkeit und Problemen beim Vergleich der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren und Arbeitsgruppen. Eine automatisierte Auszählung könnte ein Zeitersparnis bei der Quantifizierung residueller DSB und eine verbesserte Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglichen. Im Rahmen dieser Dissertation soll daher untersucht werden, ob mit dem frei verfügbaren Programm ImageJ eine automatisierte Auszählung möglich ist und inwieweit diese Ergebnisse mit der manuellen Auswertung vergleichbar sind.

Das Feld der automatisierten Auszählung ist sehr komplex und eine Optimierung des Protokolls kann viel Zeit in Anspruch nehmen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher nur grundlegend untersucht, ob sich mit relativ einfachen Mitteln eine Vereinfachung und Vereinheitlichung der Auszählung erreichen lässt. Begonnen wurde dafür mit der automatisierten Auszählung der DAPI gefärbten Zellkerne in den drei HPV-positiven Zelllinien UD-SCC-2, UM-SCC-47 und UPCI-SCC-154. In den UM-SCC-47 erfolgte anschließend eine automatisierte Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci. Die Bearbeitung der Bilder sowie das Erstellen der Schnittbilder erfolgte in der AxioVision Software. In diesem Programm wurden die Zellkerne und Foci auch manuell ausgezählt. Die automatisierte Auszählung von Zellkernen und Reparaturfoci erfolgte dann in dem Programm ImageJ. Das detaillierte Vorgehen ist im Protokoll A.8.5 im Anhang beschrieben.

#### 4.5.1 Automatisierte Auszählung der Zellkerne

Für den Vergleich von manueller und automatisierter Auszählung der DAPI gefärbten Zellkerne wurden je Zelllinie fünf Bilder der unbehandelten Kontrolle genutzt. Die Ergebnisse der automatisierten Auszählung der Zellkerne sind in Abbildung 31 für die drei Zelllinien dargestellt.

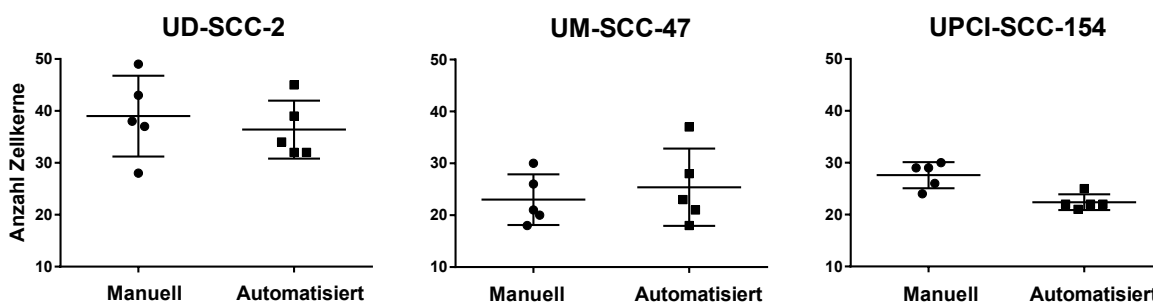


Abb. 31: Vergleich der manuellen und automatisierten Auszählung der Zellkerne.

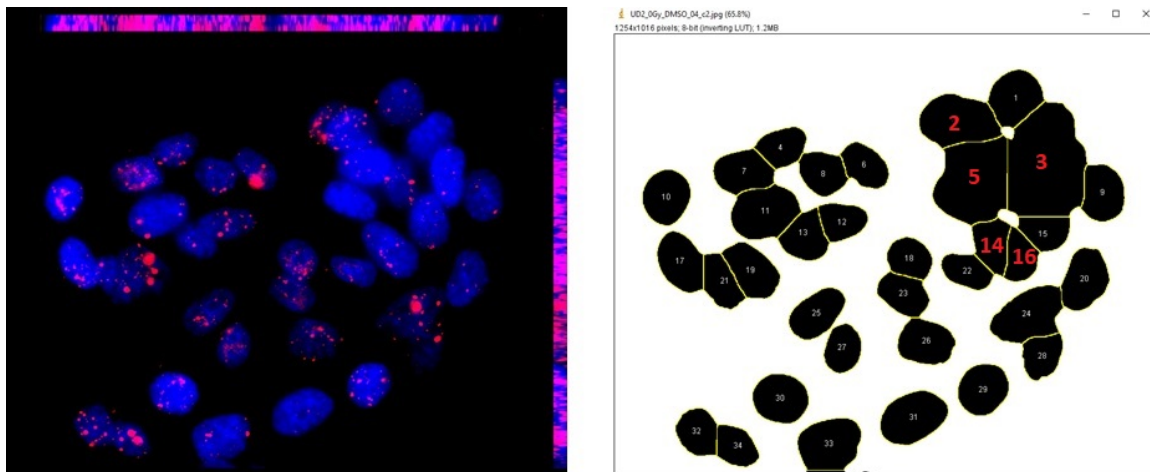
Die Auszählung der DAPI gefärbten Zellkerne erfolgte in jeweils fünf Bildern der unbehandelten Kontrolle in den drei HPV-positiven Zelllinien. In der Abbildung sind Mittelwert und SD der Ergebnisse von manueller und automatisierter Auszählung eingezeichnet.

Aus Abbildung 31 zeigt sich, dass die automatisierte Auszählung in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich gut funktioniert. Die größte Differenz zwischen der manuellen und der automatisierten Auszählung zeigt sich in den UPCI-SCC-154. Die manuell bestimmte Zellzahl liegt im Mittel etwa 18% höher als die automatisch ausgezählte Zellzahl. Eine mögliche Ursache für die starke Abweichung ist, dass es sich bei den UPCI-SCC-154 um

## 4 Ergebnisse

eine besonders dicht wachsende Zelllinie handelt und sich die Zellkerne oft überlappen. Ein Beispielbild der UPCI-SCC-154 ist in Abbildung A.21 A im Anhang gezeigt. Die Differenz von manueller und automatisierter Auszählung in den UD-SCC-2 und den UM-SCC-47 ist geringer und liegt bei etwa 11 % und 9 %. Aber auch hier führen fehlerhaft getrennte Zellkerne zu Abweichungen. Zwar wurde die Funktion *Watershed* in ImageJ genutzt, um die Zellen voneinander zu separieren, allerdings funktionierte dies nicht immer zuverlässig. In Abbildung 32 A ist ein Beispiel in den UD-SCC-2 zu sehen, in denen die Zellkerne nicht korrekt voneinander separiert werden konnten.

(A)



(B)

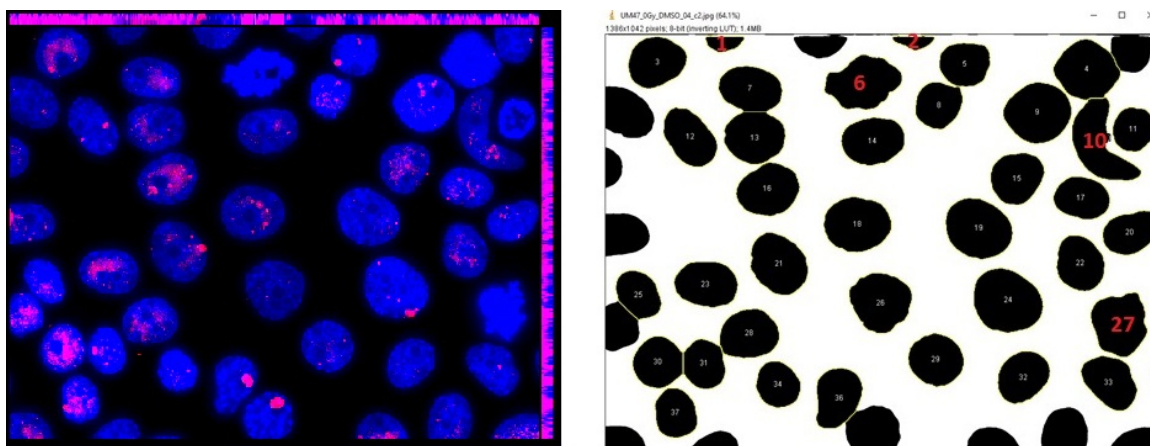


Abb. 32: **Beispiele für Fehlerquellen in der automatisierten Auszählung.** Die Bilder zeigen die unbehandelte Kontrolle. Links ist das Schnittbild aus AxioVision und rechts das binäre Bild der DAPI-Färbung aus ImageJ zu sehen. **(A)**: Es ist die fehlerhafte Separierung von Zellkernen in den UD-SCC-2 gezeigt. Dies ist z. B. an den Zellen mit den Nummern 2, 3 und 5 zu erkennen. **(B)**: Bereits abgestorbene Zellen werden von ImageJ als vitale Zelle erkannt und gezählt. Dieses Problem tritt insbesondere in den UM-SCC-47 auf und ist z. B. in den Zellen mit den Nummern 6 und 27 zu sehen.

Die Abbildung 32 zeigt Beispiele für Fehler bei der automatisierten Auszählung. Im oberen rechten Bildrand in Abbildung 32 A findet z. B. eine unzureichende Trennung der übereinander wachsenden Zellen statt (s. Zellen mit den Nummern 2, 3 und 5); allerdings werden auch einzelne Zellen fälschlicherweise in zwei geteilt (s. Zellen Nummer 14 und 16). Eine weitere Fehlerquelle sind angeschnittene Zellen am Bildrand. Teilweise werden diese Zellen in die automatisierte Auszählung einbezogen, selbst wenn die Einstellung *Exclude on edges* ausgewählt ist. Dies ist z. B. in den Zellen Nummer 1 und Nummer 2 in Abbildung 32 B zu sehen. Die angeschnittene Zelle zwischen diesen beiden Zellen hingegen wurde bei der automatisierten Auszählung nicht berücksichtigt. Auch abgestorbene Zellen oder Zellen in der Mitose werden bei der automatisierten Auszählung nicht immer als solche erkannt. Im Originalbild in Abbildung 32 B ist deutlich zu erkennen, dass es sich bei der Zelle Nummer 6 um eine nicht mehr vitale Zelle handelt. Auch bei der Zelle Nummer 27 ist zu erkennen, dass diese sich entweder in der Mitose befindet oder bereits tot ist; bei Erstellen der binären Abbildung in ImageJ geht diese Information jedoch verloren. Ein ähnliches Problem besteht auch bei Bildartefakten, wie z. B. im oberen rechten Rand (Zelle Nummer 10) in Abbildung 32 B; in solchen Fällen ist eine manuelle Kontrolle notwendig.

Aus Abbildung 31 ist zu erkennen, dass sich für die UM-SCC-47 die geringste Differenz zwischen manueller und automatisierter Auszählung ergibt. Die Zellen dieser Zelllinie sind relativ groß und wachsen vereinzelt, wodurch eine gute Separation der Zellkerne möglich ist. Daher erfolgte in dieser Zelllinie zusätzlich ein Vergleich von manueller und automatisierter Auszählung der Zellkerne in jeweils fünf Bildern der behandelten Proben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 A dargestellt.

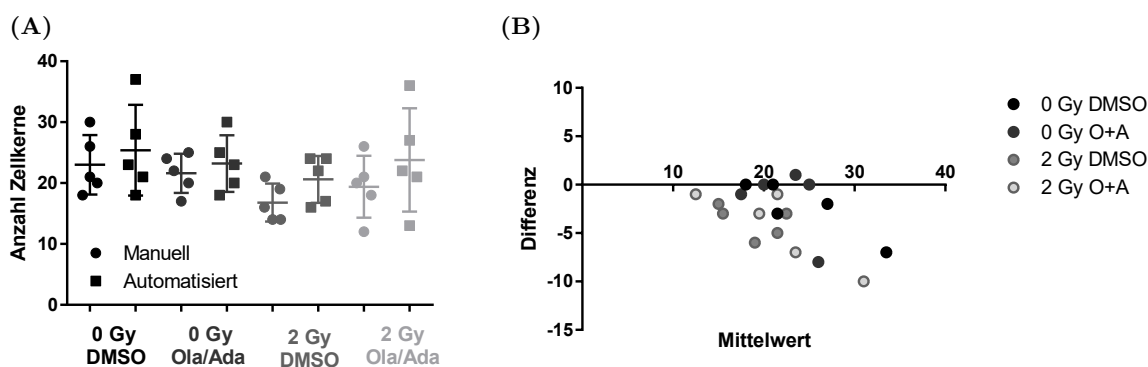


Abb. 33: Vergleich der manuellen und automatisierten Auszählung der Zellkerne in den UM-SCC-47. Die Auszählung erfolgte je in fünf Bildern der einzelnen Behandlungen. (A): Dargestellt sind Mittelwert und SD für die manuelle und automatisierte Auszählung. (B): Bland-Altman-Diagramm zum Vergleich von manueller und automatisierter Auszählung der Zellkerne.

Aus Abbildung 33 A ist zu erkennen, dass die Zellzahl, die sich aus der automatisierten Auszählung ergibt, in der Regel höher liegt als die manuell bestimmte Zellzahl. In Abbildung 33 B ist ein Bland-Altman-Diagramm zum Vergleich der manuellen und der automatisierten Auszählung in den UM-SCC-47 aufgetragen. Bland-Altman-Diagramme können genutzt werden, um eine neue mit einer etablierten Messmethode zu vergleichen [119]. Da-

für wird die Differenz ( $x_i - y_i$ ) eines Messergebnisses, das mit den zwei Messmethoden  $x$  und  $y$  gemessen wurde, über dem Mittelwert der Messergebnisse  $(x_i + y_i)/2$ . Aus der mittleren Differenz ergibt sich der Bias der beiden Messmethoden. In der Regel werden im Bland-Altman-Diagramm noch die *Limits of Agreement* angegeben, die sich aus der mittleren Differenz  $\pm 1.96 \cdot SD$  berechnen [119]. Da in Abbildung 33 B die Ergebnisse unter verschiedenen Versuchsbedingungen dargestellt sind, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit darauf verzichtet. Der Bias, die SD des Bias sowie die *Limits of Agreement* des Bland-Altman-Diagramms finden sich jedoch in der Tabelle A.6 im Anhang. Auch aus dem Bland-Altman-Diagramm in Abbildung 33 B zeigt sich besonders nach Behandlung und Bestrahlung eine Überschätzung der Zellkernzahl bei Einsatz der automatisierten Auszählung. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es in den behandelten Proben vermehrt zu toten Zellen und zur Entstehung von Mikronuklei kommt. Hierbei handelt es sich um extra-nukleäre Zellkerne, die nach der Zellteilung nicht mehr in die Tochterkerne integriert worden sind. Häufig sind Mikronuklei ein Zeichen für Schädigungen der DNA [120]. Ein Beispiel für Mikronuklei in den UM-SCC-47 findet sich in Abbildung A.21 B im Anhang. Indem der Grenzwert für die minimale Zellgröße heraufgesetzt wird, ist es möglich, die Anzahl an Mikronuklei, die in die Zellkernzählung einbezogen werden, zu reduzieren. Die automatisierte Bestimmung der Zellzahl fand in der vorliegenden Arbeit nicht vollautomatisiert statt; die Einstellung des Grenzwertes (*Threshold*) für die DAPI-Färbung erfolgte separat für jedes Bild. Bei einer Optimierung des Protokolls ist es allerdings möglich, den Grenzwert automatisiert über ein Skript setzen zu lassen. In ImageJ können dafür verschiedene Programmiersprachen genutzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist dies jedoch nicht geschehen, da es hier nur um ein Austesten der Machbarkeit ging. Falls sich die Färbeintensitäten in den einzelnen Bildaufnahmen unterscheiden, kann ein festgelegter Grenzwert allerdings auch zu Problemen führen.

### 4.5.2 Automatisierte Auszählung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci

Im Anschluss an die automatisierte Zellkernzählung erfolgte eine automatisierte Auszählung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci. Besonders bei stark geschädigten Zellen ist die manuelle Auszählung der Reparaturfoci aufwendig und zeitintensiv. Da die automatisierte Zellkernzählung in den UM-SCC-47 die besten Ergebnisse lieferte, erfolgte die Auszählung der Foci ebenfalls in dieser Zelllinie. Dabei wurde die manuelle Auszählung mit zwei Methoden der automatisierten Auszählung verglichen; eingesetzt wurden die *Find Maxima* Funktion und die Funktion *Analyze Particles*. Eine detaillierte Beschreibung beider Methoden findet sich im Protokoll A.8.5 im Anhang. Je Behandlungsansatz wurden die Reparaturfoci in fünf Bildern sowohl manuell als auch automatisiert ausgezählt.

Die mittlere Anzahl residueller 53BP1 Reparaturfoci pro Zellkern ist in Abbildung 34 A für die manuelle Auszählung und für die *Find Maxima* Methode gezeigt. Die Angabe der Focizahl erfolgte pro Zellkern; es wurde für die automatisierte Foci Zählung die automatisiert ausgezählte Zellzahl genutzt. Aus Abbildung 34 zeigt sich, dass die manuell ausgezählte Focizahl insbesondere in den mit 2 Gy bestrahlten Proben über der automatisiert bestimmten Focizahl liegt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in den behandelten Zellen bereits in der automatisierten Zellkernzählung eine falsch hohe Zellzahl bestimmt wurde, die zum Teil durch Mikronuklei verursacht wurde.

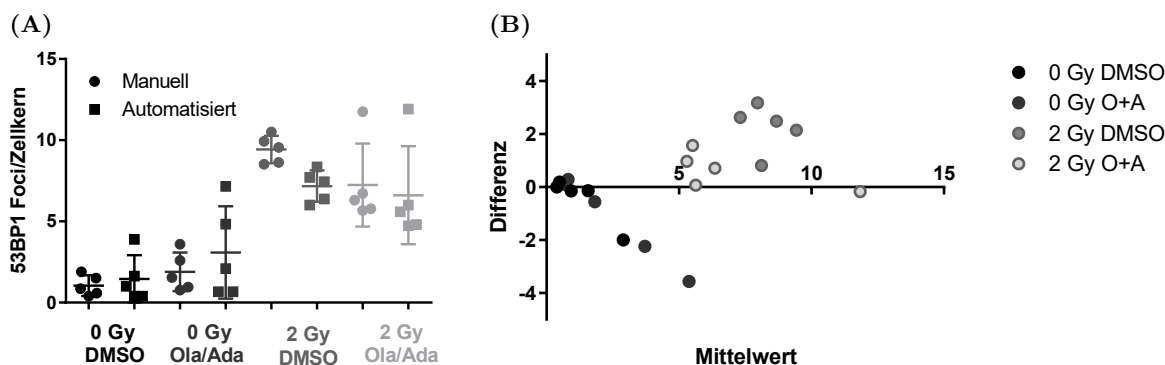


Abb. 34: Vergleich der manuellen und automatisierten Auszählung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UM-SCC-47. Die Auszählung der residuellen Reparaturfoci erfolgte in je fünf Bildern pro Behandlung mit der Methode *Find Maxima*. Für den Vergleich wurde die automatisch bestimmte Zellzahl genutzt. (A): Eingezeichnet sind Mittelwert und SD von manuell und automatisiert bestimmter Anzahl residueller Reparaturfoci. (B): Bland-Altman-Diagramm zum Vergleich der manuellen Auszählung der Reparaturfoci mit der automatisierten Auszählung bei Nutzung der Methode *Find Maxima*.

In den Mikronuklei befinden sich häufig keine residuellen Foci, wodurch sich die mittlere Anzahl residueller Foci/Zellkern verringert. In Abbildung 34 B ist ein Bland-Altman-Diagramm zum Vergleich der manuellen Auszählung mit der automatisierten Auszählung über die *Find Maxima* Methode gezeigt. Auch hier ist die systematische Unterschätzung der automatisierten Auszählung in den behandelten Proben erkennbar. Die Werte für Bias, SD des Bias und die *Limits of Agreement* finden sich in Tabelle A.7 im Anhang. Anschließend erfolgte die automatisierte Auszählung der residuellen Foci über die alternative Methode *Analyze Particles*. Es wurde dafür mit vier verschiedenen *Thresholds* gearbeitet, für eine Optimierung der Ergebnisse ist wahrscheinlich eine weitere Anpassung notwendig. Ein Beispiel für die Detektion der 53BP1 Reparaturfoci mit verschiedenen *Thresholds* und der Funktion *Analyze Particles* ist in Abbildung A.23 im Anhang gezeigt. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse für einen *Threshold* von 10–*Infinity* dargestellt, da sich bei hier bei manueller Kontrolle die beste Übereinstimmung zeigte.

Die Funktion *Find Maxima* hat den Vorteil, dass die Auszählung der residuellen Foci direkt im DAPI-Bereich der zuvor automatisch bestimmten Zellkerne erfolgt. Bei Nutzung von *Analyze Particles* ist eine direkte Zuordnung der Foci zu den jeweiligen Zellkernen nicht vollständig automatisiert möglich. Um dennoch einen direkten Vergleich der manuellen Auszählung mit den beiden Methoden der automatisierten Auszählung zu ermöglichen, wurde bei Angabe der residuellen 53BP1 Foci/Zellkern in Abbildung 35 für alle drei Methoden die manuell bestimmte Zellkernzahl genutzt. Aus Abbildung 35 zeigen sich bei Einsatz von *Analyze Particles* größere Abweichungen zur manuellen Auszählung als bei Einsatz der *Find Maxima* Methode. Die Anzahl residueller 53BP1 Reparaturfoci liegt bei der *Analyze Particles* Methode deutlich über den manuellen Zahlen. Die Bland-Altman-Diagramme zum Vergleich der manuellen Auszählung mit den beiden Methoden der automatisierten Auszählung finden sich in Abbildung A.22 im Anhang.

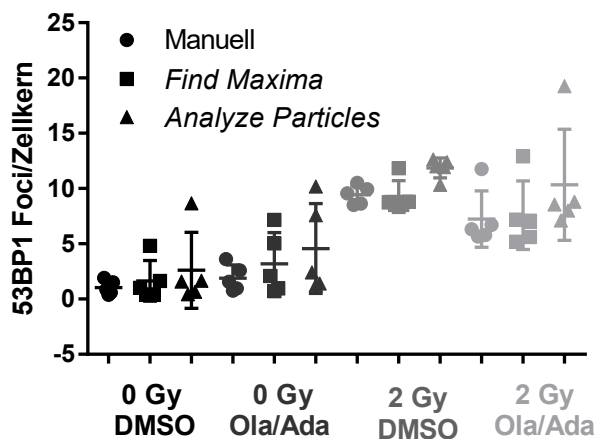


Abb. 35: Vergleich der manuellen Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit zwei Methoden der automatisierten Foci Auszählung. Die Auszählung erfolgte in jeweils fünf Bildern pro Behandlung. Dabei wurden die Reparaturfoci manuell und automatisiert mit den Methoden *Find Maxima* und *Analyze Particles* ausgezählt. In der Abbildung sind Mittelwert und SD eingezeichnet. Für alle Methoden wird die manuell bestimmte Zellkernzahl genutzt.

Die zu den Bland-Altman-Diagrammen zugehörigen Ergebnisse finden sich in Tabelle A.8 und Tabelle A.9. Wird anstelle der automatisiert bestimmten Zellzahl die manuell gezählte genutzt, kommt es zu einer deutlichen besseren Übereinstimmung zwischen der manuellen Auszählung und der *Find Maxima* Methode.

## 5 Diskussion

Die Strahlentherapie ist wesentlicher Bestandteil der multimodalen Therapie von HNSCC. Dabei stellen die Vielzahl an Risikoorganen und die hohe Funktionalität im Kopf-Hals-Bereich bei der Bestrahlungsplanung eine besondere Herausforderung dar. Eine Schonung des Normalgewebes ist nicht immer ausreichend möglich und die Spätnebenwirkungen der Bestrahlung sind oft schwer und irreversibel [51, 55]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Biologie wird zwischen HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC unterschieden. Die HPV-positiven HNSCC sind dabei mit einer deutlich besseren Prognose bei Behandlungen, die eine Strahlentherapie beinhalten, assoziiert. Zwar laufen aufgrund der hohen Toxizität der multimodalen Therapie und der besseren Prognose bei HPV-positiven HNSCC verschiedene Studien zur sicheren Deeskalation der Therapie, bisher ist der HPV-Status aber noch ohne therapeutische Auswirkung.

Eine grundlegende Möglichkeit die Nebenwirkungen im umliegenden Normalgewebe zu verringern, ist eine Reduktion der Strahlendosis. Aufgrund der hohen Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver HNSCC und des guten Ansprechens dieser Patient:innen auf die Strahlentherapie, gibt es inzwischen einige Untersuchungen und erste Ergebnisse klinischer Studien zur Dosisreduktion bei der Bestrahlung von HPV-positiven HNSCC [93]. Von Chera et al. wurde in einer Phase-2-Studie die Standardbehandlung aus Cisplatin plus Bestrahlung mit 70 Gy in HPV-positiven Patient:innen gegenüber einer Gruppe verglichen, die stattdessen mit Cisplatin plus Bestrahlung mit 60 Gy behandelt wurden. Dabei zeigten sich Hinweise auf eine reduzierte Toxizität bei ähnlich guter pathologischer Ansprechrate [121]. In einer weiteren Phase-2-Studie konnte in einer Gruppe von Patient:innen mit HPV-positiven OPSCC und moderatem Risiko, auch bei einer Reduktion der Dosis von 66 Gy auf 60 Gy bzw. 50 Gy in Kombination mit einer Operation ein vergleichbar gutes rezidivfreies-Überleben erreicht werden. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Patient:innen die mit 60 Gy oder 50 Gy behandelt wurden. Nur Patient:innen mit hohem Risiko erhielten in dieser Studie eine zusätzliche Chemotherapie zur Standardbestrahlung mit 66 Gy, Patient:innen mit niedrigem Risiko erhielten im Anschluss an die Operation keine weitere Therapie [122]. Eine Verringerung der Strahlendosis zur Reduktion der Toxizität ist für Patient:innen mit HPV-negativen HNSCC aufgrund der schlechteren Prognose keine Option, dennoch leiden auch diese Patient:innen unter den irreversiblen Nebenwirkungen der Strahlentherapie. Um die Nebenwirkungen der Strahlentherapie, trotz Beibehaltung der Dosis zu reduzieren, werden auch biologische Ansätze untersucht, um die Therapie von Patient:innen mit HNSCC zu verbessern und die Toxizität der multimodalen Therapie zu reduzieren. Dabei werden für Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC besonders Methoden der Deintensivierung untersucht, während für HPV-negative Patient:innen eine Verbesserung der Heilungsraten und eventuell eine Intensivierung der Therapie im Vordergrund steht.

Die Bedeutung der Immuntherapie in HNSCC hat während der letzten Jahre enorm zugenommen, allerdings sprechen nicht alle Patient:innen auf diese Form der Therapie an. Und in der bisher einzigen publizierten klinischen Studie zur Immuntherapie in Kombination mit Strahlentherapie, zeigte sich sogar ein Trend zu schlechterem Patient:innenüberleben bei Hinzunahme der Immuntherapie zur üblichen Radiochemotherapie [78–80]. Als einzige

weitere zielgerichtete Therapie zur Primärbehandlung von HNSCC ist der EGFR-Inhibitor Cetuximab zugelassen. Jedoch zeigte sich in drei Phase-3-Studien die Unterlegenheit von Cetuximab gegenüber Cisplatin, trotz Beibehaltung der vollen Dosis in der Strahlentherapie [73–75]. Insgesamt konnte keine klinische Studie den Nutzen, den die Zugabe von Cetuximab zur Radiotherapie in der Zulassungsstudie gezeigt hat, bestätigen [123]. Eine große Hürde bei der Etablierung einer deintensivierten Behandlung ist die starke Heterogenität innerhalb der Gruppe von HPV-positiven HNSCC. Trotz der durchschnittlich höheren Radiosensibilität HPV-positiver Tumore sprechen nicht alle Patient:innen gleich gut auf die Radiotherapie an. Auch wenn eine Deintensivierung der Therapie für HPV-positive Patient:innen von großer Dringlichkeit ist, führt dies bei der Durchführung von Studien zu Problemen. Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC haben mit der Standardtherapie eine gute Prognose, bei jedem Deintensivierungskonzept besteht hingegen das Risiko, Patient:innen nicht zu heilen, die unter Standardtherapie geheilt worden wären. Zum Beispiel ist eine Raucheranamnese ( $\geq 10$  Packungsjahre) ein unabhängiger Faktor für eine schlechte Prognose, weshalb diese Patient:innen häufig nicht in den Deintensivierungskonzepten eingeschlossen werden; so auch bei [73, 75]. Aber auch Tumorgröße, Alter und Lymphknotenbefall sowie weitere Faktoren haben Einfluss auf die Prognose [70, 124]. Bisher gibt es jedoch noch keine prädiktiven Biomarker, auf deren Basis die Therapieentscheidung für HNSCC-Patient:innen in Erweiterung zu den klinischen Parametern getroffen werden kann.

### 5.1 Radiosensibilisierung von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien

Um HNSCC-Tumorzellen zu radiosensibilisieren werden verschiedene Deintensivierungsansätze wie z. B. die Inhibition von DNA-Reparaturwegen oder der Zellzyklus-Kontrollpunkte untersucht [93, 125–127]. Dabei sind sowohl die Inhibition von PARP [76, 88] als auch die Inhibition des S/G<sub>2</sub>-Kontrollpunktes über die Inhibition von Wee1 [87, 128] bereits mehrfach erfolgreich zur Radiosensibilisierung von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC-Zellen eingesetzt worden. In einigen Tumorentitäten konnte auch für die kombinierte Inhibition von PARP/Wee1 eine Radiosensibilisierung erreicht werden [90, 92, 129, 130]. Bisher existieren allerdings außerhalb der von uns publizierten Daten zu HPV-positiven HNSCC-Zellen [99] noch keine Veröffentlichungen zur dualen Inhibition von PARP/Wee1 in HNSCC-Zelllinien. In der vorliegenden Dissertation erfolgte die Inhibition der DNA-Reparatur und der Zellzyklus-Kontrollpunkte mittels einer kombinierten Inhibition von PARP/Wee1. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die duale Inhibition sowohl in HPV-positiven als auch in HPV-negativen HNSCC-Zelllinien zu einer hochwirksamen Radiosensibilisierung führt (Abbildung 12 und Abbildung 24). Im Detail zeigten sich allerdings Unterschiede zwischen den HPV-positiven und den HPV-negativen Zelllinien. Während der G<sub>2</sub>-Arrest in den HPV-positiven Zelllinien nach Bestrahlung sowohl durch Wee1- als auch durch PARP/Wee1-Inhibition aufgehoben werden konnte, ist die Reduktion des G<sub>2</sub>-Arrestes in den HPV-negativen Zelllinien bei dualer Inhibition nur wenig ausgeprägt (Abbildung 8 und Abbildung 21). In den HPV-positiven Zelllinien zeigte sich nach Inhibition von Wee1 außerdem eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase, was auf erhöhten Replikationsstress hindeutet (Abbildung 9). Diese Beobachtung bestätigt sich bei Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-



Signalintensität. Die Inhibition von Wee1 führt zur Induktion von Replikationsstress (Abbildung 11), auch in den HPV-negativen Zellen ist dies zu beobachten (Abbildung 23). Dennoch ist die Rolle des Replikationsstress für die Radiosensibilisierung nicht eindeutig klar. Bei der Kombination von PARP- und Wee1-Inhibition ist nämlich weder in den HPV-positiven noch in den HPV-negativen Zelllinien eine weitere Erhöhung der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität zu erkennen, jedoch kommt es im Koloniebildungstest bei der dualen Inhibition zur effektiveren Radiosensibilisierung.

Die Zugabe von Nucleosiden kann den Replikationsstress, gemessen an der  $\gamma$ H2AX-Intensität, sowohl nach Wee1 als auch nach PARP/Wee1 in ähnlichem Maße reduzieren. Die Radiosensibilisierung im Koloniebildungstest konnte nach Wee1-Inhibition hingegen nur in zwei (UM-SCC-47, UPCI-SCC-154) der drei Zelllinien verringert werden (Abbildung A.14 im Anhang). Interessanterweise war in den unbehandelten Kontrollen der UD-SCC-2 die Induktion von Radioresistenz zu beobachten. Bei dualer Inhibition war nach Nucleosid-Zugabe in keiner der Zelllinien mehr eine Aufhebung der Radiosensibilisierung zu beobachten (Abbildung 18). Aber auch in diesen Versuchen konnte die Induktion von Radioresistenz in den UD-SCC-2 beobachtet werden. In den HPV-negativen Zelllinien war der Einfluss der Nucleosid-Zugabe gering und der Replikationsstress konnte nur in den HSC4 nach Wee1-Inhibition signifikant verringert werden. Auf den Replikationsstress nach dualer Inhibition hatten die Nucleoside keinen Einfluss (Abbildung 28). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Radiosensibilisierung der dualen Inhibition nicht alleine von der Induktion von Replikationsstress abhängig ist sondern weitere robustere Mechanismen von Bedeutung sind. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit vorherigen Untersuchungen in denen der Einfluss der Wee1-Inhibition und der Inhibition von PARP/Wee1 auf die Radiosensibilisierung von Lungen- und Leberkrebszellen untersucht wurde [90, 129]. Auch in diesen Arbeiten wurde der Einfluss der Nucleosid-Zugabe auf den Replikationsstress untersucht und die Zugabe von Nucleosiden konnte den radiosensibilisierenden Effekt der alleinigen Wee1-Inhibition reduzieren [48, 90]; für die duale Inhibition von PARP/Wee1 galt dies (in Widerspruch zum Titel der Publikation) jedoch nicht [90]. Interessanterweise konnte auch in einer der drei Leberzelllinien Radioresistenz nach Nucleosid-Zugabe beobachtet werden [48], während für die Lungenkrebszellen die Ergebnisse der unbehandelten Kontrolle nicht gezeigt wurden [90]. Auch wenn die überraschend auftretende Radioresistenz nach Nucleosid-Zugabe in der Negativkontrolle der UD-SCC-2-Zellen eindeutig nicht Mittelpunkt dieser Arbeit war, ist dieses Ergebnis dennoch interessant und bietet sich als Thema zukünftiger mechanistischer Untersuchungen an.

Um die im Koloniebildungstest beobachtete Radiosensibilisierung nach PARP/Wee1-Inhibition näher zu untersuchen, erfolgte eine Analyse der residuellen strahleninduzierten DSB. In den HPV-negativen Zellen kam es nach dualer Inhibition zu einem generellen Anstieg der Anzahl residueller 53BP1 Foci (Abbildung 26). Ein Anstieg der Focizahl konnte in den HPV-positiven Zelllinien nicht beobachtet werden, hier zeigte sich jedoch eine Verschiebung der residuellen 53BP1 Foci von G<sub>2</sub>-Phase Zellen in die G<sub>1</sub>-Phase Zellen (Abbildung 15). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der Aufhebung des G<sub>2</sub>-Arrestes in den HPV-positiven Zelllinien. Diese Zellen durchschreiten trotz unreparierter Doppelstrangbrüche die Mitose, was mit dem Risiko letaler Chromosomenaberrationen und des mitotischen Zelltodes verbunden ist [14, 46]. Ein rätselhaftes Ergebnis ist die leichte Verringerung der Gesamtzahl von 53BP1 Foci bei kombinierter Inhibitorbehandlung in den HPV-positiven Zelllinien UD-SSC-2 und UPCI-SCC-154 (Abbildung 13). Im Allgemeinen

ist eine Verstärkung der DNA-Schäden in der S/G<sub>2</sub>-Phase nach PARP-Inhibition sehr gut belegt [42, 45]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Zunahme des G<sub>2</sub>-Arrestes sowie ein Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität nach der Inhibition von PARP beobachtet werden (Abbildung 10 und Abbildung A.6 im Anhang). Eine mögliche Erklärung für die verringerte Focizahl könnte sein, dass die Inhibition des G<sub>2</sub>-Kontrollpunktes dazu führt, dass besonders stark geschädigte Zellen, die ansonsten ausreichend lange mit ihren Schäden im G<sub>2</sub>-Arrest verweilen, nun womöglich direkt während der mitotischen Teilung eliminiert werden. Im Einklang mit dieser Theorie verringerte sich der Anteil der Zellen mit mindestens 20 residuellen 53BP1 Foci in der G<sub>2</sub>-Phase nach dualer Inhibition und Bestrahlung in den UD-SCC-2 und UPCI-SCC-154 (Abbildung A.13 im Anhang). In den HPV-negativen Zelllinien hingegen war eine Zunahme an Zellen mit mindestens 20 Foci nach PARP/Wee1-Inhibition erkennbar. Da die HPV-negativen Zellen in der Regel eine erhöhte Reparaturkapazität aufweisen als die HPV-positiven, sind sie weniger vom G<sub>2</sub>-Arrest abhängig und können die Schäden oft vor dem Erreichen der Mitose reparieren und überleben.

Für die Überlebensrate der Zellen ist die Anzahl besonders wenig geschädigter Zellen wichtiger als die Anzahl der stark geschädigten Zellen. Daher ist es von besonderer Bedeutung, dass sich die Fraktion an Zellen mit einer sehr geringen Foci Zahl sowohl in den HPV-positiven als auch in den HPV-negativen Zelllinien nach dualer Inhibition reduziert (Abbildung 16 und Abbildung 27). Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation deuten auf einen Mechanismus der Radiosensibilisierung hin, der auf der Aufhebung des in den HPV-positiven HNSCC-Zellen weitreichenden G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Arrestes in Kombination mit der Induktion von zusätzlichen DNA-Schäden in S- und G<sub>2</sub>-Phase durch die Inhibition von PARP beruht. In den HPV-negativen Zellen scheint die Aufhebung des G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Arrestes von geringerer Bedeutung für die Radiosensibilisierung zu sein. Während Unterschiede im Detail bestehen mögen, lässt sich mittels dualer Inhibition eine robuste Radiosensibilisierung von proliferierenden HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC Tumorzellen nachweisen.

Bei der Bestrahlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich ist es unvermeidbar, dass sich auch Normalgewebe im Bestrahlungsfeld befindet. Daher ist es wichtig, dass dieses durch die Inhibition von PARP/Wee1 nicht im gleichen Maße radiosensibilisiert wird. Um die Tumorspezifität der dualen Inhibition zu untersuchen, wurden menschliche Fibroblasten, die keine Mutationen im p53-Protein aufweisen und somit einen intakten G<sub>1</sub>-Arrest haben, ebenfalls mit der Kombination aus PARP- und Wee1-Inhibition behandelt. Das Überleben der Fibroblasten, die p53-profiziente normale Gewebezellen darstellen, ist nach Inhibitorbehandlung in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis in Abbildung A.8 im Anhang gezeigt. Daraus ist zu erkennen, dass die Fibroblasten im proliferativen Zustand durch die duale Inhibition ebenfalls radiosensibilisiert werden, jedoch in geringerem Maße als die HPV-positiven Tumorzelllinien. In konfluenten Kulturen ging die Wirkung der Inhibition des S/G<sub>2</sub>-Kontrollpunktes vollständig verloren und die Radiosensibilisierung war gering und nur von der PARP-Inhibition getrieben. Diese Beobachtung deutet auf eine nicht absolute aber bedeutsame Tumorspezifität der dualen Inhibition hin. Insbesondere angesichts der Tatsache, dass viele Normalgewebe nicht oder nur langsam proliferieren.

Um das Zellüberleben näher zu untersuchen wäre eine Berechnung der  $\alpha$  und  $\beta$  Werte des LQM von Interesse. Ein Vergleich der  $\alpha$  und  $\beta$  Werte für die verschiedenen Zelllinien und Behandlungen könnte noch weitere Informationen zur Strahlenempfindlichkeit enthalten. Eine Anpassung an das LQM ist mit nur drei Dosispunkten, wie sie in dieser Arbeit vorliegen, nicht sinnvoll. Eine Erweiterung der Versuche um weitere Dosispunkte ist allerdings

kaum praktikabel, da ein *delayed-plating* Koloniebildungstest mit mehr als zwölf Proben nur schwer gleichzeitig durchzuführen ist. Bei zusätzlichen Proben wird das Experiment so zeitaufwendig, dass die Behandlungen untereinander nicht mehr optimal zu vergleichen sind. Um einen möglichst gute Vergleichbarkeit der Targeting-Ansätze zu haben, wurden in dieser Dissertation alle Behandlungen in einem Versuch getestet, was allerdings zu einer Limitation der Bestrahlungsdosen führt.

Der in dieser Dissertation untersuchte Ansatz zur Radiosensibilisierung von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien könnte besonders für die Patient:innen mit HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC eine Option darstellen, die kein Cisplatin vertragen. Diese müssen bisher entweder auf weniger effektive Chemotherapeutika wechseln oder bekommen den zuletzt in seiner Wirksamkeit stark bezweifelten Ansatz von Cetuximab plus Bestrahlung. Aufgrund der beobachteten starken Radiosensibilisierung in fünf von sechs und der HPV-positiven HNSCC-Zelllinien könnte die Inhibition von PARP/Wee1 für Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC auch eine generelle Alternative zur Cisplatin-basierten Radiochemotherapie sein. Im Zuge einer Deintensivierung der Therapie könnte so möglicherweise das Risiko schwerer systemischer Nebenwirkungen verringern werden. Bei der Einführung deintensivierter Therapien ist allerdings Vorsicht geboten. Es besteht das Risiko, dass nicht alle Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC auf die Therapie ansprechen und ihnen so die Standardtherapie vorenthalten wird, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Heilung führen würde. Es ist daher zu hoffen, dass die Suche nach Biomarkern weiterhin Fortschritte macht und so die Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC identifiziert werden können, die keine deintensivierte Therapie erhalten sollten.

Die in der vorliegenden Dissertation eingesetzte PARP-Inhibitor Olaparib ist bereits für Eierstockkrebs sowie fortgeschrittenen Brust- und Prostatakrebs zugelassen; bisher allerdings ohne zusätzliche Bestrahlung. Für den eingesetzten Wee1-Inhibitor Adavosertib gibt es bisher noch keine klinische Zulassung. Allerdings gibt es vielversprechende Ergebnisse aus Phase-2-Studien für Bauchspeicheldrüsenkrebs und in Kombination mit Gemcitabine für Eierstockkrebs [47, 85]. Zudem werden sowohl Olaparib als auch Adavosertib in klinischen Studien in HNSCC in Kombination mit Bestrahlung getestet (NCT01758731, NCT02308072, NCT02229656; NCT02585973, NCT03028766). Die in dieser Dissertation beobachtete hochwirksame Radiosensibilisierung und der klinische Stand der Inhibitoren bestärken, dass *in vivo* Experimente als nächster Schritt zu einer möglichen klinischen Erforschung des beschriebenen Radiosensibilisierungs-Ansatzes eingesetzt werden sollten.

### **Einsatz von Protonen in der Therapie von HNSCC**

Eine weitere Möglichkeit die Spätnebenwirkungen der Strahlentherapie zu reduzieren, ist die Bestrahlung mit Protonen. Bei diesen erfolgt ein Großteil der Dosisabgabe erst am Ende der Wegstrecke im Bragg-Peak, was den Vorteil hat, dass die Strahlendosis im umgebenden Normalgewebe reduziert werden kann. Auch für HNSCC wird die Bestrahlung mit Protonen zur Verbesserung der Behandlung untersucht und inzwischen gibt es eine Vielzahl an Hinweisen, dass die Intensitäts-modulierte Protonentherapie (*intensity-modulated proton therapy*, IMPT) sowohl in HPV-positiven als auch in HPV-negativen Patient:innen zu einer verringerten Toxizität führen kann [131]. Zur Zeit läuft eine Phase-2/3-Studie in Patient:innen mit OPSCC, in der die Toxizität der adjuvanten IMPT mit der IMRT (Phase-2)

und das progressionsfreie Überleben bei Behandlung mit IMPT und IMRT bei gleichzeitiger Chemotherapie verglichen wird (Phase-3) [132]. Zudem wird in der TORPEdO-Studie (Phase-3-Studie) untersucht, ob die IMPT im Vergleich zur IMRT in Patient:innen mit lokal-fortgeschrittenem OPSCC, die mit Chemotherapie behandelt werden, zu weniger Spätnebenwirkungen führt [133]. In den Vorteilen der Protonenbestrahlung liegt allerdings auch ihr Nachteil. Eine exakte Bestrahlungsplanung ist von besonderer Relevanz ebenso wie die Lagerung der Patient:innen und anatomische Veränderungen im Laufe der Bestrahlung. Schon kleine Änderungen z. B. im Tumolvolumen oder Abweichungen bei der Lagerung der Patient:innen, führen zu Variationen der Position des Bragg-Peaks [1, 131].

Inzwischen gibt es erste Untersuchungen zum zellulären Ansprechen HPV-positiver und HPV-negativer HNSCC-Zelllinien auf die Bestrahlung mit Protonen und Photonen. Insgesamt weisen Protonen im Vergleich zu Photonen eine höhere relative biologische Wirksamkeit (RBW) auf, was wahrscheinlich darauf beruht, dass durch Protonen vermehrt komplexe Schädigungen erzeugt werden, welche für die Zellen schwieriger zu reparieren sind [1]. So konnten sowohl in HPV-positiven als auch in HPV-negativen Zellen eine erhöhte Anzahl residueller Reparaturfoci im Vergleich zur Bestrahlung mit Photonen beobachtet werden [134]. Dies ist besonders für HPV-positiven Zellen von Bedeutung, da diese über eine eingeschränkte Reparaturkapazität verfügen [134, 135]. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Zelltod nach Bestrahlung mit Protonen hauptsächlich über den mitotischen Zelltod abläuft [135]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigte sich auch, dass HPV-positive Zelllinien auch auf Protonenbestrahlung empfindlicher reagieren als HPV-negative Zelllinien [134]. Der HPV-Status hatte allerdings keinen Einfluss auf die RBW der Strahlung, sondern unterschied sich zwischen den Zelllinien. Zudem hat auch die Fraktionierung einen Einfluss auf die RBW. Im Unterschied dazu, sind bei der Bestrahlung mit Schwerionen ( $^{12}\text{C}$ ), keine Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC mehr erkennbar. Es wurde sogar eine geringere RBW für HPV-positive Zellen beobachtet [136]. Eine mögliche Ursache könnte die im Vergleich zu Protonen deutlich erhöhte RBW des Kohlenstoff sein. Die bei der Bestrahlung mit Kohlenstoff entstehenden DNA-Schädigungen sind teilweise so komplex, dass eine Reparatur auch für Zellen mit einer funktionierenden DNA-Reparatur nicht mehr möglich ist. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Reduktion der residuellen Reparaturfoci in den HPV-positiven Zellen nach dualer Inhibition ist wahrscheinlich ebenfalls auf einen vermehrten Zelltod in der Mitose aufgrund einer hohen Anzahl von Doppelstrangbrüchen zurückzuführen. Auf Basis der möglicherweise biologisch günstigen Eigenschaften der Protonenbestrahlung werden bereits diverse Targeting-Ansätze in HNSCC-Zellen in Kombination mit Protonen untersucht [137, 138]. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition von PARP auch in Kombination mit Protonenbestrahlung einen radiosensibilisierenden Effekt hat [139]. Der in dieser Dissertation untersuchte Ansatz zur Inhibition der Schadensantwort und der Zellzyklus-Kontrollpunkte könnte so möglicherweise auch in Kombination mit Protonen genutzt werden, um die Wirksamkeit der dualen Inhibition noch weiter zu erhöhen.

## 5.2 Validierung der Daten aus der Zellkultur in *ex vivo* Gewebeschnitten

Um die strahlentherapeutische Behandlung zu verbessern, ist ein Verständnis für die Mechanismen hinter der unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC notwendig. Auf zellulärer Ebene konnte bereits eine erhöhte Radiosensibilität HPV-positiver Zelllinien nachgewiesen werden [22], es handelt sich bei Zellkultur-Experimenten allerdings immer um ein artifizielles und homogenes System. Um sich den Bedingungen eines realen humanen Tumors weiter annähern zu können, werden weitere Modellsysteme benötigt. Ein System für *in vivo* Untersuchungen sind patientenabgeleitete Xenograft-Modelle (*patient-derived xenografts*, PDX-Modelle), bei denen intaktes Gewebe humaner Tumore auf immunsupprimierte Mäuse übertragen wird und dort zu einem experimentellen Tumor auswachsen kann. Dabei kann es sich um einen anatomisch ähnlichen Ort handeln, dies ist allerdings nicht zwangsläufig notwendig [140]. Diese PDX-Modelle haben gegenüber der Arbeit mit Zelllinien einige Vorteile, wie z. B. physiologischere Wachstumsbedingungen durch Vaskularisierung sowie das Vorhandensein einer Tumormikroumgebung [140, 141]. Inzwischen konnte auch in PDX-Modellen die erhöhte Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver OPSCC nachgewiesen werden [142]. Die Arbeit mit PDX-Modellen ist allerdings technisch aufwendig und mit hohem Zeitaufwand und Kosten verbunden, weshalb Experimente mit diesen Modellen nur in wenigen Laboren bearbeitet werden und insbesondere ein breiter Vergleich verschiedener Modelle kaum realisierbar ist. Ein weiteres alternatives Modellsystem sind *ex vivo* Gewebeschnitte. Im Unterschied zu den Zelllinien, sind die Zellen in den Gewebeschnitten nur für kurze Kulturzeiten (Tage bis wenige Wochen) geeignet, dabei aber noch von den ursprünglichen benachbarten Tumorzellen und tumorassoziierten Normalgewebszellen umgeben. Zudem haben die Tumorzellen in diesen Modellen noch keine Zeit gehabt *in vitro* genetische Änderungen, unter anderem als Anpassung an die Kulturbedingungen, zu entwickeln [84, 143]. Die Bedeutung von *ex vivo* Gewebeschnitten ist in den letzten Jahren gewachsen und sie werden vermehrt in der strahlenbiologischen Forschung eingesetzt. Auch für HNSCC konnte gezeigt werden, dass sich in der Anzahl residueller  $\gamma$ H2AX Reparaturfoci in *ex vivo* Gewebeschnitten die klinische Ansprechbarkeit verschiedener Tumorentitäten widerspiegelt [84, 144, 145]. In Zusammenarbeit mit u. a. Dr. H. Zech wurde die DSB-Reparaturkapazität von HPV-positiven und HPV-negativen Gewebeschnitten untersucht. Diese Ergebnisse sind 2021 veröffentlicht worden [95]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC in den *ex vivo* Gewebeschnitten bestätigt werden. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung weisen die Gewebeschnitte HPV-positiver Patient:innen im Durchschnitt eine signifikant höhere Anzahl residueller 53BP1 Foci auf als die der HPV-negativen. Um zu kontrollieren, ob durch die Bestrahlung ähnlich viele Foci induziert werden, erfolgte auch 2 h nach Bestrahlung eine Analyse der Focizahl. Dabei zeigten sich keine klaren Unterschiede zwischen den HPV-positiven und den HPV-negativen Proben [95]. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass tatsächlich eine eingeschränkte Reparaturfähigkeit und kein Unterschied in der Induktion der DSB, der entscheidende Parameter für die hohe zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist.

In den *ex vivo* Gewebeschnitten konnte zudem 24 h nach Bestrahlung mit 3 Gy in den Proben von HPV-positiven Raucher:innen eine signifikant geringere Anzahl residueller Reparatur-

foci nachgewiesen werden als in denen von Nicht- bzw. moderaten Raucher:innen. Dies lässt vermuten, dass die Biologie der Tumore von Patient:innen mit HPV-positiven HNSCC und Raucheranamnese stärker den HPV-negativen, in aller Regel durch Tabakkonsum induzierten Tumoren ähneln und wie diese über effektivere Reparaturmechanismen verfügen. Auch in der Literatur wurde der Raucherstatus von HPV-positiven OPSCC-Patient:innen mehrfach als ein Hauptrisikofaktor für das Scheitern der Therapie beschrieben [93, 124, 146].

Außerdem war es möglich, in dem Modellsystem der *ex vivo* Gewebeschnitte die Auswirkungen der dualen Inhibition von PARP/Wee1 auf die Anzahl residueller DSB zu untersuchen. Auch hier konnte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Zellkultur, in den HPV-positiven Gewebeschnitten nach PARP/Wee1-Inhibition und Bestrahlung kein Anstieg residueller 53BP1 Reparaturfoci beobachtet werden. In der Mehrheit der HPV-negativen Gewebeschnitte hingegen, führte die duale Inhibition in Übereinstimmung mit den Experimenten in Zellkultur, zu einer erhöhten Anzahl an residuellen DSB (vgl. Abbildung 30). Auch wenn die Arbeit mit *ex vivo* Gewebeschnitten einige Vorteile gegenüber der Zellkultur aufweist, hat auch dieses Modell Limitationen. Unterschiede in der Oxygenierung der Tumoren oder Tumorbereiche gehen bei der Kultivierung verloren, zudem ist das Tumormaterial meist begrenzt, sodass hier beispielsweise keine Einzelbehandlungen durchgeführt werden konnten. Auch eine mögliche Heterogenität verschiedener Tumorbereiche in Bezug auf die DNA-Reparaturfähigkeit kann ohne multiple Proben nicht erfasst werden und auch innerhalb einer Probe kann es relevante Schwankungen in Bezug auf Anzahl und Verteilung der Tumorzellen in den einzelnen Schnitten geben.

Insgesamt unterstützen die vorliegenden *ex vivo* Daten die Ergebnisse aus der Zellkultur und zeigen sowohl die erhöhte Strahlenempfindlichkeit der HPV-positiven HNSCC als auch den Einfluss der PARP/Wee1-Inhibition auf die DSB-Reparaturfoci. Möglicherweise können diese Gewebeschnitte genutzt werden, um die Patient:innen mit HPV-negativen HNSCC zu identifizieren, die auf eine Behandlung mit PARP/Wee1-Inhibition ansprechen [147]. Es ist zudem prinzipiell vorstellbar eine zusätzliche Zellzyklusfärbung mit z. B. Geminin analog zu den HPV-positiven Zelllinien auch für die *ex vivo* Proben zu etablieren, sodass auch die Verschiebung von hohen Focizahlen aus der G<sub>2</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase validiert werden kann. Unabhängig vom molekularen Targeting deuten diese Daten darauf hin, dass die *ex vivo* Gewebeschnitte genutzt werden können, um Patient:innen mit HPV-positivem Tumor aber effektiver DSB-Reparatur zu identifizieren. Es ist davon auszugehen, dass diese Patient:innen bei einer Deintensivierung über eine Dosisreduktion ein höheres Risiko haben und daher von solchen Deintensivierungskonzepten ausgeschlossen werden sollten.

### 5.3 Vergleich der manuellen und der automatisierten Auszählung in ImageJ

Die DSB-Reparaturkapazität ist ein wichtiger Parameter für die Strahlenempfindlichkeit, auch bezüglich der Unterschiede von HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren. Im Bereich von klinisch relevanten Einzeldosen kann die Auszählung residueller Reparaturfoci als Surrogatmarker für residuelle DSB genutzt werden. Auch in dem hier beschriebenen Projekt ist die Anzahl residueller Reparaturfoci ein wichtiges Maß für die Radiosensibilisierung. Bisher ist die Auszählung in unserem Labor manuell erfolgt, prinzipiell gibt es allerdings

mehrere Programme, die eine automatisierte Auszählung von Zellkernen und Reparaturfoci ermöglichen. Die Mehrzahl wurde jedoch an Fibroblasten und Lymphozyten und nicht an Tumorzellen etabliert [111, 148]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte untersucht werden, ob eine automatisierte Auszählung von Zellkernen und Reparaturfoci in der ImageJ Software möglich ist und ob die Ergebnisse mit der manuellen Auszählung vergleichbar sind. Eine automatisierte Auszählung sollte zu Zeitersparnis und besserer Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führen. Begonnen wurde mit der automatisierten Auszählung der DAPI-gefärbten Zellkerne (Abbildung 31) und überraschenderweise traten hierbei die meisten Probleme auf (Abbildung 32). Die Morphologie von Tumorzellen ist stark heterogen und unterscheidet sich zwischen den Zelllinien. Häufig wachsen die Zellen übereinander oder die Zellkerne sind deformiert; dies führt zu Fehlern bei der automatisierten Separierung. Besonders die dicht wachsenden UPCI-SCC-154 stellten in dieser Arbeit ein Problem dar. Auch in der Literatur werden überlappende Zellkerne als ein relevantes Problem bei der automatisierten Auszählung beschrieben [109, 111]. In den UM-SCC-47 traten nach Behandlung und Bestrahlung zudem vermehrt Mikronuklei auf, die zu einer fälschlich erhöhten Zellkernzahl in der automatisierten Auszählung führten. Eine Anpassung der minimalen Zellkerngröße in ImageJ könnte dieses Problem allerdings reduzieren. Um die Schwierigkeiten bei der Zellkernzählung zu vermeiden, verzichteten einige der verfügbaren Programme zur automatisierten Auszählung von Reparaturfoci direkt auf eine automatisierte Zellkernzählung oder arbeiten mit der DAPI-Fläche anstelle der Zellzahl. Im Anschluss an die Zellzählung erfolgte eine automatisierte Auszählung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci. Dabei wurden die zwei in der ImageJ Software implementierten Methoden *Find Maxima* und *Analyze Particles* verglichen. Die Funktion *Find Maxima* in Kombination mit einer manuellen Auszählung der Zellkerne führte dabei zur besten Übereinstimmung mit der manuellen Auszählung (Abbildung 35). Wie auch in der automatisierten Zellkernzählung sind bei stark geschädigten Zellen überlappende Reparaturfoci ein Problem; die Trennung ist hierbei allerdings erfolgreicher als in den Zellkernen. Diese Beobachtung wurde auch in der Literatur beschrieben [111]. Es ist zu beachten, dass im Rahmen dieser Dissertation aus Zeitgründen keine weitere Optimierung des Protokolls durchgeführt werden konnte, da dies nicht der Fokus dieser Dissertation war. Es ist daher davon auszugehen, dass die Ergebnisse der automatisierten Auszählung (z. B. durch Anpassung der minimalen Foci-Größe) noch weiter verbessert werden können.

Ein Nachteil der automatisierten Auszählung ist die bisher noch zeitaufwendige Vorbereitung der Bilder, um die Funktionen in ImageJ nutzen zu können. Bevor eine Auszählung der Reparaturfoci und ein Vergleich zwischen den Behandlungen und geschehen kann, muss eine Normalisierung der Bilder erfolgen. Die am Mikroskop aufgenommenen Bilder werden in AxioVision so bearbeitet, dass die Signalstärke der einzelnen Aufnahme-Kanäle in allen Bildern identisch ist. Es gibt jedoch immer wieder Aufnahmen, in denen die Signalintensität deutlich stärker oder schwächer ist als in den übrigen Bildern. Unter Umständen ist es notwendig, diese Aufnahmen aus der Auswertung zu entfernen. Im Anschluss müssen die Bilder aus dem Programm AxioVision als Schnittbild mit MIP exportiert werden, um die *.jpg*-Bilder der einzelnen Kanäle in ImageJ auswerten zu können. Im Unterschied dazu kann die manuelle Auszählung direkt in AxioVision erfolgen. Da sich auf den Schnittbildern selten mehr als 20 Zellkerne befinden, ist die manuelle Auszählung meist leicht und schnell durchführbar. In dieser Dissertation stellte besonders die Auszählung der Tumorzellkerne in der ImageJ Software ein Problem dar. Um eine zuverlässige Separierung der Zellkerne

zu erhalten, sind wahrscheinlich elaboriertere Methoden als die in ImageJ implementierten Algorithmen notwendig. Es ist zu beachten, dass die hier beschriebene automatisierte Auszählung der Reparaturfoci unter vereinfachten Bedingungen stattfand. Im Unterschied zu den Ergebnissen aus Abschnitt 4.1.6 und Abschnitt 4.2.6 wurden nur singuläre residuelle 53BP1 Foci ausgezählt; es fand keine Analyse der Foci in den einzelnen Zellzyklusphasen oder eine zusätzliche Analyse von  $\gamma$ H2AX statt. Dies ist mit den in dieser Arbeit dargestellten Methoden in ImageJ nicht möglich. Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass eine automatisierte Auszählung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci prinzipiell mit relativ einfachen Mitteln umzusetzen ist. Die ImageJ Software bietet zudem das Potential die Auswertung noch weiter zu optimieren oder über ein Skript laufen zu lassen. Bei der Arbeit mit mehreren verschiedenen Zelllinien, wie sie auch in dieser Arbeit stattfand, ist die automatisierte Auszählung in ImageJ zur Zeit noch problematisch. Aufgrund der Heterogenität der Zellkerne und der Reparaturfoci ist es oft nicht möglich, die selben Parameter für alle Aufnahmen zu nutzen. Dadurch muss die automatisierte Analyse an jeder Zelllinie optimiert werden, was zeitaufwendig ist und auch zu Verlusten der Reproduzierbarkeit führt. Falls die Versuche vor allem nur an einer Zelllinie durchgeführt werden, ist eine Automatisierung wahrscheinlich zuverlässiger zu verwirklichen als bei der Arbeit mit mehreren morphologisch unterschiedlichen Zelllinien. Eine automatisierte Auszählung der Reparaturfoci könnte hier durchaus sinnvoll sein und zu Zeitersparnis und einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse führen. Es ist zudem zu beachten, dass selbst bei einer vollständig automatisierten Auszählung immer eine Eingabe bestimmter Parameter notwendig ist. Diese können zwar im Unterschied zur manuellen Auszählung dokumentiert und reproduziert werden, es ist jedoch immer noch ein subjektiver Betrachter notwendig.

### 5.4 Ausblick

Um die in den Zelllinien beobachtete hochwirksame Radiosensibilisierung durch PARP/Wee1 bezüglich ihres therapeutischen Nutzens weitergehend zu untersuchen, sind *in vivo* Experimente notwendig. Diese können zum Teil in PDX-Modellen stattfinden. In Kooperation mit der Firma EPO in Berlin wurde bereits begonnen, die Inhibition von PARP, Wee1 und die Kombination PARP/Wee1 an zwei HPV-positiven HNSCC PDX-Modellen mit und ohne Bestrahlung zu untersuchen. Dafür werden kleine Tumorstücke auf die Flanke von Nacktmäusen transplantiert. Die Behandlung der Mäuse erfolgt, ähnlich wie in den Zellkulturexperimenten, mit den einzelnen Inhibitoren sowie der dualen Inhibition zuzüglich Bestrahlung. Je Behandlungsarm wird mit acht Mäusen gearbeitet. Die Ergebnisse zu diesen Wachstumsversuchen werden in Kürze erwartet. Neben einer Analyse des Tumorstadiums *in vivo*, wurden mit dem Material der PDX-Modelle auch *ex vivo* Kulturen angelegt; dafür wurden die Tumore unbehandelter Mäuse entnommen. Analog zu den humanen *ex vivo* Gewebeschnitten (vgl. Abschnitt 3.3) wurden diese Tumorschnitte mit den Inhibitoren behandelt und bestrahlt. Anschließend erfolgte die Fixation der Gewebestücke und die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . In diesen Gewebeschnitten soll eine Analyse der DSB-Reparatur erfolgen. Es wurden bereits initiale IF-Färbungen auf dem Material durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Gewebe im inneren der Tumore nicht mehr vital ist. Diese Beobachtung konnte in histologischen Färbungen bestätigt werden. Ursache könnte eine Verhornung sein; es ist bekannt, dass dies bei *in vivo* Modellen von Kopf-Halstumoren ein Problem darstellen kann.



Dennoch ist es möglich mit diesem Gewebe zu arbeiten, wenn nur der äußere, vitale Rand des Tumors genutzt wird. Als nächstes sollen in diesen Gewebestücken residuelle 53BP1 Reparaturfoci sowie der Zellzyklusmarker Geminin angefärbt werden und darüber eine Analyse der Reparaturkapazität und Zellzykluseffekte erfolgen.

In Zukunft sollen zudem auch in den humanen *ex vivo* Gewebeschnitten der Patient:innen weitere Versuche durchgeführt werden, um sich auch hier die Zellzyklusverteilung der Reparaturfoci mittels Geminin-Färbung näher ansehen zu können. Weiterführend könnten aus den Tumorzellen von Patient:innen sogenannte Organoide kultiviert werden. Dabei handelt es sich um Tumorzellaggregate, die in speziellen Medien für eine gewisse Zeit in *ex vivo* kultivierbar sind. Diese stellen eine sinnvolle Ergänzung zu den Gewebeschnitten dar, da in diesen z. B. das Tumorwachstum und das Zellüberleben mit und ohne Behandlung besser untersucht werden können [140]. Im Unterschied zu PDX-Modellen sind die Kosten und der zeitliche Aufwand für die Experimente deutlich geringer und es kann eine erheblich größere Bandbreite an individuellen Tumoren untersucht werden.

Selbstverständlich wäre es auch interessant die duale Inhibition in Kombination mit Protonen zu untersuchen. Allerdings gibt es nur wenige Labore in denen dies möglich ist.

## 5.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der DNA-Schadensantwort in Kombination mit einer Inhibition der Zellzyklus-Kontrollpunkte sowohl in HPV-positiven als auch in HPV-negativen HNSCC-Zelllinien zu einer wirksamen Radiosensibilisierung führt. Dabei scheint in den HPV-negativen Zelllinien besonders der Einfluss auf die DNA-Reparatur von Bedeutung, in diesen Zellen kommt zu einer erhöhten Anzahl residueller Doppelstrangbrüche nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung. In den HPV-positiven Zelllinien, die bereits eine ineffektive Doppelstrangbruchreparatur besitzen, steigt die Anzahl residueller Reparaturfoci nicht an. Allerdings ist hier die Aufhebung des strahleninduzierten G<sub>2</sub>-Arrestes von Bedeutung. Es zeigte sich in diesen Zelllinien eine Abnahme der 53BP1 Foci in G<sub>2</sub>-Phase Zellen und eine Zunahme an Foci in den G<sub>1</sub>-Phase Zellen, was auf einen unregulierten Eintritt in die Mitose hindeutet. Aufgrund der beobachteten effektiven Radiosensibilisierung könnte die duale Inhibition von PARP und Wee1 zu klinisch bedeutsamen Effekten führen. In den HPV-positiven HNSCC ist dieser Ansatz als möglicher Ersatz für Cisplatin in der deintensivierten Therapie vorstellbar. In HPV-negativen HNSCC könnte er als Alternative für das toxische Cisplatin interessant sein, da dieses von einer relevanten Anzahl an Patient:innen nicht vertragen wird. Die Ergebnisse aus der Zellkultur konnten in *ex vivo* Gewebeschnitten validiert werden. Zudem lassen die Daten vermuten, dass die *ex vivo* Gewebeschnitte prädiktiv genutzt werden können, um das Ansprechen individueller Tumore zu untersuchen. Diese Beobachtung muss allerdings noch eingehender untersucht werden.



# 6 Abkürzungsverzeichnis

## Abkürzungen

<b>Ada</b>	Adavosertib
<b>alt-EJ</b>	<i>alternative end-joining</i> , alternative Endverknüpfung
<b>ATM</b>	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
<b>ATR</b>	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> , Bovines Serum Albumin
<b>CDKs</b>	<i>Cyclin-dependent kinases</i> , Zyklin-abhängige Kinasen
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DMEM</b>	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<b>DSB</b>	<i>Double-strand break</i> , Doppelstrangbruch
<b>EdU</b>	Ethinyldesoxyuridin
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i> , Fötales Rinderserum
<b>FCS</b>	<i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreuung
<b>HNO</b>	Hals-Nasen-Ohren
<b>HNSCC</b>	<i>Head and neck squamous cell carcinomas</i> , Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereiches
<b>HPV</b>	<i>Human papillomaviruses</i> , Humane Papillomviren
<b>HR</b>	<i>Homologous recombination</i> , Homologe Rekombination
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>IMPT</b>	<i>Intensity-modulated proton therapy</i> , Intensitätsmodulierte Protonentherapie
<b>IMRT</b>	<i>Intensity-modulated radiation therapy</i> , Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
<b>LET</b>	<i>Linear energy transfer</i> , Linearer Energietransfer
<b>LQM</b>	<i>Linear quadratic model</i> , Linear-quadratisches Modell
<b>MIP</b>	<i>Maximum intensity projection</i> , Maximumintensitätsprojektion
<b>Ola</b>	Olaparib

## 6 Abkürzungsverzeichnis

<b>OPSCC</b>	<i>Oropharyngeal squamous cell carcinomas</i> , Oropharynxkarzinome
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous end-joining</i> , Nicht-homologe Endverknüpfung
<b>Nuk</b>	Nukleoside
<b>PARP</b>	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PDX</b>	<i>Patient-derived xenografts</i> , Patienten-abgeleitete Xenografts
<b>PE</b>	<i>Plating efficiency</i> , Ausplattierungseffizienz
<b>p-H3</b>	Phospho-Histon H3
<b>P/S</b>	Penicillin-Streptomycin
<b>RBW</b>	Relative biologische Wirksamkeit
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SCS</b>	<i>Side scatter</i> , Seitwärtsstreuung
<b>SD</b>	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
<b>SF</b>	<i>Surviving fraction</i> , Überlebensrate; Zellüberleben
<b>SLD</b>	<i>Sublethal damage</i> , subletaler Schaden
<b>SSA</b>	<i>Single-strand annealing</i>
<b>SSB</b>	<i>Single-strand break</i> , Einzelstrangbruch
<b>UKE</b>	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

## Konstanten

<b>c</b>	Lichtgeschwindigkeit
<b>e</b>	Elementarladung
<b><math>m_e</math></b>	Elektronenmasse
<b><math>\epsilon_0</math></b>	Elektrische Feldkonstante
<b><math>h</math></b>	Plancksches Wirkungsquantum

## Symbole

$D$	Gy	(Energie-)Dosis
$E$	Sv	Effektive Dosis
$E_\gamma$	keV	Photonenenergie
$F_c$	N	Coulomb-Wechselwirkung
$H$	Sv	Äquivalentdosis
$R_{\text{CSDA}}$	cm	Reichweite nach der <i>continuous slowing down approximation</i>
$\nu$	1/m	Frequenz
$w_R$		Strahlungs-Wichtungsfaktor
$w_H$		Organabhängiger Wichtungsfaktor
$Z$		(effektive) Ordnungszahl
$\alpha$	Gy	Linearer Anteil des linear-quadratischen Modells
$\beta$	Gy	Quadratischer Anteil des linear-quadratischen Modells
$\kappa$	1/cm	Wechselwirkungskoeffizient der Paarbildung
$\mu$	1/cm	Schwächungskoeffizient
$\rho$	g/cm <sup>3</sup>	Dichte
$\sigma_c$	1/cm	Wechselwirkungskoeffizient der Comptonstreuung
$\sigma_k$	1/cm	Wechselwirkungskoeffizient der kohärenten Streuung
$\tau$	1/cm	Wechselwirkungskoeffizient des Photoeffekts
$\chi$	1/cm	Wechselwirkungskoeffizient des Kernphotoeffekts

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] H. Krieger. *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. 4. Aufl. Springer Spektrum, 2012. ISBN: 978-3-8348-1815-7. DOI: 10.1007/978-3-8348-2238-3.
- [2] D. Meschede. *Gerthsen Physik*. 22. Aufl. Springer, 2003. ISBN: 3-540-02622-3.
- [3] E. B. Podgoršak. *Radiation Physics for Medical Physicists*. 3. Aufl. Springer, 2016. ISBN: 978-3-319-25382-4. DOI: 10.1007/978-3-319-25382-4.
- [4] D. S. Chang, F. D. Lasley, I. J. Das, M. S. Mendonca und J. R. Dynlacht. *Basic Radiotherapy Physics and Biology*. 2. Aufl. Springer, 2021. ISBN: 978-3-030-61899-5. DOI: 10.1007/978-3-030-61899-5.
- [5] W. Demtröder. *Experimentalphysik 4. Kern-, Teilchen- und Astrophysik*. Springer Spektrum, 2014. ISBN: 978-3-642-21475-2. DOI: 10.1007/978-3-642-21476-9.
- [6] E. Richter und T. Feyerabend. *Grundlagen der Strahlentherapie*. 2. Aufl. Springer, 2002. ISBN: 978-3-642-56245-7.
- [7] ICRP. „The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103“. In: *Annals of the ICRP* 37 (2007).
- [8] G. Dietze und H.-G. Menzel. „Dose Quantities in Radiation Protection and their Limitations“. In: *Radiation Protection Dosimetry* 112.4 (2004), S. 457–463. DOI: 10.1093/rpd/nch097.
- [9] M. Reiser, F. P. Kuh und J. Debus. *Duale Reihe Radiologie*. 2. Aufl. Thieme, 2006. ISBN: 978-3131253224.
- [10] L. Jones, P. Hoban und P. Metcalfe. „The use of the linear quadratic model in radiotherapy: a review“. In: *Australasian physical & engineering sciences in medicine* 24 (3 2001). DOI: 10.1007/BF03178355.
- [11] S. J. McMahon. „The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges“. In: *Physics in Medicine & Biology* 64 (2019). DOI: 10.1088/1361-6560/aaf26a.
- [12] C. M. van Leeuwen et al. „The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies“. In: *Radiation Oncology* 13.96 (2018). DOI: 10.1186/s13014-018-1040-z.
- [13] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl und H. Ziegler. *Biophysik. Ein Lehrbuch*. Springer Verlag Berlin, 1977. ISBN: 978-3-642-96299-8. DOI: 10.1007/978-3-642-96298-1.
- [14] S. Schmitz und C. Desel. *Der Experimentator: Zellbiologie*. Springer Spektrum, 2018. ISBN: 978-3-662-56110-2.
- [15] N. A. Campbell und J. B. Reece. *Biologie*. 8. Aufl. Pearson Studium, 2009. ISBN: 978-3868942590.

- [16] K. A. Schafer. „The Cell Cycle: A Review“. In: *Veterinary pathology* 35 (6 1998), S. 461–478. DOI: 10.1177/030098589803500601.
- [17] E. Dikomey et al. „Chapter 11 - Radiation DNA damage and use in cancer therapeutics-translation of radiation modifiers“. In: *DNA Repair in Cancer Therapy (Second Edition)*. Hrsg. von M. R. Kelley und M. L. Fishel. Second Edition. Boston: Academic Press, 2016, S. 329–352. ISBN: 978-0-12-803582-5. DOI: 10.1016/B978-0-12-803582-5.00011-5.
- [18] M. Özcan-Wahlbrink, C. Schifflers und A. B. Riemer. „Enhanced Radiation Sensitivity of Human Papillomavirus-Driven Head and Neck Cancer: Focus on Immunological Aspects“. In: *Frontiers in immunology* 10 (2019). DOI: 10.3389/fimmu.2019.02831.
- [19] J. Boustani, M. Grapin, P.-A. Laurent, L. Apetoh und C. Mirjole. „The 6th R of Radiobiology: Reactivation of Anti-Tumor Immune Response“. In: *Cancers* 11.6 (2019). DOI: 10.3390/cancers11060860.
- [20] K. Graham und E. Unger. „Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment“. In: *International Journal of Nanomedicine* 13 (2018). DOI: 10.2147/IJN.S140462.
- [21] T. Gupta, S. Ghosh-Laskar und J. P. Agarwal. „Resource-sparing curative-intent hypofractionated-accelerated radiotherapy in head and neck cancer: More relevant than ever before in the COVID era“. In: *Oral Oncology* 111 (2020), S. 105045. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2020.105045.
- [22] T. Rieckmann et al. „HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity“. In: *Radiotherapy and Oncology* 107.2 (Apr. 2013), S. 242–6. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.03.013.
- [23] C. Zhou und J. L. Parsons. „The radiobiology of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma“. In: *Expert Reviews in Molecular Medicine* 22 (2020). DOI: 10.1017/erm.2020.4.
- [24] M. Mondini, A. Levy, L. Meziani, F. Milliat und E. Deutsch. „Radiotherapy–immunotherapy combinations – perspectives and challenges“. In: *Molecular Oncology* 14.7 (2020), S. 1529–1537. DOI: 10.1002/1878-0261.12658.
- [25] J. Peeken, P. Vaupel und S. Combs. „Integrating Hyperthermia into Modern Radiation Oncology: What Evidence Is Necessary?“ In: *Frontiers Oncology* (Juni 2017). DOI: 10.3389/fonc.2017.00132.
- [26] A. Oei, L. Vriend, J. Crezee, N. Franken und P. Krawczyk. „Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all“. In: *Radiation Oncology* (2015). DOI: 10.1186/s13014-015-0462-0.
- [27] E. M. Kass und M. Jasin. „Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways“. In: *FEBS Letters* 584 (17 2010). DOI: 10.1016/j.febslet.2010.07.057.

- [28] M. Kelley und M. Fishel. „Chapter 1 - Overview of DNA repair pathways, current targets, and clinical trials bench to clinic“. In: *DNA Repair in Cancer Therapy (Second Edition)*. Hrsg. von M. R. Kelley und M. L. Fishel. Second Edition. Boston: Academic Press, 2016, S. 1–54. ISBN: 978-0-12-803582-5. DOI: 10.1016/B978-0-12-803582-5.00001-2.
- [29] K. Rothkamm et al. „DNA damage foci: Meaning and significance“. In: *Environmental and molecular mutagenesis* 56 (6 2015), S. 491–504. DOI: 10.1002/em.21944.
- [30] A. Davis und D. Chen. „DNA double strand break repair via non-homologous end-joining“. In: *Translational Cancer Research* (Juni 2013). DOI: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.
- [31] A. M. Weber und A. J. Ryan. „ATM and ATR as therapeutic targets in cancer“. In: *Pharmacology & therapeutics* 149 (2015). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.12.001.
- [32] T. Stiff et al. „ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation“. In: *Cancer Research* 64 (7 2004). DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-3207.
- [33] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson und R. A. Sharma. „DNA repair pathways as targets for cancer therapy“. In: *Nature Reviews Cancer* 8 (2008), S. 193–204. DOI: 10.1038/nrc2342.
- [34] A. Kakarougkas und P. A. Jeggo. „DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism“. In: *The British Journal of Radiology* 87.1035 (2014), S. 20130685. DOI: 10.1259/bjr.20130685.
- [35] B. Pardo, B. Gómez-González und A. Aguilera. „DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (2009). DOI: 10.1007/s00018-009-8740-3.
- [36] J. E. Leeman et al. „Human papillomavirus 16 promotes microhomology-mediated end-joining“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.43 (2019), S. 21573–21579. DOI: 10.1073/pnas.1906120116.
- [37] A. Ray Chaudhuri und A. Nussenzweig. „The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling“. In: *Nature reviews molecular cell biology* (18 2017). DOI: 10.1038/nrm.2017.53.
- [38] H. Técher und P. Pasero. „The Replication Stress Response on a Narrow Path Between Genomic Instability and Inflammation“. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (2021). DOI: 10.3389/fcell.2021.702584.
- [39] M. Zeman und K. Cimprich. „Causes and Consequences of Replication Stress“. In: *Nature cell biology* 16 (1 2014). DOI: 10.1038/ncb2897.



- [40] T. Ubhi und G. W. Brown. „Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment“. In: *Cancer Research* 79.8 (2019), S. 1730–1739. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3631.
- [41] V. Turinetto und C. Giachino. „Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions“. In: *Nucleic Acids Research* 43.5 (2015). DOI: 10.1093/nar/gkv061.
- [42] P. Lesueur et al. „Poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibitors as radiosensitizers: a systematic review of pre-clinical and clinical human studies“. In: *Oncotarget* 8.40 (2017), S. 69105–69124. DOI: 10.18632/oncotarget.19079.
- [43] M. Wang et al. „PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways“. In: *Nucleic acids research* 34 (21 2006), S. 6170–6182. DOI: 10.1093/nar/gkl840.
- [44] M. Satoh und T. Lindahl. „Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair“. In: *Nature* 356 (1992). DOI: 10.1038/356356a0.
- [45] J. Mateo et al. „A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective“. In: *Annals of Oncology* 30 (9 2019). DOI: 10.1093/annonc/mdz192.
- [46] S. Hauge et al. „Expanding roles of cell cycle checkpoint inhibitors in radiation oncology“. In: *International Journal of Radiation Biology* 0.0 (2021), S. 1–10. DOI: 10.1080/09553002.2021.1913529.
- [47] K. C. Cuneo et al. „Dose Escalation Trial of the Wee1 Inhibitor Adavosertib (AZD1775) in Combination With Gemcitabine and Radiation for Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer“. In: *Journal of Clinical Oncology* 37.29 (2019), S. 2643–2650. DOI: 10.1200/JCO.19.00730.
- [48] K. C. Cuneo et al. „Wee1 Kinase Inhibitor AZD1775 Radiosensitizes Hepatocellular Carcinoma Regardless of TP53 Mutational Status Through Induction of Replication Stress“. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 95 (2 Juni 2016). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2016.01.028.
- [49] M. Krajewska et al. „Forced activation of Cdk1 via wee1 inhibition impairs homologous recombination“. In: *Oncogene* 32.24 (2013), S. 3001–3008. DOI: 10.1038/onc.2012.296.
- [50] International Agency for Research on Cancer WHO. *Global Cancer Observatory*. 2021. URL: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table> (besucht am 08.07.2022).
- [51] D. E. Johnson et al. „Head and neck squamous cell carcinoma“. In: *Nature Reviews Disease Primers* 6.92 (2020). DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3.
- [52] P. P. Sedghizadeh et al. „Is p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma associated with favorable prognosis? A systematic review and meta-analysis“. In: *Oral Oncology* 54 (2016), S. 15–27. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2016.01.002.

- [53] C. L. Wu et al. „DNA studies underestimate the major role of CDKN2A inactivation in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas“. In: *Genes, Chromosomes and Cancer* 25.1 (1999), S. 16–25. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2264(199905)25:1<16::AID-GCC3>3.0.CO;2-2.
- [54] Leitlinienprogramm Onkologie. *S3-Leitlinie, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms. Langversion 1.1*. Nov. 2019.
- [55] M. Beyzadeoglu, G. Ozyigit und U. Selek. *Radiation Therapy for Head and Neck Cancers. A Case-Based Review*. Springer, Cham, 2015. ISBN: 978-3-319-10413-3. DOI: 10.1007/978-3-319-10413-3.
- [56] C. B. Simone et al. „Comparison of Intensity-modulated Radiotherapy, Adaptive Radiotherapy, Proton Radiotherapy, and Adaptive Proton Radiotherapy for Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer“. In: *Radiotherapy and oncology* 101 (3 2011), S. 376–382. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.05.028.
- [57] C. M. Nutting et al. „Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial“. In: *The Lancet Oncology* 12 (2 2011), S. 127–136. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70290-4.
- [58] N. Daly-Schweitzer, M. Juliéron, Y. Gan Tao, A. Moussier und J. Bourhis. „Intensity-modulated radiation therapy (IMRT): Toward a new standard for radiation therapy of head and neck cancer“. In: *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* 128.5 (2011), S. 241–247. DOI: 10.1016/j.anorl.2011.04.001.
- [59] S. Nuyts et al. „Reduction of the dose to the elective neck in head and neck squamous cell carcinoma, a randomized clinical trial using intensity modulated radiotherapy (IMRT). Dosimetrical analysis and effect on acute toxicity“. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 109 (Aug. 2013). DOI: 10.1016/j.radonc.2013.06.044.
- [60] G. Marta et al. „Intensity-modulated radiation therapy for head and neck cancer: Systematic review and meta-analysis“. In: *Radiotherapy and Oncology* 110 (1 Dez. 2013). DOI: 10.1016/j.radonc.2013.11.010.
- [61] S. Bhide und C. Nutting. „Review: Advances in radiotherapy for head and neck cancer“. In: *Oral Oncology* (Apr. 2010). DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.005.
- [62] E. Boakye et al. „Suicide Risk Among Cancer Survivors: Head and Neck Versus Other Cancers“. In: *Cancer* (Okt. 2018). DOI: 10.1002/cncr.31675.
- [63] F. Petrelli, E. Sarti und S. Barni. „Predictive value of human papillomavirus in oropharyngeal carcinoma treated with radiotherapy: An updated systematic review and meta-analysis of 30 trials“. In: *Head and neck* 36 (5 2014). DOI: 10.1002/hed.23351.

- [64] F. Rödel et al. „Modulation of radiation sensitivity and antitumor immunity by viral pathogenic factors: Implications for radio-immunotherapy“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1871.1 (2019), S. 126–137. ISSN: 0304-419X. DOI: 10.1016/j.bbcan.2018.12.006.
- [65] A. Arenz et al. „Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis“. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 190 (2014), S. 839–846. DOI: 10.1007/s00066-014-0605-5.
- [66] B. S. Sørensen et al. „Radiosensitivity and effect of hypoxia in HPV positive head and neck cancer cells“. In: *Radiotherapy and Oncology* 108 (3 2013), S. 500–505. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.06.011.
- [67] R. Dok et al. „p16INK4a Impairs Homologous Recombination–Mediated DNA Repair in Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Tumors“. In: *Cancer Research* 74.6 (März 2014), S. 1739–1751. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2479.
- [68] N. A. Wallace et al. „High-Risk Alphapapillomavirus Oncogenes Impair the Homologous Recombination Pathway“. In: *Journal of Virology* 91.20 (2017), e01084–17. DOI: 10.1128/JVI.01084-17.
- [69] Q. Liu et al. „Subjugation of TGF $\beta$  Signaling by Human Papilloma Virus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Shifts DNA Repair from Homologous Recombination to Alternative End Joining“. In: *Clinical Cancer Research* 24.23 (2018), S. 6001–6014. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1346.
- [70] S. Deschuymer, R. Dok, A. Laenen, E. Hauben und S. Nuyts. „Patient Selection in Papillomavirus Related Oropharyngeal Cancer: The Added Value of Prognostic Models in the New TNM 8th Edition Era“. In: *Frontiers in Oncology* 8 (2018). DOI: 10.3389/fonc.2018.00273.
- [71] J. A. Bonner et al. „Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck“. In: *New England Journal of Medicine* 354.6 (2006), S. 567–578. DOI: 10.1056/NEJMoa053422.
- [72] W.-H. Tang, W. Sun und G.-X. Long. „Concurrent cisplatin or cetuximab with radiotherapy in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma A meta-analysis“. In: *Medicine* 99 (36 Sep. 2020). DOI: 10.1097/MD.00000000000021785.
- [73] H. Mehanna et al. „Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial“. In: *The Lancet* 393.10166 (2019), S. 51–60. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32752-1.
- [74] M. L. Gillison et al. „Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multi-centre, non-inferiority trial“. In: *The Lancet* 393 (10166 2018). DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32779-X.

- [75] D. Rischin et al. „Randomized Trial of Radiation Therapy With Weekly Cisplatin or Cetuximab in Low-Risk HPV-Associated Oropharyngeal Cancer (TROG 12.01) – A Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study“. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 111.4 (2021), S. 876–886. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.04.015.
- [76] J. D. Güster et al. „The inhibition of PARP but not EGFR results in the radiosensitization of HPV/p16-positive HNSCC cell lines“. In: *Radiotherapy and Oncology* 113 (3 2014), S. 345–351. DOI: 10.1016/j.radonc.2014.10.011.
- [77] K. K. Ang et al. „Randomized Phase III Trial of Concurrent Accelerated Radiation Plus Cisplatin With or Without Cetuximab for Stage III to IV Head and Neck Carcinoma: RTOG 0522“. In: *Journal of Clinical Oncology* 32.27 (2014), S. 2940–2950. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.5633.
- [78] N. Brix, L. Dunn, T. Seiwert, C. Belka und K. Lauber. „Immuntherapie bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen“. In: *Der Internist* 61 (2020), S. 682–689. DOI: 10.1007/s00108-020-00816-x.
- [79] H.-F. Kao und P.-J. Lou. „Immune checkpoint inhibitors for head and neck squamous cell carcinoma: Current landscape and future directions“. In: *Head & Neck* 41.S1 (2019), S. 4–18. DOI: 10.1002/hed.25930.
- [80] N. Y. Lee et al. „Avelumab plus standard-of-care chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy alone in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial“. In: *The Lancet Oncology* 22.4 (2021), S. 450–462. ISSN: 1470-2045. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30737-3.
- [81] M. Kashin et al. „Gold Nanoparticles Enhance EGFR Inhibition and Irradiation Effects in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells“. In: *BioMed research international* 2020 (2020). DOI: 10.1155/2020/1281645.
- [82] E. S. Davidi et al. „Cisplatin-conjugated gold nanoparticles as a theranostic agent for head and neck cancer“. In: *Head & Neck* 40.1 (2018), S. 70–78. DOI: 10.1002/hed.24935.
- [83] M. J. Ward et al. „Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer“. In: *British Journal of Cancer* 110 (2014). DOI: 10.1038/bjc.2013.639.
- [84] I. Demers, J. Donkers, B. Kremer und E. Speel. „Ex Vivo Culture Models to Indicate Therapy Response in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma“. In: *Cells* 9 (11 Nov. 2020). DOI: 10.3390/cells9112527.
- [85] S. Lheureux et al. „Adavosertib plus gemcitabine for platinum-resistant or platinum-refractory recurrent ovarian cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial“. In: *The Lancet* 397 (10271 2021). DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32554-X.

- [86] C. J. Busch et al. „HPV-positive HNSCC cell lines but not primary human fibroblasts are radiosensitized by the inhibition of Chk1“. In: *Radiotherapy and Oncology* 108 (3 2013). DOI: 10.1016/j.radonc.2013.06.035.
- [87] C. J. Busch et al. „G2-checkpoint targeting and radiosensitization of HPV/p16-positive HNSCC cells through the inhibition of Chk1 and Wee1“. In: *Radiotherapy and oncology* 122.2 (2017), S. 260–266. DOI: 10.1016/j.radonc.2016.11.017.
- [88] A. N. Weaver et al. „DNA double strand break repair defect and sensitivity to poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibition in human papillomavirus 16-positive head and neck squamous cell carcinoma“. In: *Oncotarget* 6.29 (2015), S. 26995–27007. DOI: 10.18632/oncotarget.4863.
- [89] R. Dok, M. Glorieux, M. Bamps und S. Nuyts. „Effect of ATR Inhibition in RT Response of HPV-Negative and HPV-Positive Head and Neck Cancers“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22.4 (2021). DOI: 10.3390/ijms22041504.
- [90] L. A. Parsels et al. „PARP1 Trapping and DNA Replication Stress Enhance Radiosensitization with Combined WEE1 and PARP Inhibitors“. In: *Molecular cancer research* 16 (2 2018). DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0455.
- [91] K. Hintelmann, M. Kriegs, K. Rothkamm und T. Rieckmann. „Improving the Efficacy of Tumor Radiosensitization Through Combined Molecular Targeting“. In: *Frontiers in Oncology* 10 (2020). DOI: 10.3389/fonc.2020.01260.
- [92] L. A. Parsels et al. „Combinatorial Efficacy of Olaparib with Radiation and ATR Inhibitor Requires PARP1 Protein in Homologous Recombination–Proficient Pancreatic Cancer“. In: *Small Molecule Therapeutics* 20 (2 2021). DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0365.
- [93] S. F. Powell, L. Vu, W. C. Spanos und D. Pyeon. „The Key Differences between Human Papillomavirus-Positive and -Negative Head and Neck Cancers: Biological and Clinical Implications“. In: *Cancers* 13.20 (2021). DOI: 10.3390/cancers13205206.
- [94] E. M. Rettig et al. „Oropharyngeal cancer is no longer a disease of younger patients and the prognostic advantage of Human Papillomavirus is attenuated among older patients: Analysis of the National Cancer Database“. In: *Oral Oncology* 83 (2018), S. 147–153. ISSN: 1368-8375. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.06.013.
- [95] H. B. Zech et al. „Patient derived ex vivo tissue slice cultures demonstrate a profound DNA double-strand break repair defect in HPV-positive oropharyngeal head and neck cancer“. In: *Radiotherapy and Oncology* 168 (2022), S. 138–146. DOI: 10.1016/j.radonc.2022.01.017.
- [96] C. Schneider, W. Rasband und K. Eliceiri. „NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis“. In: *Nat Methods* 9 (2012), S. 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- [97] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2021. URL: <https://www.R-project.org/>.

- [98] P. Kegel, E. Riballo, M. Kühne, P. A. Jeggo und M. Löbrich. „X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact“. In: *DNA Repair* 6.11 (2007), S. 1692–1697. ISSN: 1568-7864. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.05.013.
- [99] K. Hintelmann et al. „Dual Inhibition of PARP and the Intra-S/G2 Cell Cycle Checkpoints Results in Highly Effective Radiosensitization of HPV-Positive HNSCC Cells“. In: *Frontiers in oncology* 11 (2021). DOI: 10.3389/fonc.2021.683688.
- [100] N. Brix et al. „The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation“. In: *Radiation Oncology* 15 (2020). DOI: 10.1186/s13014-020-01697-y.
- [101] N. Franken, H. Rodermond, J. Stap, J. Haveman und C. van Bree. „Clonogenic assay of cells in vitro“. In: *Nature Protocols* (2006). DOI: 10.1038/nprot.2006.339.
- [102] S. Köcher et al. „A functional ex vivo assay to detect PARP1-EJ repair and radiosensitization by PARP-inhibitor in prostate cancer“. In: *Int J Cancer* 144 (7 Apr. 2019), S. 1685–1696. DOI: 10.1002/ijc.32018.
- [103] J. Berger et al. „Kinomic comparison of snap frozen and ex vivo-cultured head and neck tumors“. In: *Oral oncology* 123 (Dez. 2021), S. 105603. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2021.105603.
- [104] S. Schmitz. *Der Experimentator: Zellkultur*. Springer Spektrum, 2011. ISBN: 978-3-8274-2573-7.
- [105] A. Brandis-Heep, E. Kothe und T. Zimmermann. *Methoden der Mikrobiologie*. Hrsg. von A. Störko. 1. Aufl. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2020.
- [106] J. Wohlschlegel, J. Kutok, A. Weng und A. Dutta. „Expression of Geminin as a Marker of Cell Proliferation in Normal Tissues and Malignancies“. In: *The American journal of pathology* 161 (1 2002). DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64178-8.
- [107] S. Steurer, C. Riemann und F. Büscheck. „p63 expression in human tumors and normal tissues: a tissue microarray study on 10 200 tumors“. In: *Biomarker research* 9 (1 2021). DOI: 10.1186/s40364-021-00260-5.
- [108] N. Khan et al. „Diagnostic utility of p63 (Ab-1) and (Ab-4) tumor markers in the squamous cell carcinomas of head and neck“. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13 (3 2012). DOI: 10.7314/apjcp.2012.13.3.975.
- [109] S. Köcher et al. „Fully automated counting of DNA damage foci in tumor cell culture: A matter of cell separation“. In: *DNA Repair* 102 (2021), S. 103100. ISSN: 1568-7864. DOI: 10.1016/j.dnarep.2021.103100.
- [110] K. Rothkamm et al. „Manual versus automated  $\gamma$ -H2AX foci analysis across five European laboratories: Can this assay be used for rapid biodosimetry in a large scale radiation accident?“. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 756.1 (2013). From DNA Damage to Chromosomal Aberrations, S. 170–173. ISSN: 1383-5718. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.04.012.

- [111] A. N. Ivashkevich et al. „ $\gamma$ H2AX foci as a measure of DNA damage: A computational approach to automatic analysis“. In: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711.1 (2011). From chemistry of DNA damage to repair and biological significance. Comprehending the future, S. 49–60. ISSN: 0027-5107. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.12.015.
- [112] S. Koundrioukoff et al. „Stepwise Activation of the ATR Signaling Pathway upon Increasing Replication Stress Impacts Fragile Site Integrity“. In: *PLOS Genetics* 9.7 (Juli 2013), S. 1–9. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003643.
- [113] D. Gupta, B. Lin, A. Cowan und C. D. Heinen. „ATR-Chk1 activation mitigates replication stress caused by mismatch repair-dependent processing of DNA damage“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.7 (2018), S. 1523–1528. DOI: 10.1073/pnas.1720355115.
- [114] A. Sak und M. Stuschke. „Use of  $\gamma$ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy“. In: *Seminars in radiation oncology* 20 (4 2010). DOI: 10.1016/j.semradonc.2010.05.004.
- [115] O. A. Martin et al. „Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity“. In: *DNA Repair* 12.10 (2013), S. 844–855. DOI: 10.1016/j.dnarep.2013.07.002.
- [116] G. Gaëtan et al. „Cell to Cell Variability of Radiation-Induced Foci: Relation between Observed Damage and Energy Deposition“. In: *PloS one* 11 (Jan. 2016), e0145786. DOI: 10.1371/journal.pone.0145786.
- [117] H. Beck et al. „Cyclin-dependent kinase suppression by WEE1 kinase protects the genome through control of replication initiation and nucleotide consumption“. In: *Molecular and cellular biology* 32 (20 2012). DOI: 10.1128/MCB.00412-12.
- [118] S. Laban et al. „Sorafenib sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to ionizing radiation“. In: *Radiotherapy and Oncology* 109.2 (2013), S. 286–292. ISSN: 0167-8140. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.07.003.
- [119] J. M. Bland und D. G. Altman. „Measuring agreement in method comparison studies“. In: *Statistical Methods in Medical Research* 8.2 (1999), S. 135–160. DOI: 10.1177/096228029900800204.
- [120] L. Luzhna, P. Kathiria und O. Kovalchuk. „Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond“. In: *Frontiers in Genetics* 4 (2013). DOI: 10.3389/fgene.2013.00131.
- [121] B. S. Chera et al. „Phase 2 Trial of De-intensified Chemoradiation Therapy for Favorable-Risk Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma“. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 93 (2015). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2015.08.033.

- [122] R. L. Ferris et al. „Phase II Randomized Trial of Transoral Surgery and Low-Dose Intensity Modulated Radiation Therapy in Resectable p16+ Locally Advanced Oropharynx Cancer: An ECOG-ACRIN Cancer Research Group Trial (E3311)“. In: *Journal of Clinical Oncology* 40.2 (2022), S. 138–149. DOI: 10.1200/JCO.21.01752.
- [123] S. Krishnamurthy et al. „The dogma of Cetuximab and Radiotherapy in head and neck cancer – A dawn to dusk journey“. In: *Clinical and Translational Radiation Oncology* 34 (2022). DOI: 10.1016/j.ctro.2022.03.009.
- [124] K. K. Ang et al. „Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer“. In: *New England Journal of Medicine* 363.1 (2010), S. 24–35. DOI: 10.1056/NEJMoa0912217.
- [125] M. Moutafi, P. Economopoulou, D. Rimm und A. Psyri. „PARP inhibitors in head and neck cancer: Molecular mechanisms, preclinical and clinical data“. In: *Oral Oncology* 117 (2021), S. 105292. ISSN: 1368-8375. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2021.105292.
- [126] D. Adkins et al. „Palbociclib and cetuximab in platinum-resistant and in cetuximab-resistant human papillomavirus-unrelated head and neck cancer: a multicentre, multigroup, phase 2 trial“. In: *The Lancet Oncology* 20 (9 2019). DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30405-X.
- [127] K. A. Gold et al. „Abstract CT134: A phase I study of avelumab, palbociclib, and cetuximab (APC) in recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (RM HNSCC)“. In: *Cancer Research* 81.13 (Juli 2021). DOI: 10.1158/1538-7445.AM2021-CT134.
- [128] J. M. Molkenkine et al. „Targeting DNA damage response in head and neck cancers through abrogation of cell cycle checkpoints“. In: *International Journal of Radiation Biology* 97.8 (2021), S. 1121–1128. DOI: 10.1080/09553002.2020.1730014.
- [129] D. Karnak et al. „Combined Inhibition of Wee1 and PARP1/2 for Radiosensitization in Pancreatic Cancer“. In: *Clinical Cancer Research* 20.19 (Sep. 2014), S. 5085–5096. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1038.
- [130] S. Hye-Rim et al. „Inhibition of WEE1 Potentiates Sensitivity to PARP Inhibitor in Biliary Tract Cancer“. In: *Cancer Res Treat* 54.2 (2022), S. 541–553. DOI: 10.4143/crt.2021.473.
- [131] N. Taku et al. „Proton Therapy for HPV-Associated Oropharyngeal Cancers of the Head and Neck: a De-Intensification Strategy“. In: *Current Treatment Options in Oncology* 22.6 (Juni 2021). DOI: 10.1007/s11864-021-00847-y.
- [132] MD Anderson Cancer Center. *Randomized trial of intensity-modulated proton beam therapy (IMPT) versus intensity-modulated photon therapy (IMRT) for the treatment of oropharyngeal cancer of the head and neck*. 2022. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01893307> (besucht am 08.07.2022).



- [133] J. Price, E. Hall, C. West und D. Thomson. „TORPEdO – A Phase III Trial of Intensity-modulated Proton Beam Therapy Versus Intensity-modulated Radiotherapy for Multi-toxicity Reduction in Oropharyngeal Cancer“. In: *Clinical Oncology* 32 (2 2020). DOI: 10.1016/j.clon.2019.09.052.
- [134] L. Wang et al. „Human papillomavirus status and the relative biological effectiveness of proton radiotherapy in head and neck cancer cells“. In: *Head & Neck* 39.4 (2017), S. 708–715. DOI: 10.1002/hed.24673.
- [135] L. Wang et al. „Proton versus photon radiation-induced cell death in head and neck cancer cells“. In: *Head & Neck* 41.1 (2019), S. 46–55. DOI: 10.1002/hed.25357.
- [136] S. Lerch et al. „HPV-positive HNSCC cell lines show strongly enhanced radiosensitivity after photon but not after carbon ion irradiation“. In: *Radiotherapy and Oncology* 151 (2020). DOI: 10.1016/j.radonc.2020.07.032.
- [137] T. Hirai et al. „Radiosensitization by PARP inhibition to proton beam irradiation in cancer cells“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478.1 (2016), S. 234–240. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.062.
- [138] E. T. Vitti, A. Kacperek und J. L. Parsons. „Targeting DNA Double-Strand Break Repair Enhances Radiosensitivity of HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Photons and Protons“. In: *Cancers* 12.6 (2020). DOI: 10.3390/cancers12061490.
- [139] L. Wang et al. „Proton and photon radiosensitization effects of niraparib, a PARP-1/-2 inhibitor, on human head and neck cancer cells“. In: *Head & Neck* 42.9 (2020), S. 2244–2256. DOI: 10.1002/hed.26155.
- [140] T. W. Lee et al. „Patient-Derived Xenograft and Organoid Models for Precision Medicine Targeting of the Tumour Microenvironment in Head and Neck Cancer“. In: *Cancers* 12.12 (2020). DOI: 10.3390/cancers12123743.
- [141] H. Gao et al. „High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response“. In: *Nature Medicine* 21 (2015), S. 1318–1325. DOI: 10.1038/nm.3954.
- [142] J. K. Lilja-Fischer et al. „Characterization and radiosensitivity of HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma patient-derived xenografts“. In: *Acta Oncologica* 58.10 (2019), S. 1489–1494. DOI: 10.1080/0284186X.2019.1660802.
- [143] I. Demers, J. Donkers, B. Kremer und E. J. Speel. „Ex Vivo Culture Models to Indicate Therapy Response in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma“. In: *Cells* 9.11 (2020). ISSN: 2073-4409. DOI: 10.3390/cells9112527.
- [144] A. Menegakis et al. „ $\gamma$ H2AX assay in ex vivo irradiated tumour specimens: A novel method to determine tumour radiation sensitivity in patient-derived material“. In: *Radiotherapy and Oncology* 116 (3 2015). DOI: 10.1016/j.radonc.2015.03.026.

- [145] T. Rassamegevanon, S. Löck, M. Baumann, M. Krause und von Cläre Neubeck. „Heterogeneity of  $\gamma$ H2AX Foci Increases in Ex Vivo Biopsies Relative to In Vivo Tumors“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19.9 (Sep. 2018), S. 2616. DOI: 10.3390/ijms19092616.
- [146] J. Smith et al. „The effects of continued smoking in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: A systematic review and meta-analysis“. In: *Radiotherapy and Oncology* 135 (2019), S. 51–57. DOI: 10.1016/j.radonc.2019.02.021.
- [147] M. M. Gerlach et al. „Slice cultures from head and neck squamous cell carcinoma: a novel test system for drug susceptibility and mechanisms of resistance“. In: *British journal of cancer* 110 (2 2014). DOI: 10.1038/bjc.2013.700.
- [148] S. Oeck, N. M. Malewicz, S. Hurst, J. Rudner und V. Jendrossek. „The Focinator - a new open-source tool for high-throughput foci evaluation of DNA damage“. In: *Radiation oncology* 10 (2015). DOI: 10.1186/s13014-015-0453-1.
- [149] G. Poludniowski, G. Landry, F. DeBlois, P. M. Evans und F. Verhaegen. „*SpekCalc*: a program to calculate photon spectra from tungsten anode x-ray tubes“. In: *Physics in Medicine and Biology* 54.19 (Sep. 2009), N433–N438. DOI: 10.1088/0031-9155/54/19/n01.
- [150] *Fluorescence SpectraViewer*. März 2022. URL: <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer?SID=srch-svtool&UID=AF-Plus-488#!/share-state/7/SVbDNA~11001ph8/405~488///GFP-DAPI/2~/40> (besucht am 08.07.2022).
- [151] *Fluorescence SpectraViewer*. März 2022. URL: <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer?SID=srch-svtool&UID=AF-Plus-488#!/share-state/7/SVbDNA~11001ph8~11005p72/////~/40> (besucht am 08.07.2022).

# 8 Abbildungsverzeichnis

1	Wahrscheinlichkeiten der Wechselwirkungseffekte von Photonenstrahlung in Materie . . . . .	16
2	Das linear-quadratische Modell (LQM) . . . . .	21
3	Kinetik der DNA-Reparatur . . . . .	29
4	Übersicht zu den verschiedenen DNA-Reparaturwegen . . . . .	30
5	Vergleich der Strahlenempfindlichkeit von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC . . . . .	36
6	Quantifizierung residueller 53BP1 Reparaturfoci in <i>ex vivo</i> Gewebeschnitten . . . . .	58
7	Proliferation nach Inhibitorbehandlung (HPV-positiv) . . . . .	62
8	Fraktion der mitotischen Zellen (HPV-positiv) . . . . .	63
9	Zellzyklus 24 h nach PARP/Wee1-Inhibition und Bestrahlung (HPV-positiv) . . . . .	63
10	Zellzyklus 24 h nach PARP-Inhibition und Bestrahlung (HPV-positiv) . . . . .	64
11	Quantifizierung der $\gamma$ H2AX-Färbung 24 h nach Inhibitorbehandlung (HPV-positiv) . . . . .	66
12	Überleben im <i>delayed-plating</i> Koloniebildungstest (HPV-positiv) . . . . .	67
13	Residuelle 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-positiv) . . . . .	68
14	Distribution residueller 53BP1 Reparaturfoci (UPCI-SCC-154) . . . . .	70
15	Darstellung residueller 53BP1 Reparaturfoci, aufgeschlüsselt in G <sub>1</sub> - und S/G <sub>2</sub> -Phase-Zellen . . . . .	71
16	Anteil der Zellen mit maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-positiv) . . . . .	72
17	Intensität der $\gamma$ H2AX-Färbung nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv) . . . . .	74
18	Zellüberleben nach PARP/Wee1- oder Wee1-Inhibition und Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv) . . . . .	75
19	Zellen mit maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen Reparaturfoci nach Nukleosid-Behandlung (HPV-positiv) . . . . .	76
20	Proliferation nach Inhibitorbehandlung (HPV-negativ) . . . . .	78
21	Fraktion der mitotischen Zellen (HPV-negativ) . . . . .	78
22	Zellzyklus 12 h nach Bestrahlung (HPV-negativ) . . . . .	79
23	Intensität der $\gamma$ H2AX-Färbung 26 h nach Inhibitorbehandlung (HPV-negativ) . . . . .	80
24	Überleben im <i>delayed-plating</i> Koloniebildungstest (HPV-negativ) . . . . .	81
25	Färbung und Quantifizierung pan-nukleär gefärbter $\gamma$ H2AX-positiver Zellen (HPV-negativ) . . . . .	81
26	Residuelle 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-negativ) . . . . .	82
27	Anteil der Zellen mit maximal drei ( $\leq 3$ ) residuellen 53BP1 Foci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-negativ) . . . . .	83
28	Intensität der $\gamma$ H2AX-Färbung 4 h nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe (HPV-negativ) . . . . .	84

29	Quantifizierung residueller 53BP1 Reparaturfoci nach Bestrahlung in <i>ex vivo</i> Gewebeschnitten . . . . .	87
30	Residuelle 53BP1 Reparaturfoci nach PARP/Wee1-Inhibition und Bestrahlung mit 3 Gy in <i>ex vivo</i> Gewebeschnitten . . . . .	88
31	Vergleich der manuellen und automatisierten Auszählung der Zellkerne . . . . .	89
32	Beispiele für Fehlerquellen in der automatisierten Auszählung . . . . .	90
33	Vergleich der manuellen und automatisierten Auszählung der Zellkerne in den UM-SCC-47 . . . . .	91
34	Bland-Altman-Diagramm . . . . .	93
35	Vergleich der manuellen Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit zwei Methoden der automatisierten Foci Auszählung . . . . .	94
A.1	Spektrum der Röntgenröhre . . . . .	126
A.2	Dosisverlauf der Gulmay Röntgenröhre . . . . .	127
A.3	Verarbeitung der <i>ex vivo</i> Gewebeschnitte . . . . .	127
A.4	Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe (Durchflusszytometer) . . . . .	128
A.5	Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe (IF) . . . . .	128
A.6	Quantifizierung der $\gamma$ H2AX-Signalintensität 24 h nach PARP-Inhibition und Bestrahlung mit 0 Gy und 6 Gy (HPV-positiv) . . . . .	131
A.7	Intensität der $\gamma$ H2AX-Färbung 24 h nach Inhibitorbehandlung (HPV-positiv) . . . . .	132
A.8	Tumorspezifität der dualen Inhibition . . . . .	132
A.9	Ausplattierungseffizienz der HPV-positiven Zellen nach PARP/Wee1-Inhibition . . . . .	133
A.10	Ausplattierungseffizienz der HPV-positiven Zellen nach Inhibition und Nukleosid-Zugabe . . . . .	134
A.11	Distribution residueller 53BP1 Reparaturfoci (UD-SCC-2) . . . . .	136
A.12	Distribution residueller 53BP1 Reparaturfoci (UM-SCC-47) . . . . .	137
A.13	Zellen mit mindestens 20 residuellen Foci mit und ohne Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv) . . . . .	138
A.14	Intensität der $\gamma$ H2AX-Färbung 4 h nach Einzelbehandlung mit den Inhibitoren und Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv) . . . . .	138
A.15	Proliferation der Zellen nach Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv) . . . . .	139
A.16	Zellzyklusverteilung 24 h nach Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv) . . . . .	139
A.17	Intensität der $\gamma$ H2AX-Färbung 24 h nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung (HPV-negativ) . . . . .	140
A.18	Ausplattierungseffizienz der HPV-negativen Zellen nach PARP/Wee1-Inhibition . . . . .	140
A.19	Intensität der $\gamma$ H2AX-Färbung 24 h nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe (HPV-negativ) . . . . .	141
A.20	Mindestens 20 ( $\geq 20$ ) residuelle 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-negativ) . . . . .	141
A.21	Weitere Beispiele für Fehlerquellen in der automatisierten Auszählung . . . . .	142
A.22	Bland-Altman-Diagramme zum Vergleich der manuellen Auszählung mit zwei Methoden der automatisierten Auszählung . . . . .	144
A.23	Beispiele für die vier <i>Thresholds</i> bei Einsatz von der Methode <i>Analyze Particles</i> zur Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci . . . . .	145

## 9 Tabellenverzeichnis

Ursprung der Zelllinien . . . . .	42
Medien in der Zellkultur . . . . .	43
Primäre Antikörper in der Zellkultur . . . . .	44
Primäre Antikörper in <i>ex vivo</i> Gewebekultur . . . . .	44
Sekundäre Antikörper in der Zellkultur . . . . .	45
Sekundäre Antikörper in <i>ex vivo</i> Gewebekultur . . . . .	45
Chemikalien und Reagenzien . . . . .	46
Puffer und Lösungen . . . . .	46
Verbrauchsmaterialien . . . . .	47
Geräte . . . . .	48
Software . . . . .	48
12 Vergleich der Ergebnisse von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien . .	85
A.1 Übersicht zu den ausgesäten Zellzahlen . . . . .	129
A.2 Ausgesäte Zellzahlen im <i>delayed-plating</i> Koloniebildungstest . . . . .	130
A.3 Verteilung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UD-SCC-2 . . . . .	135
A.4 Verteilung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UM-SCC-47 . . . . .	135
A.5 Verteilung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UPCI-SCC-154 . . . .	135
A.6 Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms zur automatisierten Zellkernzählung	143
A.7 Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms zur automatisierten Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode <i>Find Maxima</i> . . . . .	143
A.8 Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms zur automatisierten Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode <i>Find Maxima</i> und manuell bestimmter Zellkernzahl . . . . .	143
A.9 Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms zur automatisierten Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode <i>Analyze Particles</i> . . . . .	144

# A Anlagen

## A.1 Bestrahlung

### A.1.1 Spektrum der Röntgenröhre

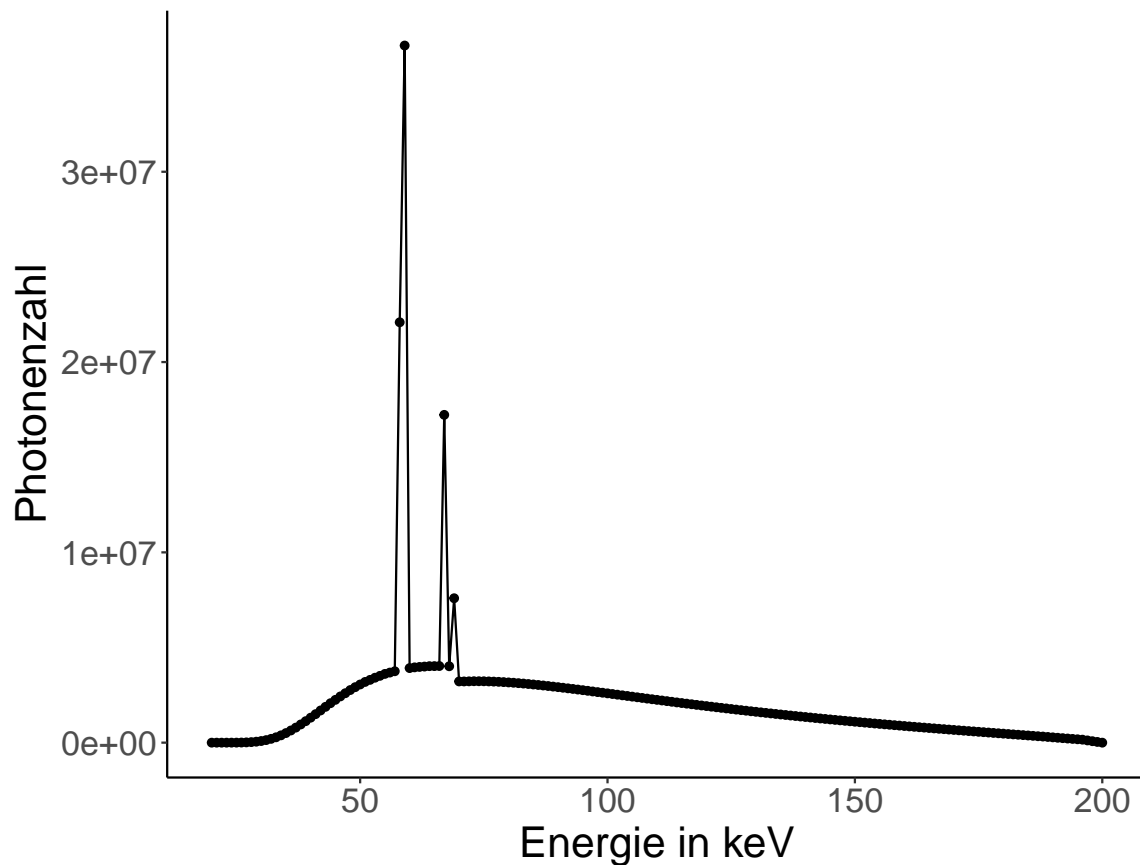


Abb. A.1: **Spektrum der Gulmay Röntgenröhre.** Die Berechnung des Röntgenspektrums erfolgte mit folgenden Werten: Spannung: 200 keV; Anodematerial: Wolfram; Anodenwinkel: 20°; Filterung: 0.8 mm Be (Eigenfilterwert) + 0.5 mm Cu; Abstand in Luft: 266 mm. Die Berechnung wurde im Programm *SpekCalc* von Frau Professor Elisabetta Gargioni durchgeführt [149].

## A.1.2 Dosisverlauf und Dosisverteilung im Strahlungsfeld

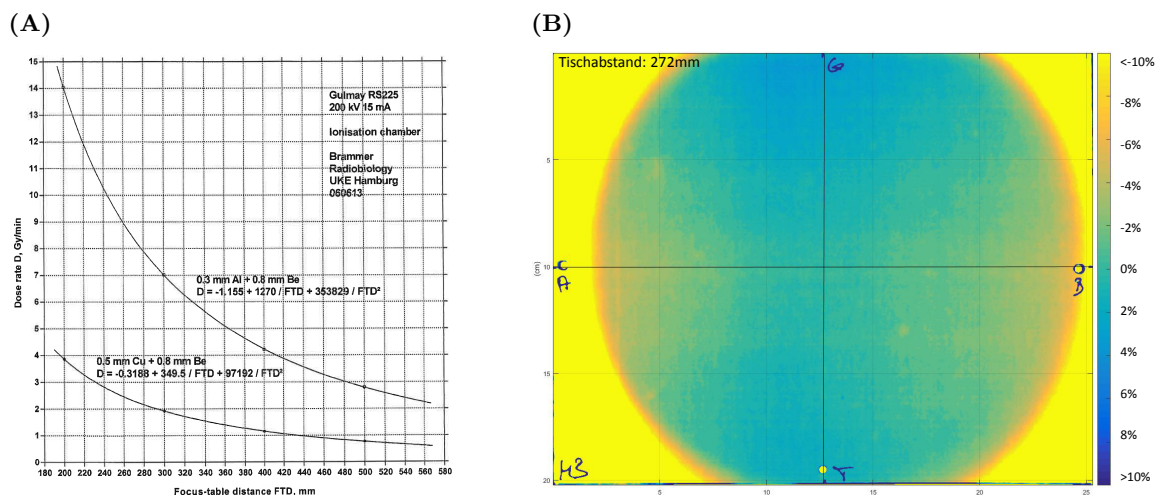


Abb. A.2: **Dosisverlauf der Gulmay Röntgenröhre.** (A): Dosis in Abhängigkeit vom Tischabstand. Dargestellt für zwei verschiedene Filter. (B): Dosishomogenität im Bestrahlungsfeld bei einem Tischabstand von 272 mm. Vermessen von Dr. Tobias Gauer mit einem Film-Dosimeter. Es ist ein leichter Rechts-Shift des Bestrahlungsfeldes erkennbar.

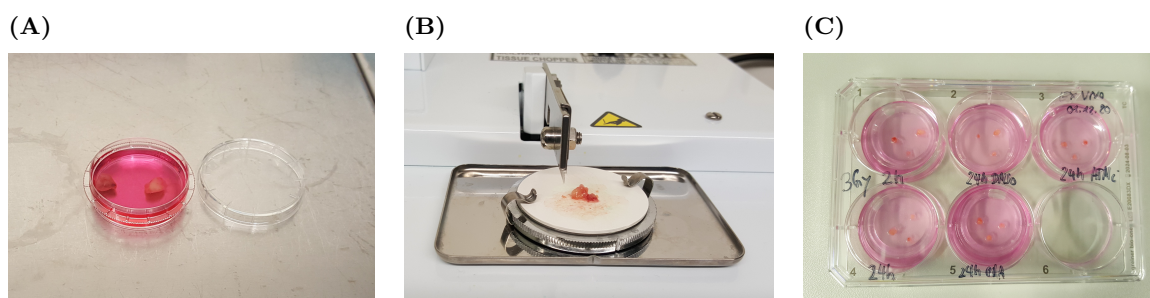
A.2 Verarbeitung der *ex vivo* Gewebeschnitte

Abb. A.3: **Verarbeitung der *ex vivo* Gewebeschnitte.** (A): Gewebestücke in DMEM-Medium vor der Verarbeitung. (B): Schneiden eines Gewebestückes mit dem Gewebeerhacker (*Tissue chopper*) (C): Verarbeitete Gewebeschnitte auf Membranen in einer 6-well-Platte.

## A.3 Fluoreszenzspektren

### A.3.1 Beispielspektren in der Durchflusszytometrie

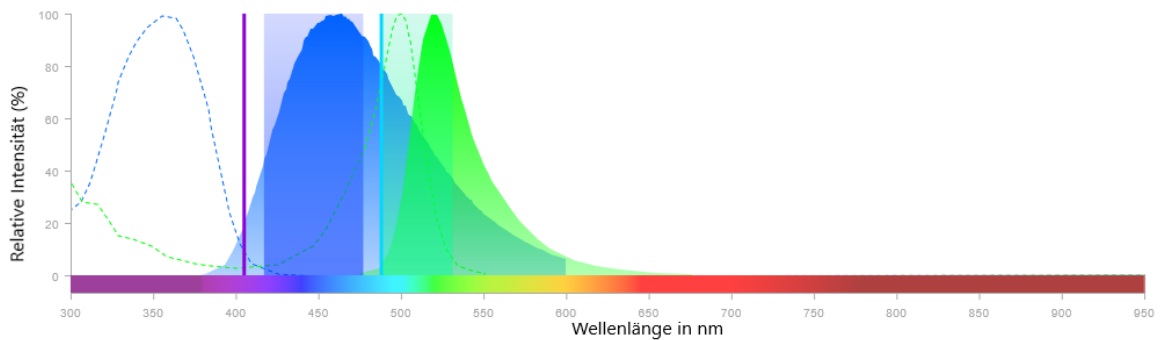


Abb. A.4: **Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe (Durchflusszytometer)**. Dargestellt sind die in der Durchflusszytometrie eingesetzten Farbstoffe Alexa Fluor 488 und DAPI. Bei den gestrichelten Linien handelt es sich um die Absorptionsspektren, bei den durchgezogenen Linien um die Emmisionsspektren der Farbstoffe. Die vertikalen durchgezogenen Linien stellen das Anregungslicht dar. Der Bereich der nach Einsatz der Filter im Durchflusszytometer ausgelesen wird, ist in der Abbildung schattiert dargestellt. Die Abbildung ist modifiziert nach [150].

### A.3.2 Beispielspektren in der Immunfluoreszenz

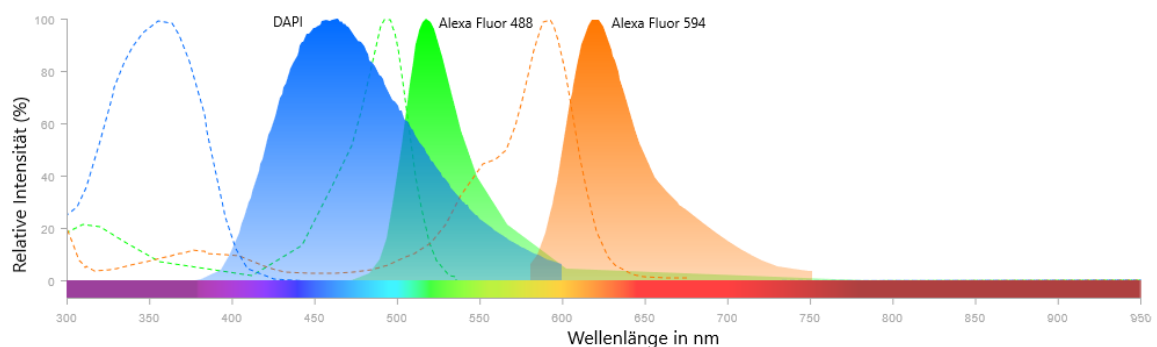


Abb. A.5: **Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe (IF)**. Dargestellt sind die in der IF eingesetzten Farbstoffe Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 und DAPI. Bei den gestrichelten Linien handelt es sich um die Absorptionsspektren, bei den durchgezogenen Linien um die Emmisionsspektren der Farbstoffe. Die Abbildung ist modifiziert nach [151].



## A.4 Übersicht über die ausgesäten Zellzahlen

Versuch	Zelllinie	ausgesäte Zellzahl
Proliferation	HSC4, SAS, UT-SCC-60A	12 500
Proliferation (nach Nukleosiden)	UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154	75 000
Fraktion mitotischer Zellen	HSC4, SAS, UT-SCC-60A	500 000–750 000
	UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154	500 000–750 000
Zellzyklus (24 h)	UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154	200 000
Zellzyklus (12 h)	HSC4, SAS, UT-SCC-60A	150 000
Replikationsstress (24 h)	UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154	500 000–750 000
	HSC4, SAS, UT-SCC-60A	400 000
Replikationsstress (4 h) (nach Nukleosiden)	UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154	750 000
	HSC4, SAS, UT-SCC-60A	500 000
Radiosensibilisierung	UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154	500 000
	HSC4, SAS, UT-SCC-60A	400 000
Residuelle Reparaturfoci	UD-SCC-2, UM-SCC-47, UPCI-SCC-154	200 000
	HSC4, UT-SCC-60A	150 000
	SAS	100 000

Tabelle A.1: Übersicht zu den ausgesäten Zellzahlen

## A.5 Zellzahlen im *delayed-plating* Koloniebildungstest

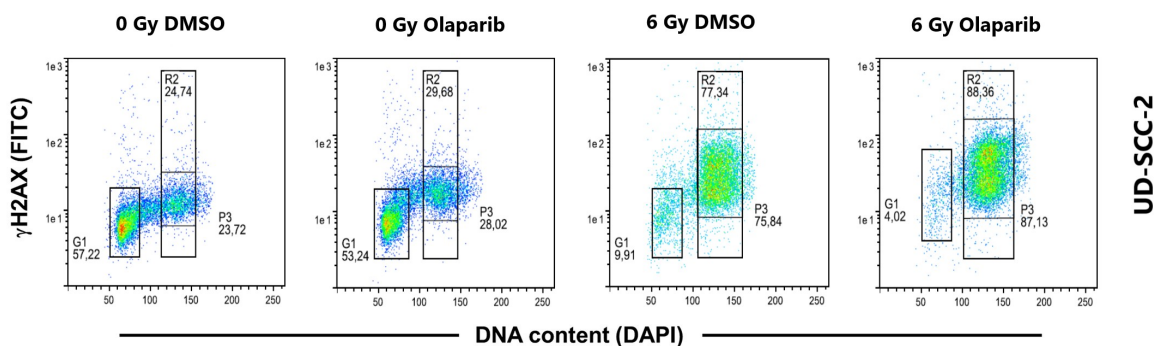
Zelllinie	Kulturgefäß	ausgesäte Zellzahl
UD-SCC-2	T25er	0 Gy: 300 Zellen, 3 Gy: 1 000 Zellen, 6 Gy: 6 000/10 000 Zellen
UPCI-SCC-154	T25er	0 Gy: 700 Zellen, 3 Gy: 2 500 Zellen, 6 Gy: 10 000/20 000 Zellen Einsatz von Amniomax Supplement
UM-SCC-47	T25er	0 Gy: 240 Zellen, 3 Gy: 800 Zellen, 6 Gy: 4 000/12 000 Zellen Einsatz von <i>Feederzellen</i>
93-VU-147T	T25er	0 Gy: 500 Zellen, 2 Gy: 500 Zellen, 4 Gy: 2 000 Zellen, 6 Gy: 3 000/10 000 Zellen
UT-SCC-45	6-wells	0 Gy: 150 Zellen, 2 Gy: 150 Zellen, 4 Gy: 750 Zellen, 6 Gy: 750/4 000 Zellen
HSC4	6-wells	0 Gy: 150 Zellen, 3 Gy: 250 Zellen, 6 Gy: 400/2 000 Zellen
SAS, UT-SCC-60A	6-wells	0 Gy: 150 Zellen, 3 Gy: 250 Zellen, 6 Gy: 500/2 000 Zellen

Tabelle A.2: Ausgesäte Zellzahlen im *delayed-plating* Koloniebildungstest

## A.6 Zusätzliches Material der HPV-positiven Zelllinien

### A.6.1 Replikationsstress nach PARP-Inhibition und Bestrahlung

(A)



(B)

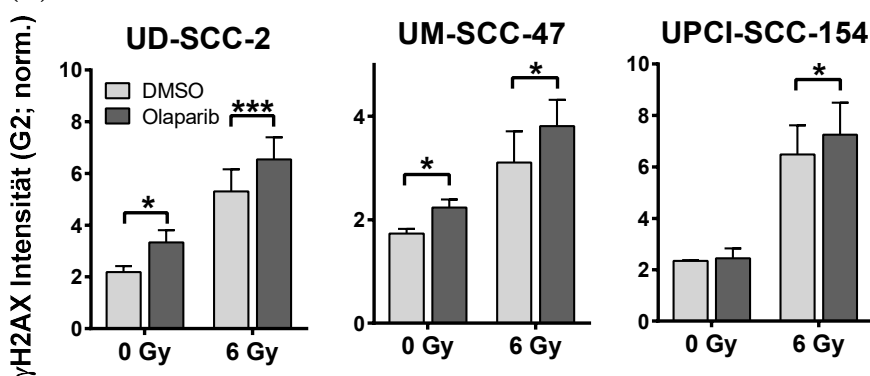


Abb. A.6: Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität 24 h nach PARP-Inhibition und Bestrahlung mit 0 Gy und 6 Gy (HPV-positiv). (A): Beispiel für das Gating der  $\gamma$ H2AX-positiven S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen. (B): Quantifizierung des Median der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in den  $\gamma$ H2AX-positiven S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen. Dargestellt ist der Median der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität, die individuellen Werte sind auf die G<sub>1</sub>-Phase der unbehandelten Kontrolle normiert. Die p-Werte auf Basis des zweiseitigen t-Tests sind in den Graphiken mit Asterisk (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001) markiert.

### A.6.2 Replikationsstress nach dualer Inhibition

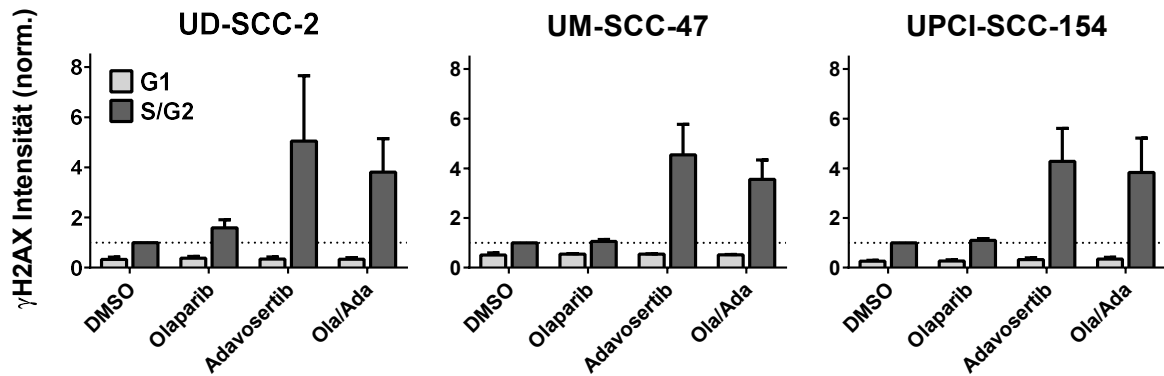


Abb. A.7: **Intensität der  $\gamma$ H2AX-Färbung 24 h nach Inhibitorbehandlung (HPV-positiv)**. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 24 h nach der Bestrahlung fixiert. Die Messung der  $\gamma$ H2AX-Intensität erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität, normiert auf die S/G<sub>2</sub>-Phase der unbehandelten Kontrolle.

### Radiosensibilisierung von Fibroblasten

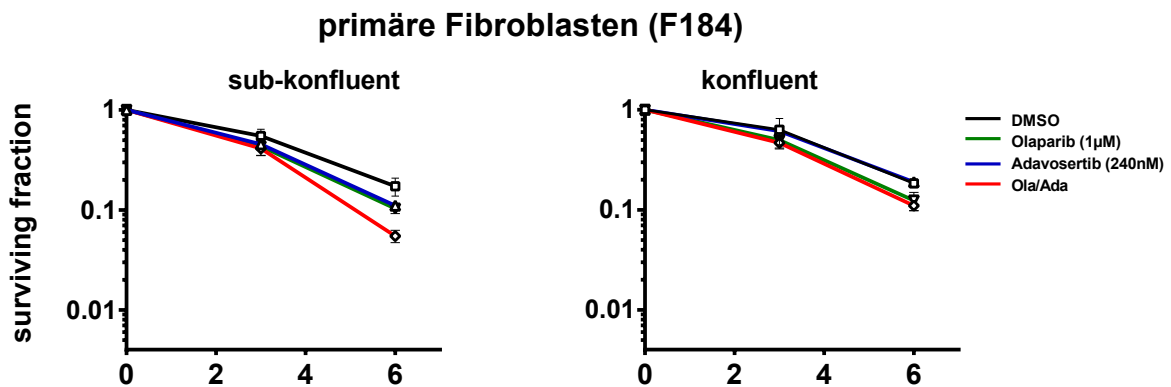


Abb. A.8: **Tumorspezifität der dualen Inhibition**. Radiosensibilisierung von Fibroblasten (F184) nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy im *delayed plating* Koloniebildungstest. In der linken Abbildung ist das Überleben sub-konfluenten, proliferierender Fibroblasten gezeigt. In diesen ist eine geringe Radiosensibilisierung durch die duale Inhibition zu erkennen. In der rechten Abbildung ist das Überleben konfluenten Fibroblasten gezeigt, hier hat die duale Inhibition einen deutlich geringeren Effekt. Der Einsatz von Adavosertib hat gar keinen Effekt (die blaue und die schwarze Linie verlaufen auf einer Höhe). Die *delayed-plating* Koloniebildungstests zur Untersuchung der Radiosensibilisierung von Fibroblasten wurden von T. Behrens durchgeführt [99].

A.6.3 Radiosensibilisierung im *delayed-plating* Koloniebildungstest

## Ausplattierungseffizienz im Koloniebildungstest

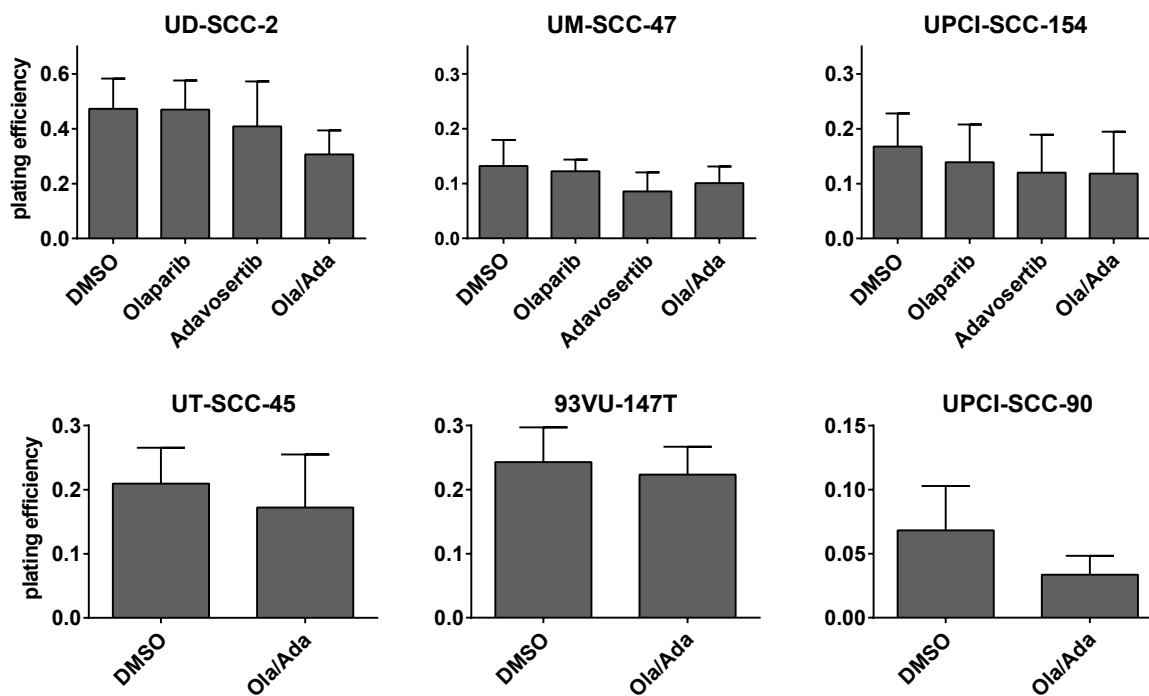
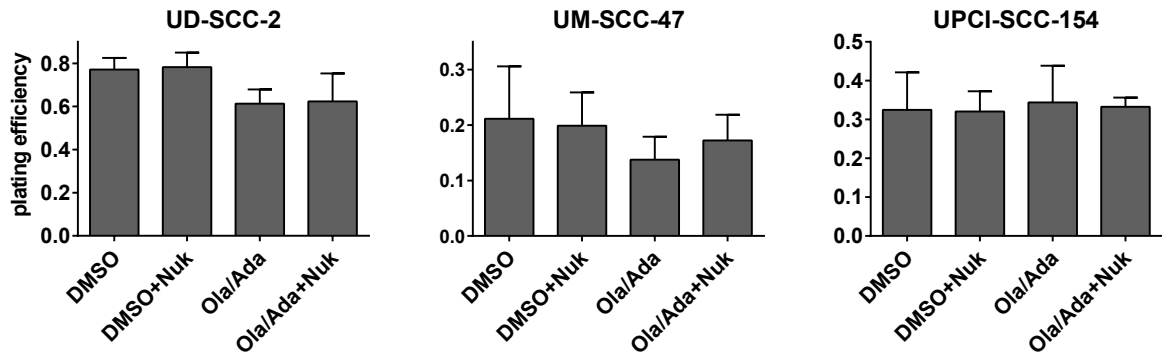


Abb. A.9: Ausplattierungseffizienz der HPV-positiven Zellen nach PARP/Wee1-Inhibition. Gezeigt ist die PE der HPV-positiven Zelllinien nach Inhibitorbehandlung im *delayed-plating* Koloniebildungstest.

Ausplattierungseffizienz im Koloniebildungstest nach Nukleosid-Zugabe

(A)



(B)

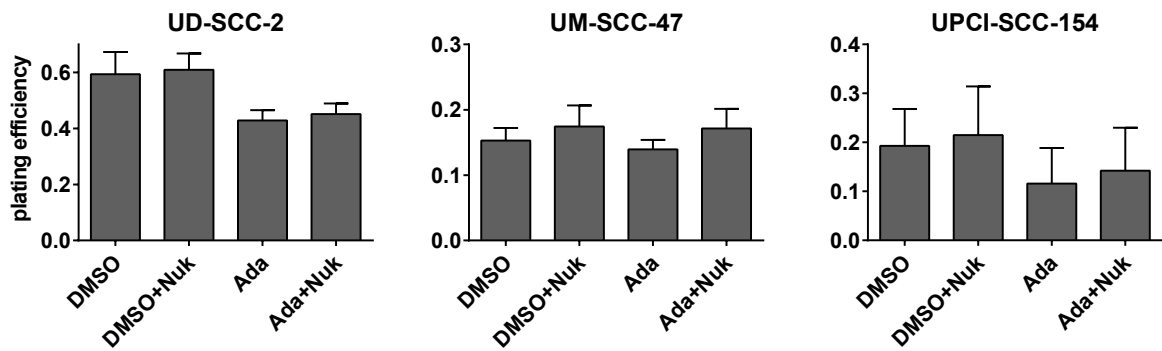


Abb. A.10: Ausplattierungseffizienz der HPV-positiven Zellen nach Inhibition und Nukleosid-Zugabe. Gezeigt ist die PE der HPV-positiven Zelllinien nach Inhibitor- und Nukleosid-Zugabe im *delayed-plating* Koloniebildungstest. (A): PARP/Wee1-Inhibition (B): Wee1-Inhibition

### A.6.4 Residuelle 53BP1 Reparaturfoci nach Inhibitorbehandlung

Tabellen zu den Histogrammen der residuellen 53BP1 Reparaturfoci

Behandlung	Median		Mittelwert		SD	
	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>
0 Gy DMSO	2.0	3.0	2.215	3.644	1.660	2.967
0 Gy Ola/Ada	3.0	5.5	3.113	6.428	2.042	4.400
2 Gy DMSO	2.0	6.0	3.235	12.073	2.160	6.672
2 Gy Ola/Ada	5.0	12.0	5.779	12.258	3.976	5.657

Tabelle A.3: **Verteilung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UD-SCC-2.**  
Angabe von Median, Mittelwert und SD der G<sub>1</sub>- und der S/G<sub>2</sub> Subpopulation in den UD-SCC-2.

Behandlung	Median		Mittelwert		SD	
	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>
0 Gy DMSO	1.0	1.0	1.309	1.658	1.463	2.111
0 Gy Ola/Ada	1.0	2.0	2.081	2.891	2.724	4.102
2 Gy DMSO	12.0	11.0	12.688	11.128	6.469	6.704
2 Gy Ola/Ada	5.0	12.0	5.779	12.258	3.976	5.657

Tabelle A.4: **Verteilung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UM-SCC-47.**  
Angabe von Median, Mittelwert und SD der G<sub>1</sub> und der S/G<sub>2</sub> Subpopulation in den UM-SCC-47.

Behandlung	Median		Mittelwert		SD	
	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>
0 Gy DMSO	2.0	4.0	2.289	4.039	2.450	3.229
0 Gy Ola/Ada	3.0	4.0	3.278	4.819	2.584	3.655
2 Gy DMSO	4.0	13.0	5.675	13.416	4.329	5.792
2 Gy Ola/Ada	9.5	12.5	10.370	12.175	4.911	5.046

Tabelle A.5: **Verteilung der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UPCI-SCC-154.** Angabe von Median, Mittelwert und SD der G<sub>1</sub> und der S/G<sub>2</sub> Subpopulation in den UPCI-SCC-154.

Histogramm der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UD-SCC-2

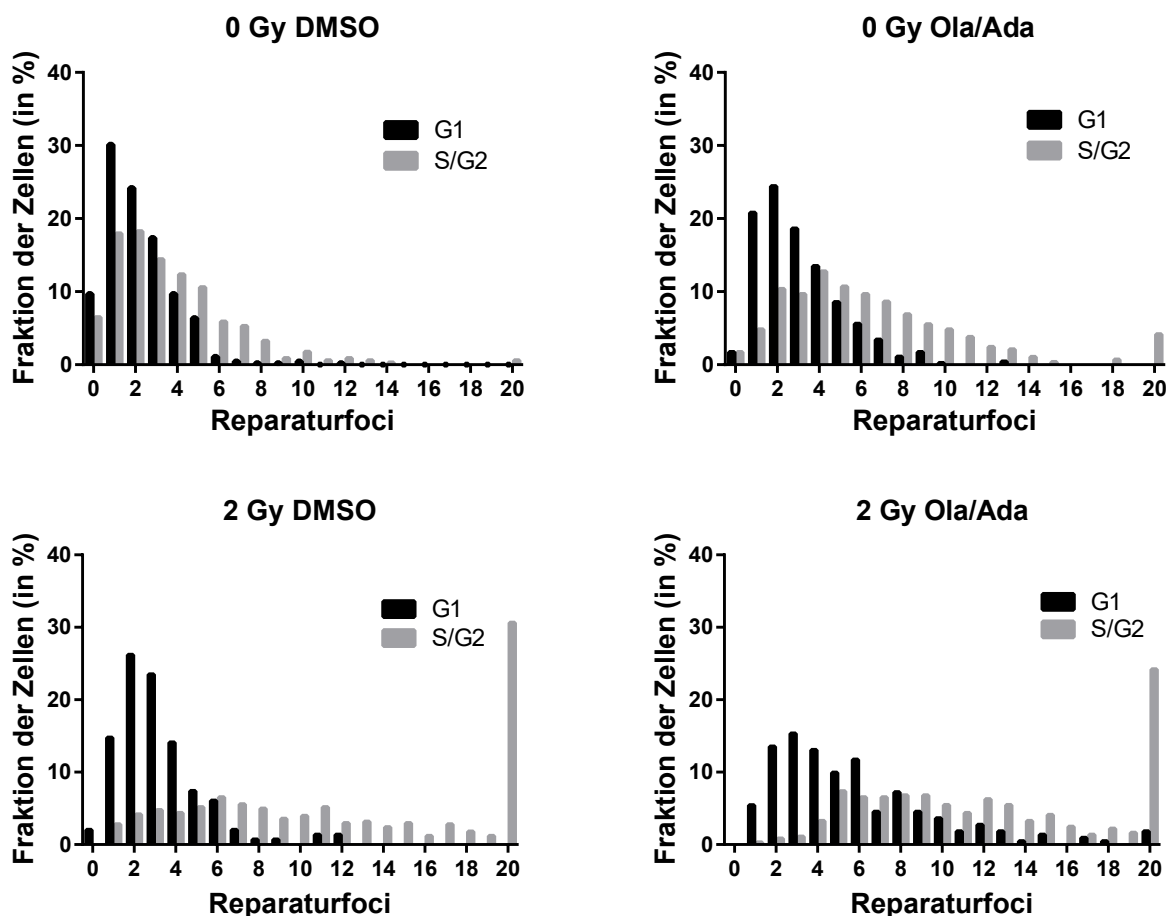


Abb. A.11: **Distribution residueller 53BP1 Reparaturfoci (UD-SCC-2).** Bestrahlung mit 2 Gy führt zu einem Anstieg der Focizahl. Nach Behandlung mit der PARP/Wee1-Inhibition ist in den G<sub>1</sub>-Phase-Zellen (schwarze Balken) eine Verschiebung zu höheren Focizahlen erkennbar. In den S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen (graue Balken) nimmt hingegen die Anzahl an Zellen mit mindestens 20 residuellen Foci ab. Zudem gleichen sich die Verteilungen der Zellzyklusphasen einander an. Der Median und die Mittelwerte der Verteilungen finden sich in Tabelle A.3.



## Histogramm der residuellen 53BP1 Reparaturfoci in den UM-SCC-47

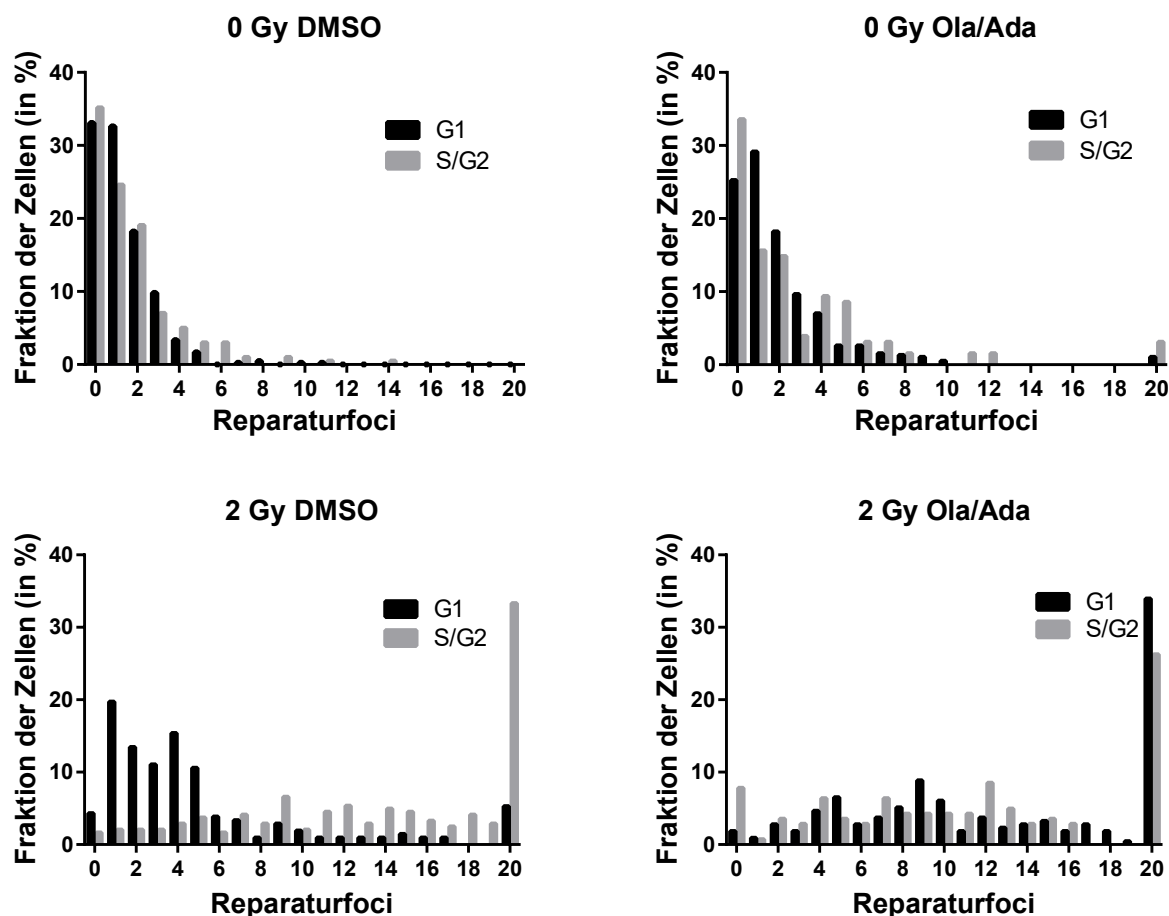


Abb. A.12: **Distribution residueller 53BP1 Reparaturfoci (UM-SCC-47).** Bestrahlung mit 2 Gy führt zu einem Anstieg der Foci-Anzahl. Nach Behandlung mit der PARP/Wee1-Inhibition ist in den G<sub>1</sub>-Phase-Zellen (schwarze Balken) eine Verschiebung zu höheren Focizahlen erkennbar. Zudem gleichen sich die Verteilungen der Zellzyklusphasen einander an.

In den UM-SCC-47 ist im Unterschied zu den UPCI-SCC-154 und den UD-SCC-2 nach PARP/Wee1-Inhibition und Bestrahlung keine Reduktion der S/G<sub>2</sub>-Phase-Zellen (graue Balken) mit mindestens 20 Foci zu erkennen. Es ist allerdings ein starker Anstieg an G<sub>1</sub>-Phase-Zellen mit mindestens 20 Foci zu beobachten. Bei Vergleich mit Abbildung 5 ist allerdings zu erkennen, dass die UM-SCC-47 nicht strahlenresistenter sind als die UD-SCC-2. Es ist also davon auszugehen, dass diese Zellen bei weiteren Vorschreiten im Zellzyklus ebenfalls den Zelltod erleiden. Der Median und die Mittelwerte der Verteilungen finden sich in Tabelle A.4.

Stark geschädigte Zellen nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung

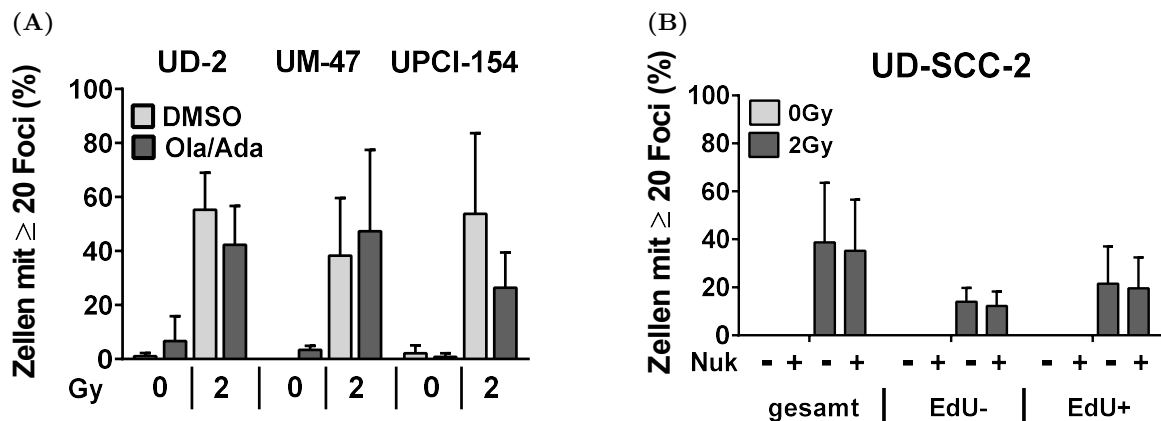


Abb. A.13: Zellen mit mindestens 20 residuellen Foci mit und ohne Nucleosid-Zugabe (HPV-positiv). (A): Prozentualer Anteil an Zellen, die 24 h nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung mit 2 Gy mindestens 20 residuelle 53BP1 Foci aufweisen. (B): Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen, die 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy und Nucleosid-Zugabe mindestens 20 residuelle 53BP1 Foci aufweisen. Die Nucleosid-Zugabe erfolgte 2 h vor Bestrahlung. Der Anteil an stark geschädigten Zellen ist zusätzlich in EdU-positive und EdU-negative Zellen aufgeschlüsselt.

A.6.5 Reduktion des Replikationsstresses nach Nucleosid-Zugabe

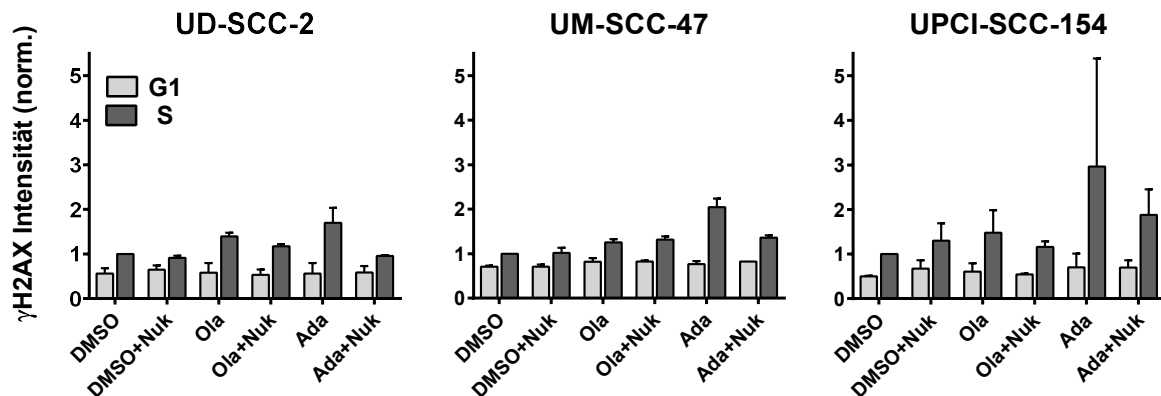


Abb. A.14: Intensität der  $\gamma$ H2AX-Färbung 4 h nach Einzelbehandlung mit den Inhibitoren und Nucleosid-Zugabe (HPV-positiv). Die Messung der  $\gamma$ H2AX-Intensität erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Median der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität in S-Phase-Zellen, normiert auf die S-Phase der unbehandelten Kontrolle.

Radioresistenz nach Nukleosid-Zugabe

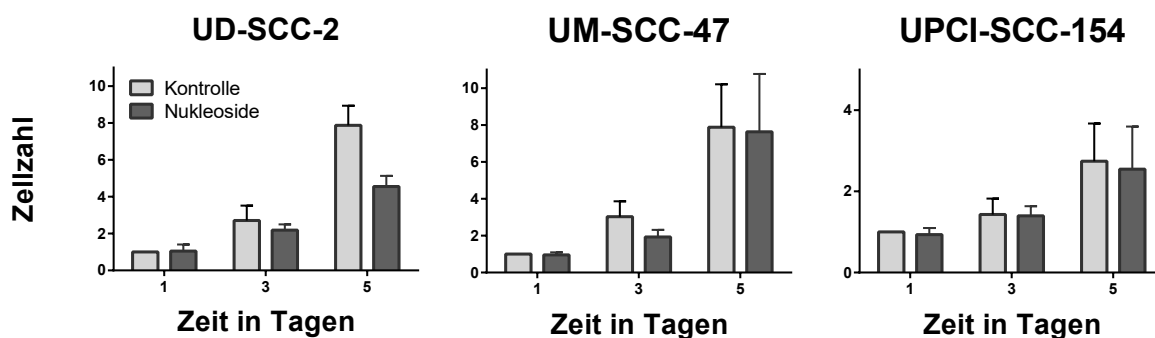


Abb. A.15: **Proliferation der Zellen nach Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv).** Die Zugabe der Nukleoside erfolgte 4h nach Aussaat der Zellen. Bestimmung der Zellzahl an Tag eins, drei und fünf nach Nukleosid-Zugabe. Die Normierung erfolgte auf die Zellzahl der unbehandelten Probe an Tag eins. In den UD-SCC-2 zeigt sich eine deutliche Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit nach Nukleosid-Zugabe.

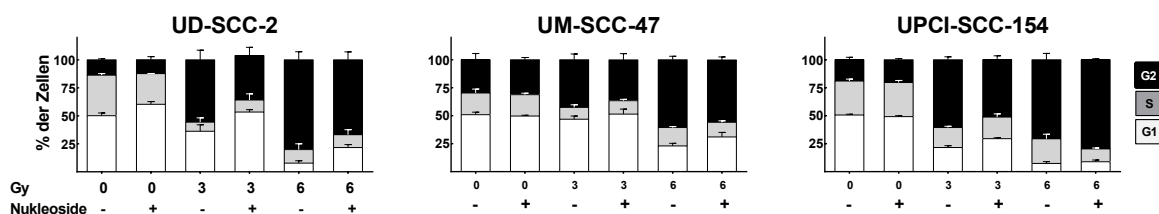


Abb. A.16: **Zellzyklusverteilung 24 h nach Nukleosid-Zugabe (HPV-positiv).** Zellzyklusverteilung 24 h nach Nukleosid-Zugabe und Bestrahlung mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy. Die Zugabe der Nukleoside erfolgte 2 h vor der Bestrahlung; DAPI-Anfärbung der DNA und Messung im Durchflusszytometer. Dargestellt ist der Anteil der Zellen in G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase.

## A.7 Zusätzliches Material der HPV-negativen Zelllinien

### A.7.1 Replikationsstress nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung

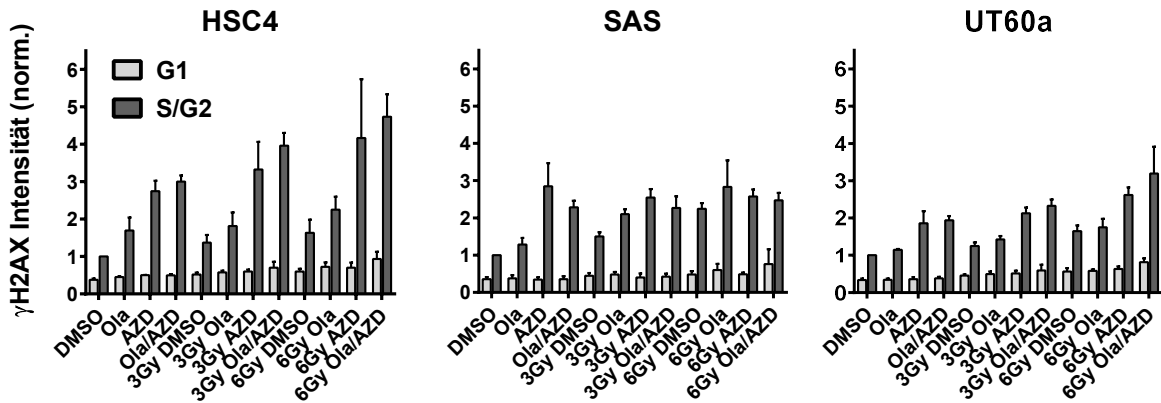


Abb. A.17: Intensität der  $\gamma$ H2AX-Färbung 24 h nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung (HPV-negativ). Die Zellen wurden mit den Inhibitoren behandelt und 2 h später mit 0 Gy, 3 Gy und 6 Gy bestrahlt. Fixiert wurden die Zellen 24 h nach Bestrahlung. Die Messung der  $\gamma$ H2AX-Intensität erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Median der  $\gamma$ H2AX-Signalintensität, normiert auf die S/G<sub>2</sub>-Phase der unbehandelten Kontrolle.

### A.7.2 Radiosensibilisierung im *delayed-plating* Koloniebildungstest

#### Ausplattierungseffizienz im Koloniebildungstest

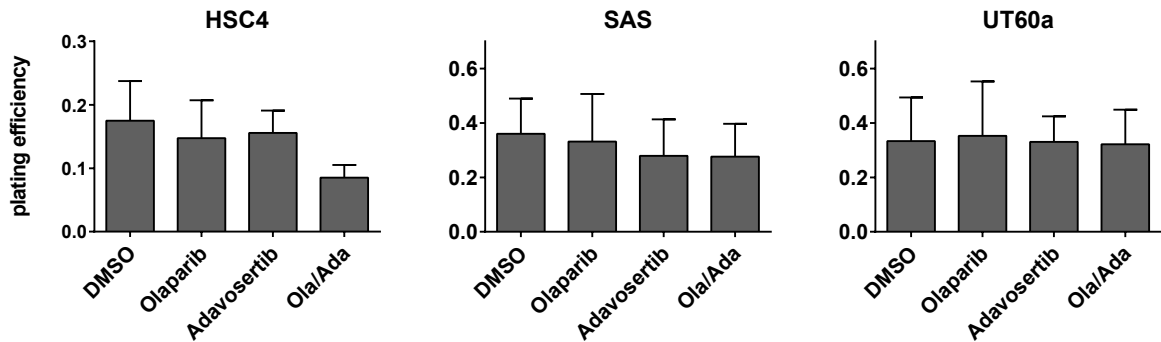


Abb. A.18: Ausplattierungseffizienz der HPV-negativen Zellen nach PARP/Wee1-Inhibition. Gezeigt ist die PE der HPV-positiven Zelllinien nach Inhibitorbehandlung im *delayed-plating* Koloniebildungstest.

## A.7.3 Reduktion des Replikationsstresses nach Nukleosid-Zugabe

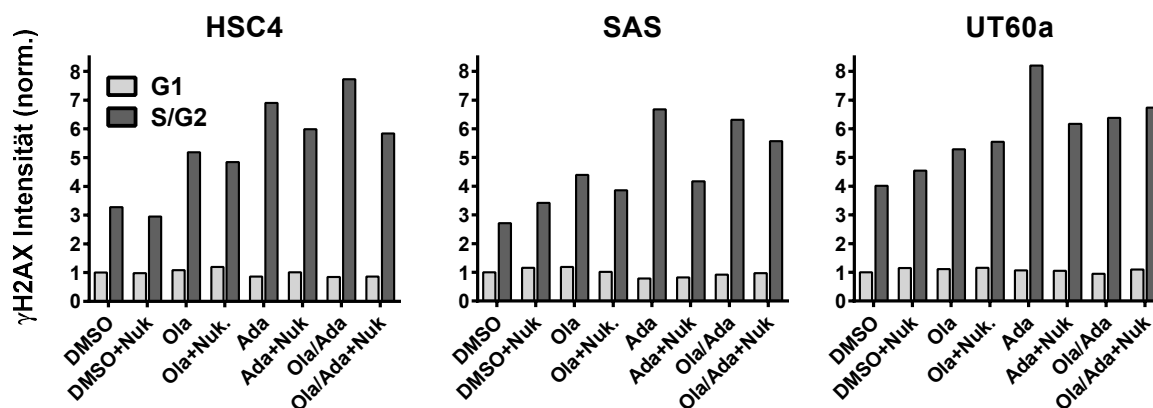


Abb. A.19: Intensität der  $\gamma$ H2AX-Färbung 24 h nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe (HPV-negativ). Quantifizierung  $\gamma$ H2AX-positiver S-Phase-Zellen 24 h nach Inhibitorbehandlung und Nukleosid-Zugabe. Für diesen Versuch gilt N=1. Die Normierung erfolgte auf die G<sub>1</sub>-Phase der unbehandelten Kontrolle.

## Stark geschädigte Zellen nach Inhibitorbehandlung und Bestrahlung

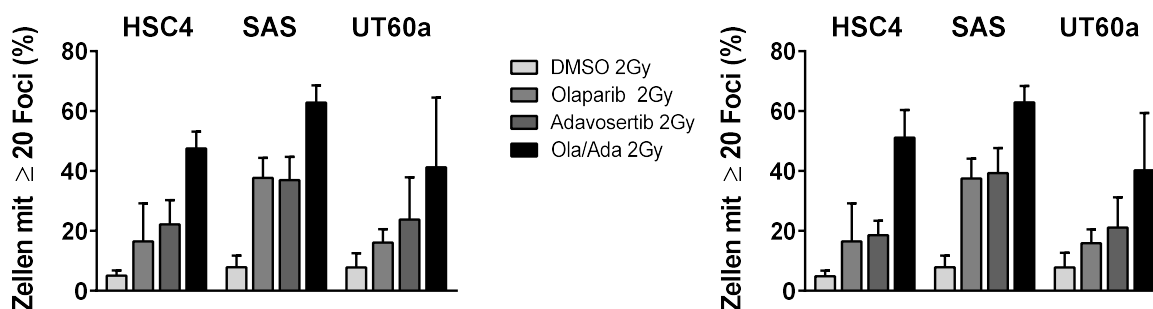
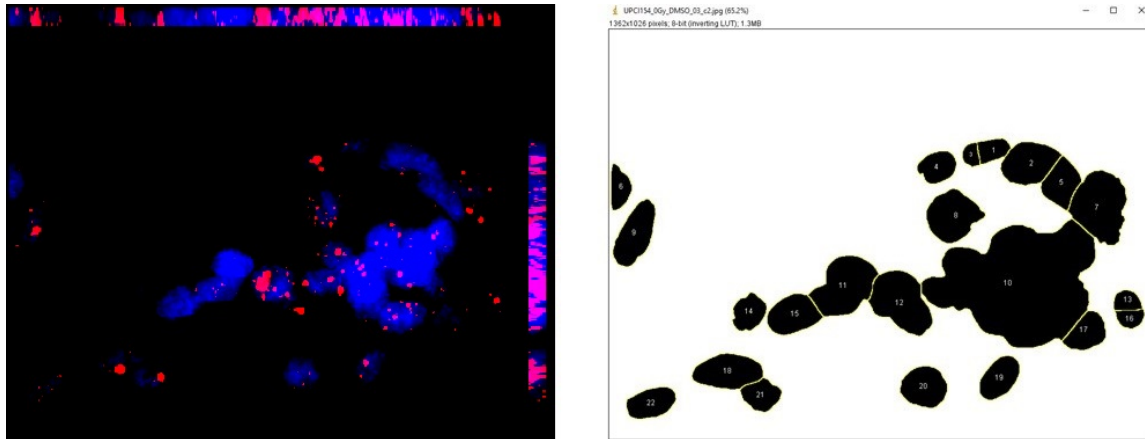


Abb. A.20: Mindestens 20 ( $\geq 20$ ) residuelle 53BP1 Reparaturfoci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (HPV-negativ). Quantifizierung der Zellen mit mindestens 20 residuellen 53BP1 Foci. Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren und 2 h später Bestrahlung mit 2 Gy. Die Fixation erfolgte 24 h nach Bestrahlung. In der linken Abbildung sind die pan-nukleär gefärbten Kerne in die Auswertung eingezogen, in der rechten Abbildung sind diese Kerne aus der Auswertung ausgeschlossen. Zwischen den beiden Möglichkeiten der Auswertung zeigen sich nur geringe Unterschiede.

## A.8 Zusätzliches Material zur automatisierten Auszählung in ImageJ

### A.8.1 Artefakte in der automatisierten Auszählung

(A)



(B)

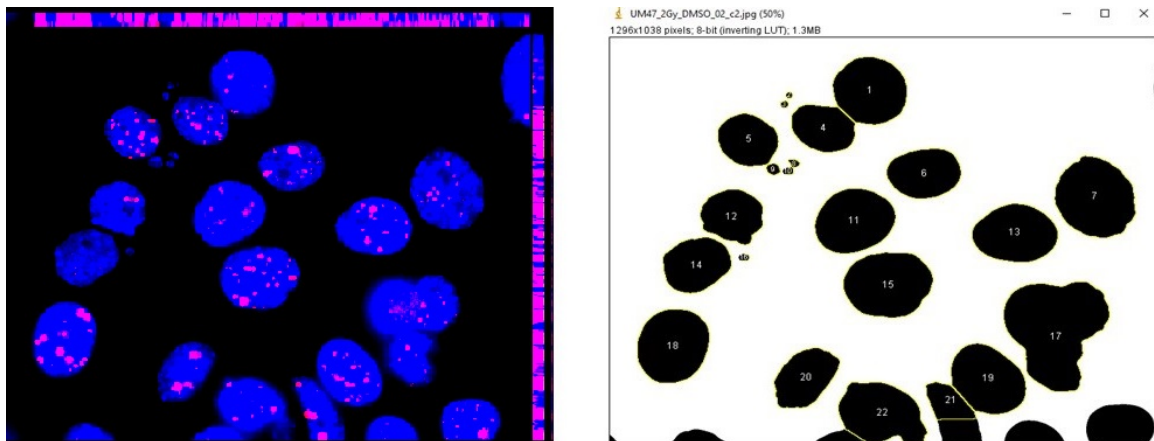


Abb. A.21: Weitere Beispiele für Fehlerquellen in der automatisierten Auszählung. (A): Beispielbild dicht wachsender UPCI-SCC-154. Die Separierung der Zellen erfolgt bei der automatisierten Auszählung nicht vollständig. (B): Nach Bestrahlung mit 2 Gy entstehen in den UM-SCC-47 Mikronuklei, die in der automatisierten Auszählung fälschlicherweise als Zellen gezählt werden. Diese sind in der rechten oberen Ecke des Bildes zu sehen.

## A.8.2 Tabellen zu den Bland-Altman-Diagramme

Behandlung	Bias	SD Bias	95 % <i>Limits of Agreement</i>
0 Gy DMSO	-2.4	2.881	-8.047 ; 3.247
0 Gy Ola/Ada	-1.6	3.647	-8.748 ; 5.548
2 Gy DMSO	-3.8	1.643	-7.021 ; -0.5794
2 Gy Ola/Ada	-4.4	3.975	-12.19 ; 3.391

Tabelle A.6: **Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms zur automatisierten Zellkernzählung.** Angabe der mittleren Differenz (Bias) und der SD beim Vergleich von manueller und automatisierter Zellkernzählung in den UM-SCC-47.

Behandlung	Bias	SD Bias	95 % <i>Limits of Agreement</i>
0 Gy DMSO	-0.4174	0.8901	-2.162 ; 1.327
0 Gy Ola/Ada	-1.192	1.655	-4.436 ; 2.051
2 Gy DMSO	2.252	0.8850	0.5172 ; 3.986
2 Gy Ola/Ada	0.6313	0.7008	-0.7422 ; 2.005

Tabelle A.7: **Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms zur automatisierten Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode *Find Maxima*.** Die Berechnung erfolgte mit der automatisch bestimmten Zellkernzahl. Angabe der mittleren Differenz (Bias) und der SD beim Vergleich von manueller und automatisierter Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode *Find Maxima* in den UM-SCC-47.

Behandlung	Bias	SD Bias	95 % <i>Limits of Agreement</i>
0 Gy DMSO	-0.6051	1.289	3.131 ; 1.921
0 Gy Ola/Ada	-1.301	1.623	-4.483 ; 1.880
2 Gy DMSO	0.1513	1.108	-2.021 ; 2.323
2 Gy Ola/Ada	-0.3419	1.051	-2.402 ; 1.718

Tabelle A.8: **Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms zur automatisierten Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode *Find Maxima*.** Die Berechnung erfolgte mit der manuell bestimmten Zellkernzahl. Angabe der mittleren Differenz (Bias) und der SD beim Vergleich von manueller und automatisierter Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode *Find Maxima* in den UM-SCC-47.

Behandlung	Bias	SD Bias	95 % <i>Limits of Agreement</i>
0 Gy DMSO	-1.562	2.927	-7.298 ; 4.175
0 Gy Ola/Ada	-2.682	2.905	-8.376 ; 3.012
2 Gy DMSO	-2.429	0.7738	-3.946 ; -0.9128
2 Gy Ola/Ada	-3.102	2.525	-8.051 ; 1.847

Tabelle A.9: **Ergebnisse des Bland-Altman-Diagramms zur automatisierten Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode *Analyze Particles*.** Angabe der mittleren Differenz (Bias) und der SD beim Vergleich von manueller und automatisierter Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci mit der Methode *Analyze Particles* in den UM-SCC-47.

### A.8.3 Bland-Altman-Diagramme

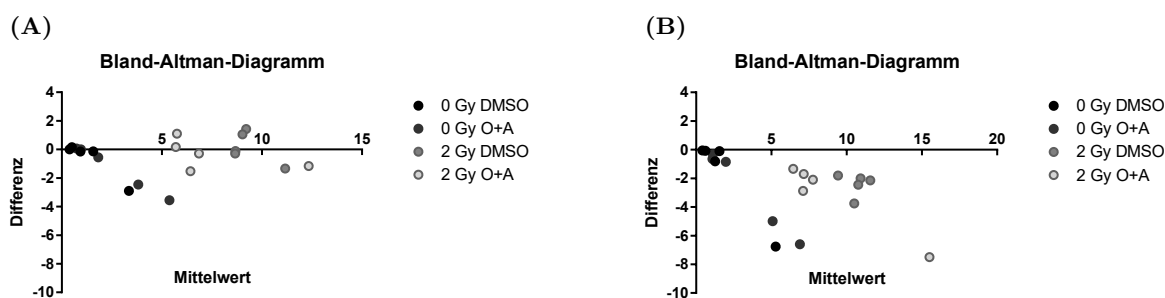


Abb. A.22: **Bland-Altman-Diagramme zum Vergleich der manuellen Auszählung mit zwei Methoden der automatisierten Auszählung.** Für den Vergleich wurde die manuell ausgezählte Zellzahl genutzt. (A): *Find Maxima*. (B): *Analyze Particles*.



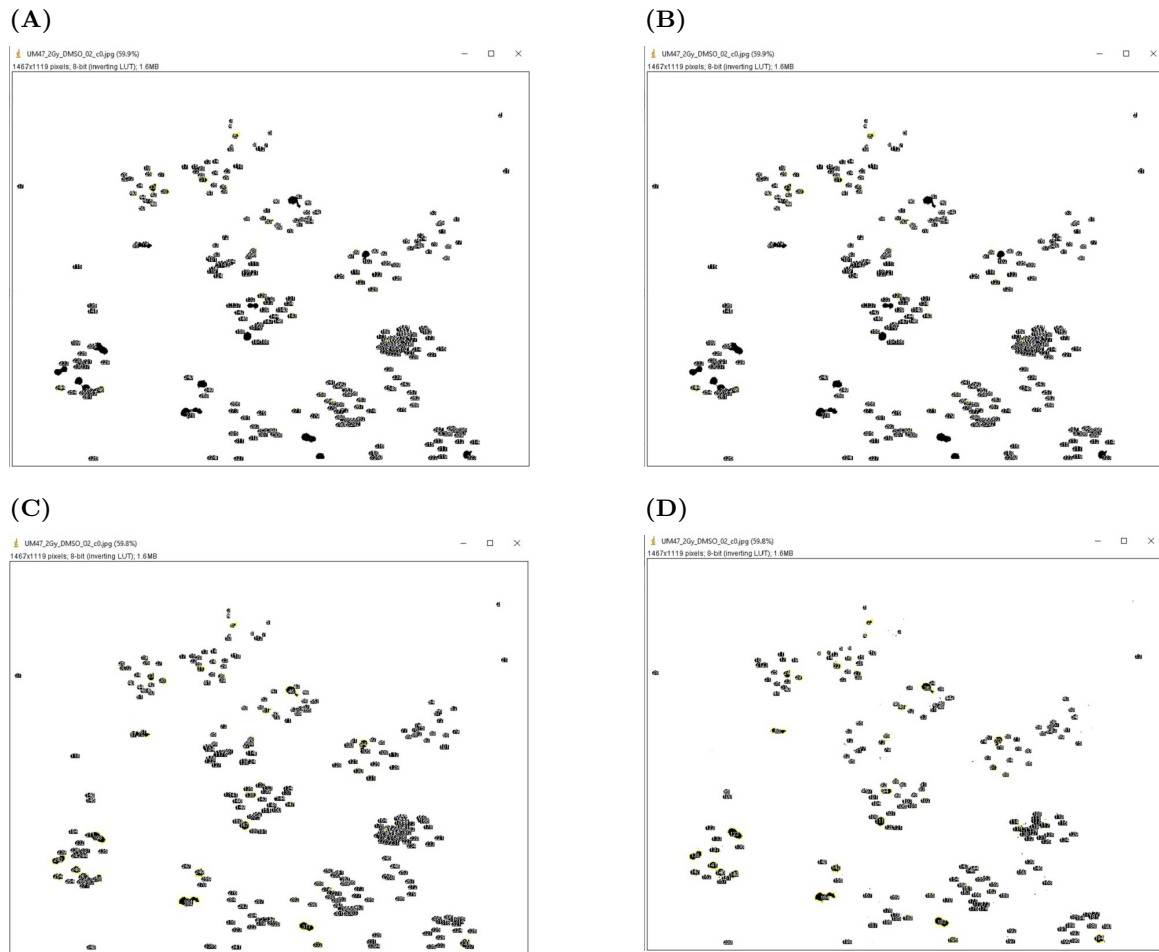
A.8.4 Verschiedene *Thresholds* für die Funktion *Analyze Particles*

Abb. A.23: Beispiele für die vier *Thresholds* bei Einsatz von der Methode *Analyze Particles* zur Auszählung residueller 53BP1 Reparaturfoci. Die Funktion *Analyze Particles* in ImageJ ermöglicht die Eingabe eines von zwei Grenzwerten, die die minimale und maximale Foci-Größe beschränken. **(A)**: *Threshold* von 0–300; **(B)**: *Threshold* von 10–300; **(C)**: *Threshold* von 0–Infinity; **(D)**: *Threshold* von 10–Infinity

## A.8.5 Protokoll

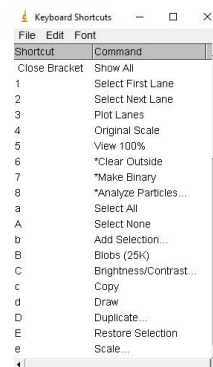
### Automatisierte Auszählung residueller Reparaturfoci in Image J

#### 1. Bearbeitung der am Mikroskop aufgenommenen .zvi-Bilder in AxioVision (Version: AxioVision 4.9.1.)

- In AxioVision werden an einer Aufnahme (bestrahlt und behandelt) die optimalen Einstellungen für die einzelnen Kanäle ermittelt
- Diese Einstellungen werden auf alle Bilder des Versuches übertragen. Die Originalbilder sollten nicht verändert werden. Am besten einen neuen Ordner für die bearbeiteten Bilder erstellen.
- Aus den bearbeiteten Bildern werden Schnittbilder erstellt:  
*Schnittbild -> MIP -> Create Image*
- Erneut in separatem Ordner als .zvi-Datei speichern.
- Diese Bilder als .jpeg-Bild aus den .zvi-Bildern exportieren (*Export -> Channels*)

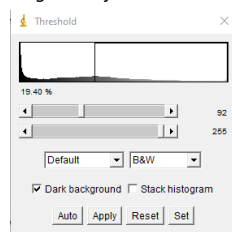
#### 2. Einstellungen in ImageJ (Version: ImageJ 1.51j8)

- ImageJ öffnen
- Zur Vereinfachung können in ImageJ Shortcuts für die Schritte erstellt werden:  
*Plugins -> Shortcuts -> Add shortcut...*

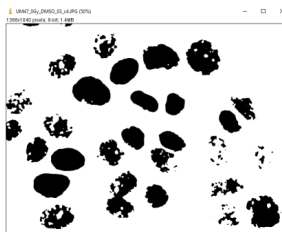


#### 3. Auszählung der DAPI-gefärbten Zellkerne in ImageJ

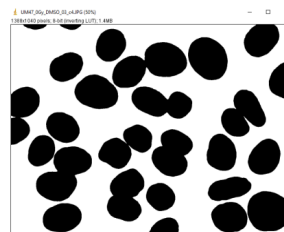
- Öffnen des schwarz-weiß Bildes der DAPI-Fläche
- Auswählen des Bereiches von Interesse (z. B. entfernen des Randes in den MIP-Bildern)  
*Image -> Crop*
- In diesem Bild dann:  
*Process -> Filter -> Gaussian Blur Filter...* (sigma 3.0)
- Erstellen eines binären Bildes:  
*Image -> Adjust -> Threshold...*



Einstellen des „Threshold“



Auto



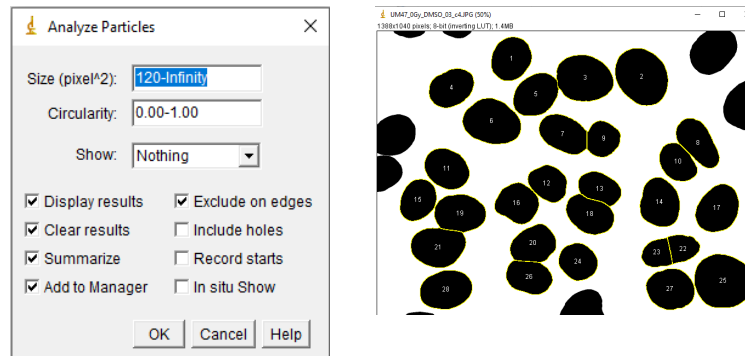
Manuell

*Process -> Binary -> Fill holes* (falls notwendig, kann allerdings auch zum Verschmelzen von Zellen führen)

*Process -> Binary -> Make Binary* (Shortcut 7)

- Trennen von Zellen, die sich berühren mit Hilfe des Watershed-Algorithmus:  
*Process -> Binary -> Watershed*
- Auszählung der DAPI-Zellkerne  
*Analyze -> Analyze Particles* (Shortcut 8) (in dieser Arbeit wird ein Threshold von 120 - Infinity genutzt)

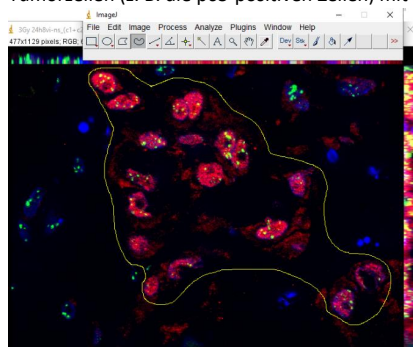
- Auszählung immer bildlich dokumentieren, damit es nachvollziehbar bleibt!



Die Foci können dann in diesen Zellen in ImageJ manuell oder automatisiert ausgezählt werden. Dies sollte direkt im Anschluss erfolgen, damit die Foci den ausgezählten Zellkernen zugeordnet werden können.

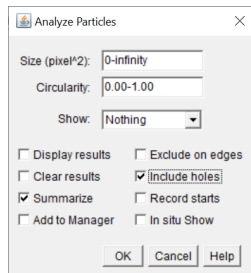
#### 4. Bestimmung der DAPI-Fläche in ImageJ

- Öffnen des exportierten Schnittbildes (mit allen Kanälen/Farben)
- Tumorzellen (z. B. die p63-positiven Zellen) mit Hilfe der *Free Hand selection* einkreisen



- Anschließend in das schwarz-weiß Bild der DAPI-Fläche wechseln:  
*STRG + Pfeil oben + „O“*
- In diesem Bild dann:  
*Edit -> Clear Outside (Shortcut 6)*  
*Edit -> Invert*  
*Process -> Binary -> Make Binary (Shortcut 7)*  
*Analyze -> Analyze Particles... (Shortcut 8)*  
Die Messung erfolgt einmal mit Häkchen bei Include holes und einmal ohne.

Die Einstellungen für *Analyze Particles*:



Die Ergebnisse für die Bestimmung der DAPI-Fläche:

Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Mean
3Gy 24h8vi-ns_DAPI.JPG	489	86889	177.687	5.211	253.549
3Gy 24h8vi-ns_DAPI.JPG	649	75547	116.405	4.530	255.000

Die Foci können dann in diesen Zellen in ImageJ manuell oder automatisiert ausgezählt werden. Dies sollte direkt im Anschluss erfolgen, damit die Foci der ausgewählten DAPI-Fläche zugeordnet werden können.

**5. Automatisierte Auszählung von 53BP1 Foci (Möglichkeit 1 über *Analyze Particles*)**

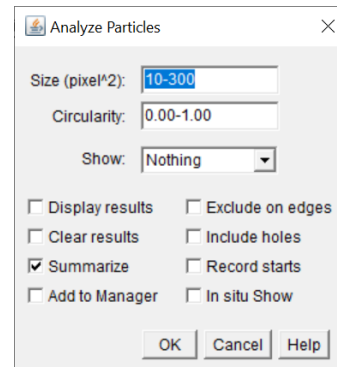
Das automatisierte Auszählen erfolgt fast analog zur Bestimmung der DAPI-Fläche.

- Öffnen des schwarz-weiß-Bildes der Foci in ImageJ
- Auswählen der Zellen, für die die DAPI-Fläche bestimmt wurde:  
*Edit -> Selection -> Restore Selection*  
*Edit -> Clear Outside (Shortcut 6)*  
*Edit -> Invert*  
*Binary -> Make Binary (Shortcut 7)*  
*Analyze -> Analyze Particles... (Shortcut 8)*

Im Unterschied zur Bestimmung der DAPI-Fläche wurde in dieser Arbeit mit vier verschiedenen Thresholds gearbeitet. Es wurden Thresholds mit einer Pixelgröße von 0 - 300 und 10 - 300 sowie 0 - Infinity und 10 - Infinity genutzt. Kein Häkchen bei *Include holes*.

Die Ergebnisse (*Summary*) bei Bestimmung der DAPI-Fläche und der Foci-Zahl mit zwei verschiedenen Thresholds:

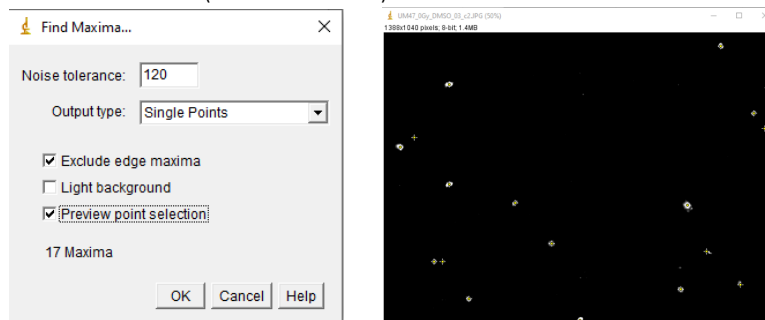
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Mean
3Gy 24h8vi-ns_DAPI.JPG	489	86889	177.687	5.211	253.549
3Gy 24h8vi-ns_DAPI.JPG	649	75547	116.405	4.530	255.000
3Gy 24h8vi-ns_FITC.JPG	92	4283	46.554	0.257	255.000
3Gy 24h8vi-ns_FITC.JPG	158	4529	28.665	0.272	255.000



**6. Automatisierte Auszählung von 53BP1 Foci (Möglichkeit 2 über Find Maxima)**

Angelehnt an das Protokoll der Light Microscopy Core Facility (LMCF), Duke University<sup>1</sup>

- Öffnen des schwarz-weiß-Bildes der Foci in ImageJ
- Auswählen der Zellen, für die die DAPI-Fläche bestimmt wurde:  
*Edit -> Selection -> Restore Selection*  
*Edit -> Clear Outside (Shortcut 6)*  
*Process -> Find Maxima...* (Noise tolerance 120)



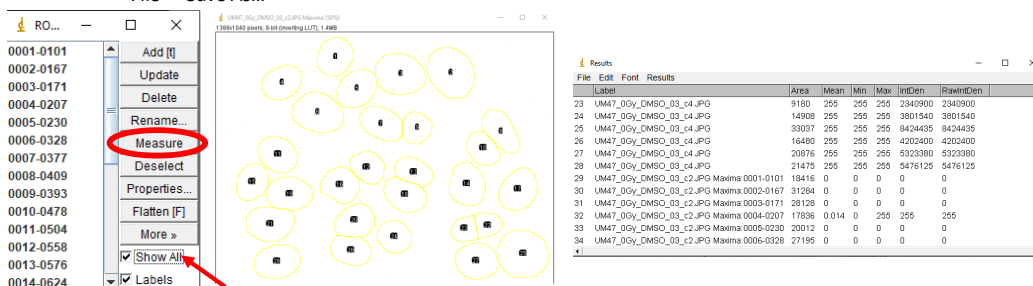
Nachdem mit „OK“ bestätigt wurde, wird ein neues binäres Bild erzeugt, in welchem dann die Maxima pro Zelle gezählt werden können.

*Analyze -> Tools -> ROI Manager...*

Auswählen von *Show All* (falls schon ausgewählt: abwählen und erneut auswählen)

*Measure*

*File -> Save As...*



Die Anzahl an Foci (Anzahl der Maxima) in der Zeile *RawIntDen* gezeigt.  
 Falls diese Zeile in der *Results*-Tabelle nicht auftaucht, kann es über *Analyze -> Set Measurements...* hinzugefügt werden.  
 Jedes Maxima wurde als ein Pixel gespeichert und hat einen Wert von 255. Drei Foci in einer Zelle entsprechen also einem Wert von 765.

1 Count Nuclear Foci – ImageJ; Light Microscopy Core Facility (LMCF), Duke University 2022  
<https://microscopy.duke.edu/guides/count-nuclear-foci-imagej>

# Danksagung

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Thorsten Rieckmann, der diese Arbeit betreut hat. Ich möchte mich für deine Unterstützung, Geduld und ausführlichen Erklärungen bedanken. Dein Einsatz und deine Begeisterung für das Thema waren ansteckend und ich habe viel Freude an der Arbeit gehabt und wahnsinnig viel gelernt. Und natürlich bin ich dir auch sehr dankbar, dass du das Risiko eingegangen bist, eine Physikerin in deine strahlenbiologische Arbeitsgruppe aufzunehmen.

Bei Prof. Dr. Kai Rothkamm bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit im Labor für Strahlenbiologie durchführen zu können. Vielen Dank für deine Hinweise und Anregungen und dafür, dass du dir die Zeit genommen hast, diese Dissertation zu begutachten und immer für Rückfragen zur Verfügung zu stehen.

Auch bei Prof. Dr. Florian Grüner möchte ich mich für die Begutachtung der Dissertation und der Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen, bedanken. Ebenso gilt mein Dank den restlichen Mitgliedern der Prüfungskommission!

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt auch all den TAs aus dem Labor für Strahlenbiologie, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und mir bei vielen Fragen geholfen haben! Ganz besonders möchte ich mich bei Sabrina Christiansen und Fruzsina Gatzemeier bedanken. Sabrina, du hast mich mit großer Geduld eingearbeitet. Vor Beginn der Doktorarbeit habe ich noch nie in einem zellbiologischen Labor gearbeitet und du musstest mit den grundlegendsten Dingen anfangen. Während der drei Jahre hast du dir immer die Zeit genommen, mit mir neue Methoden zu erlernen und standest mir bei allen Problemen zur Seite. Fruzsina, auch dir danke ich dabei für deine durchgehende Unterstützung! Ich danke euch beiden auch für die super Arbeitsteilung bei den *ex vivo* Experimenten. Dieser Dank gilt auch Dr. Henrike Zech. Du bist zu allen Uhrzeiten im Labor unterwegs gewesen und hast mich in die *ex vivo* Kultivierung und Foci-Auszählung eingewiesen

Ein ganz großer Dank gebührt natürlich allen Mitarbeitern im Labor der Strahlenbiologie für das tolle Arbeitsklima! Ich bin immer sehr gerne im Labor gewesen und habe die Zusammenarbeit mit euch während der Zeit im Homeoffice sehr vermisst. Vielen Dank für die Diskussionen, Anregungen und eure Hilfsbereitschaft!

Zuletzt möchte ich noch den vielen weiteren Menschen danken, die mich während dieser Zeit auf den unterschiedlichsten Wegen unterstützt haben und die ich hier gar nicht alle aufzählen kann!