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

Wirkung von Protonen auf HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen und die gezielte Verstärkung durch PARP-Inhibition

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Katrin Waldenmaier
aus Kaiserslautern

Marburg, 2026

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

12.05.2026

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. M. Hertl

Referentin: Frau PD Dr. U. Theiß

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Mandic

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG ... 9
1.1 HNSCC ... 9
1.1.1 Einführung ... 9
1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie ... 9
1.1.3 Tumorgenese HPV neg. und pos. HNSCC ... 10
1.2 Therapie des HNSCC ... 11
1.2.1 Multimodale Tumortherapie beim HNSCC ... 11
1.2.2 Nebenwirkungen und Prognose der Strahlentherapie ... 12
1.3 Biologische Wirkung von Photonen ... 13
1.3.1 DNA-Schädigung und -Reparatur ... 13
1.3.2 Strahlenempfindlichkeit HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen ... 15
1.4 Strahlentherapie mit Protonen ... 15
1.4.1 Klinische Anwendung ... 15
1.4.2 Physikalische Wirkung von Protonen ... 17
1.4.3 Biologische Wirkung von Protonen ... 19
1.5 PARP-Inhibition ... 20
1.5.1 PARP ... 20
1.5.2 PARP-Inhibition ... 21
1.5.3 PARP-Inhibition in Kombination mit Photonen ... 24
1.5.4 PARP-Inhibition in Kombination mit Protonen ... 25
1.6 Fragestellung der Arbeit ... 26
2 MATERIAL UND METHODEN ... 28
2.1 Material ... 28
2.1.1 Geräte ... 28
2.1.2 Verbrauchsmaterialien ... 30
2.1.3 Software ... 31
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien ... 31
2.1.5 Allgemeine Puffer und Reagenzien ... 32
2.1.6 Zellkulturmedium (Vollmedium) ... 33
2.1.7 Zellkulturlinien ... 33
2.2 Methoden ... 33
2.2.1 Zellkultur ... 33
2.2.2 Photonenbestrahlung ... 34
2.2.3 Protonenbestrahlung ... 34
2.2.4 Behandlung der Zellen ... 35
2.2.5 Koloniebildungstest ... 36
2.2.6 53BP1/CenpF-Immunfluoreszenz ... 37
2.2.7 Statistische Auswertung ... 39
3 ERGEBNISSE ... 40
3.1 Strahlenempfindlichkeit nach Photonenbestrahlung ... 40
3.2 Strahlenempfindlichkeit nach Protonenbestrahlung ... 41
3.3 Steigerung der Strahlenempfindlichkeit durch PARP-Inhibitoren ... 42
3.4 Replikationsstress durch PARP-Inhibitoren ... 45
3.5 Residuale Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung ... 47
3.6 Residuale Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung und PARP-Inhibition ... 48
3.7 Assoziation zwischen residualen DSB und dem zellulären Überleben ... 49
4 DISKUSSION ... 52
4.1 Zelluläre Strahlenempfindlichkeit ... 52
4.2 DSB-Strangbrüche ... 53
4.3 Wirkung der PARP-Inhibition ... 54
4.4 Klinische Relevanz und Ausblick ... 56
5 ZUSAMMENFASSUNG ... 59
6 SUMMARY ... 61
7 LITERATURVERZEICHNIS ... 63

8 ANHANG 70
8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrenden 70
8.2 Danksagung 72

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

***Abb. 1**: Wirkung einer Strahlentherapie bei HPV neg. und pos. HNSCC 12*
***Abb. 2**: Physikalische Wirkung von Protonen..... 18*
***Abb. 3**: Schadenserkennung durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) 20*
***Abb. 4**: Inhibition von PARP..... 22*
***Abb. 5**: Photonenempfindlichkeit von HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen..... 40*
***Abb. 6**: Vergleich der Photonen- und Protonenempfindlichkeit..... 41*
***Abb. 7**: Wirkung einer PARP-Inhibition auf die Protonenstrahlenempfindlichkeit 43*
***Abb. 8**: Replikationsstress durch PARP-Inhibition 46*
***Abb. 9**: Residuale DSB bei Bestrahlung mit Photonen und Protonen..... 48*
***Abb. 10**: Residuale DSB nach PARP-Inhibition und Bestrahlung mit Protonen..... 49*
***Abb. 11**: Assoziation zwischen residualen DSB und dem zellulären Überleben..... 50*

TABELLENVERZEICHNIS

***Tab. 1**: Auflistung der verwendeten Geräte 28*
***Tab. 2**: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien 30*
***Tab. 3**: Auflistung der verwendeten Software 31*
***Tab. 4**: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien 31*
***Tab. 5**: Auflistung der verwendeten Antikörper 32*
***Tab. 6**: Auflistung der verwendeten Zellkulturlinien 33*
***Tab. 7**: Aussaat der Zellen für den Koloniebildungstest 36*
***Tab. 8**: Aussaat der Zellen für die 53BP1/CenpF-Immunfluoreszenz-Färbung 38*
***Tab. 9**: Strahlensensibilisierung durch PARP-Inhibition 44*

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alphabetische Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen.

Alt-NHEJ	alternatives NHEJ
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
BSA	Bovines Serum Albumin
CASP8	Caspase 8
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A, auch p16
CenpF	Zentromerprotein F
CFA	Koloniebildungstest
DDR	DNA Damage Response
DDX3X	ATP-abhängige RNA-Helikase
DEF	Dosisverstärkungsfaktor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
ESB	Einzelstrangbruch
f	weiblich
FBS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration der USA
Gy	Gray
HNSCC	Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humane Papillomaviren
HR	Homologe Rekombination
HRAS	Enzym der RAS-Familie (Harvey Rat Sarcoma Virus)
IGRT	Bild-gesteuerte Radiotherapie
IMPT	Intensitätsmodulierte Protonentherapie
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
INF1	Interferon I
IRF6	Interferon regulatorischer Faktor 6
Kontr.	Kontrolle
LET	Linearer Energie Transfer
LK	Lymphknoten
LSCC	laryngeal squamous cell carcinoma
m	männlich
Mb	Megabasen
mut	mutiert
MIT	Marburger Ionenstrahl-Therapiezentrum
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
neg.	Negativ
NHEJ	Nicht-homologes End-joining
NOTCH1	notchhomologes Protein 1 (Single-Pass-Transmembranrezeptor)
NPC	nasopharyngeal carcinoma
OAR	Organs at Risk
Ola	Olaparib
OSCC	oral squamous cell carcinoma
OPSCC	oropharyngeal squamous cell carcinoma
P	Protonenbestrahlung
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PARPi	PARP-Inhibitor
PB	Physiological Buffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	Protonenstrahltherapie
PE	Plattierungseffizienz
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie-Sonde

PFA	Paraformaldehyd
PFS	Progressionsfreies Überleben
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-kinase
pN	Lymphknotenbefall, pathologisch gesichert
pos.	positiv
pRB	Retinoblastomprotein
pT	Tumorausdehnung, pathologisch gesichert
PTEN	Phosphatase PTEN
R+	Residualtumor nach Tumorresektion
RBW_{10}	Relative Biologische Wirksamkeit (bei 10% Zellüberleben)
RCHT	Radiochemotherapie
RS	Replikationsstress
RT	Radiotherapie
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SF	Überlebensfraktion
SOBP	spread-out bragg-peak
SSA	Single Strand Annealing
Tala	Talazoparib
TP63	transformationsbezogenes Protein 63
VE	Voll entsalzt
wt	Wildtyp
X	Photonenbestrahlung

1 EINLEITUNG

1.1 HNSCC

1.1.1 Einführung

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) bezeichnen eine heterogene Gruppe von malignen Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. Dabei wird anatomisch unterschieden zwischen Tumoren der Nasenhaupt- und der Nasennebenhöhlen, der Mundhöhle (OSCC), des Nasopharynx (NPC), des Oropharynx (OPSCC), des Hypopharynx und des Larynx (LSCC). In Deutschland treten die malignen Neubildungen am häufigsten im Oropharynx (m: 29%, f: 27%) und in der Mundhöhle und an den Lippen (m: 26%, f: 39%) auf. Tumore des Hypopharynx (m: 9%, f: 4%), des Larynx (m: 22%, f: 10%), der Nasen- und Nasennebenhöhlen (m: 5%, f: 9%) oder sonstiger Stellen des Kopf-Hals-Bereichs (m: 8%, f: 11%) sind insgesamt seltener (Robert Koch-Institut, 2023).

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung der HNSCC zählt der Konsum jeglicher Form von Alkohol oder Tabak (Robert Koch-Institut, 2023). Der starke Konsum beider Drogen wirkt dabei synergistisch und erhöht das Risiko bis zu 40-fach. In Südasien zählt zudem der Konsum von Betelnüssen zu den Noxen, welche die Entstehung eines HNSCC begünstigen können (Barsouk et al., 2023). Ein weiterer Hauptrisikofaktor sind Infektionen mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV), insbesondere mit dem Hochrisikotyp 16 oder auch 18. Aufgrund der Heterogenität hinsichtlich sowohl Ätiologie, Tumorbiologie, Therapieansprechen und Prognose unterscheidet man zwischen den beiden Entitäten HPV neg. (verursacht durch Noxen) und HPV pos. (verursacht durch HPV-Viren). Erstere treten vor allem in der Mundhöhle auf, während letztere häufiger im Bereich des Oropharynx, Hypopharynx oder Larynx auftreten (Barsouk et al., 2023; Robert Koch-Institut, 2023).

Laut jüngster Schätzungen sind HNSCC mit einer Inzidenz von 890.000 Neuerkrankung pro Jahr und etwa 450.000 Toden pro Jahr die weltweit siebthäufigste Tumorentität (Barsouk et al., 2023; Sung et al., 2021). Die Inzidenz und Mortalität variieren dabei stark aufgrund demographischer Unterschiede im Tabak und Alkohol-Konsum und dem Sexualverhalten. Betroffen sind überwiegend Personen im Alter über 50 mit einem niedrigeren sozioökonomischen Status. Weltweit erkranken Männer etwa doppelt so häufig wie Frauen. In Deutschland waren dies im Jahr 2020 ca. 5000 Frauen und ca. 12.510 Männer. Die Mortalität zeigte eine ähnliche Verteilung mit etwa 1681 Todesfällen unter den Frauen und 5164 unter den Männern (Robert Koch-Institut, 2023). In Hochrisikoländern wie Indien, Pakistan, Sri Lanka oder Bangladesch ist das OSCC

sogar die häufigste Tumorerkrankung des Mannes und die dritthäufigste Tumorerkrankung der Frau, was besonders auf den hohen Tabakkonsum und auch auf den Betelnusskonsum zurückgeführt werden kann (Barsouk et al., 2023; Sung et al., 2021; Vigneswaran und Williams, 2014). Trotz der weiterhin hohen Inzidenz an HPV neg. HNSCC, vor allem in Ländern mit niedrigem sozioökonomischem Status, zeichnet sich eine Zunahme des Anteils der HPV pos. HNSCC ab, insbesondere in den USA und Europa (Reuschenbach et al., 2019; Tinhofer et al., 2015).

1.1.3 Tumorgenese HPV neg. und pos. HNSCC

Bei der Tumorgenese handelt es sich um einen mehrstufigen Mutationsprozess von Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen, der Auswirkungen auf zelluläre Stoffwechselprozesse wie das Zellwachstum, die Zellteilung oder den Zelltod hat (Hanahan und Weinberg, 2011).

Bei HPV neg. HNSCC ist die chronische Exposition gegenüber Noxen ursächlich für die Dysplasie und Kanzerogenese des Plattenepithels. Die HPV neg. HNSCC weisen dabei etwa doppelt so viele Mutationen auf (im Mittel 4,83 Mutationen/Mb) wie HPV pos. HNSCC (im Mittel 2,28 Mutationen/Mb) (Stransky et al., 2011). Diese Mutationen sind verantwortlich für den Verlust von Kontrollmechanismen im Zellzyklus, der zellulären Differenzierung und der Zellproliferation. Die wichtigste Mutation betrifft das Tumorsuppressorprotein p53 (Leemans et al., 2011; Sano und Oridate, 2016). Daneben spielen auch andere Mutationen für die Zellproliferation (pRb, EGFR, CDKN2A, PTEN, PIK3CA, HRAS), die Zelldifferenzierung (NOTCH1, TP63, IRF6) oder die Apoptose (CASP8, DDX3X) eine wichtige Rolle (Stransky et al., 2011; Sheu et al., 2009). Tabakkonsum gilt als Hauptrisikofaktor, was auf dutzende Karzinogene zurückgeführt werden kann. Dazu zählen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Nitrosamine, deren Metabolite kovalente DNA-Addukte bilden können, was wiederum zu Mutationen und anderen DNA-Abnormalitäten führen kann. Alkohol, dessen Metabolit Acetaldehyd ebenfalls DNA-Addukte bildet, ist ein weiterer Risikofaktor und wirkt synergistisch zum Tabakkonsum. Beide pathogenen Substanzen sind außerdem mit Entzündungen des Plattenepithels assoziiert. Die daraufhin ausgeschütteten Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen ebenfalls eine Rolle in der Zellproliferation und Angiogenese des Tumors (Johnson et al., 2020).

Bei den HPV pos. HNSCC ist die Infektion mit dem Humanen Papillomavirus ursächlich für die onkogene Transformation der Zellen. Der HPV-Hochrisikotyp 16 macht dabei den größten Anteil der detektierten viralen DNA in HNSCC aus. In einem geringeren Anteil wurde allerdings auch DNA anderer HPV-Typen gefunden, u.a. Typ 18, 31, 33, 35 und 52 (Johnson et al., 2020; Sano und Oridate, 2016). Das Genom der Humanen Papillomaviren besteht aus sieben frühen (E1-E7) und zwei späten (L1-L2) Genen,

wobei E6 und E7 die relevanten Onkogene für die Kanzerogenese sind. Bei der Infektion wird die Virus-DNA in die humane DNA epithelialer Basalzellen integriert und exprimiert (Johnson et al., 2020). Das E6-Protein bindet an die zelluläre Ubiquitin-Ligase und bildet mit p53 einen Komplex, der zur Inhibierung und dem proteasomalen Abbau von p53 führt und somit auch zur Hemmung von p21. Bei DNA-Schäden kommt es daher nicht zum Arrest in der G1-Phase und die mangelnde Zellzykluskontrolle erlaubt weitere DNA-Mutationen und die Tumorgenese. Das E7-Protein bindet seinerseits an das Retinoblastomprotein (pRb) und bewirkt dessen proteasomalen Abbau. Dies führt anschließend zur Ausschüttung des Transkriptionsfaktors E2F, zum unkontrollierten Übergang in die S-Phase und zur Hyperproliferation (Johnson et al., 2020; Mesri et al., 2014; Sano und Oridate, 2016). Dabei akkumuliert zudem das CDK-inhibierende Protein p16 (CDKN2A), welches in Kombination mit einem Nachweis der viralen DNA als Marker für HPV verwendet wird. E6 und E7 besitzen außerdem Mechanismen zur Verhinderung des Telomerabbaus und zur Blockierung der antiviralen, antiproliferativen und antiangiogenetischen Effekte von Typ-I-Interferon (Sano und Oridate, 2016).

1.2 Therapie des HNSCC

1.2.1 Multimodale Tumortherapie beim HNSCC

Die leitliniengerechte Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereichs basiert auf einem multimodalen Therapiekonzept mit den drei Hauptkomponenten Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie (Pfister et al., 2020). In frühen Tumorstadien (pT1/2, pN0) ist oft eine chirurgische Tumorresektion oder eine alleinige Strahlentherapie (RT) des Tumors eine ausreichende Therapieform. Bei der Radiotherapie (RT) werden je nach Therapiekonzept 60-80 Gy mit konventioneller Fraktionierung (1,8-2 Gy pro Tag an fünf Tagen pro Woche), akzelerierter Fraktionierung (10 Gy pro Woche mit verkürzter Gesamtbehandlungszeit) oder Hyperfraktionierung (zweimal täglich 1,1-1,2 Gy) appliziert (Mazeron et al., 2009; Bourhis et al., 2012). Dabei konnten in den vergangenen zwanzig Jahren große Fortschritte gemacht werden, vor allem mittels der Intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) und der bildgesteuerten Radiotherapie (IGRT). Diese Formen der RT sind der konventionellen Bestrahlung oder der 3D Bestrahlung überlegen, sowohl in Hinblick auf die Schonung des Normalgewebes, Lagevarianten und anatomische Veränderungen (Münter et al., 2003; Nutting et al., 2011).

Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (pT3/4 oder pN+) ist nach der Operation eine adjuvante RT notwendig. Im Fall von zusätzlich vorliegenden Risikofaktoren, einem extrakapsulären Befall oder einem Residualtumor (R+) nach Resektion wird adjuvant eine Radiochemotherapie (RCHT) durchgeführt, da diese der alleinigen RT überlegen

ist (Bernier et al., 2004, 2005; Cooper et. al, 2004). Eine Platin-basierte RCHT ist dabei der aktuelle Goldstandard (Pignon et al., 2009). Als Nebenwirkungsärmere Alternative zur RCHT wurde zudem der therapeutische Effekt einer Kombinationstherapie mit EGFR-Antikörpern wie Cetuximab untersucht (Bonner et al., 2006). Diese Therapie stellte sich jedoch gegenüber der platinbasierten RCHT als unterlegen heraus (Gillison et al., 2019) und auch eine platinbasierte RCHT mit zusätzlicher Cetuximabgabe zeigte keine Vorteile im Überleben (Ang et al., 2014).

1.2.2 Nebenwirkungen und Prognose der Strahlentherapie

Bezüglich der Prognose gibt es deutliche Unterschiede zwischen HPV neg. und HPV pos. HNSCC. Wie von Lassen et al. (2009) berichtet, wird für Patienten mit HPV pos. HNSCC bei einer Nachbeobachtungszeit von 5 Jahren ein deutliches höheres Gesamtüberleben von 62% gefunden als mit nur 26% für Patienten mit HPV neg. HNSCC. Dieser Unterschied im Gesamtüberleben bestätigte sich auch nach definitiver RCHT (Ang et al., 2010; Nguyen-Tan et al., 2014) oder nach adjuvanter RCHT (Linge et al., 2018; Lohaus et al., 2014) mit im Mittel 60-80% Gesamtüberleben in der HPV pos. Patientenkohorte und nur 30-40% in der HPV neg. Patientenkohorte.

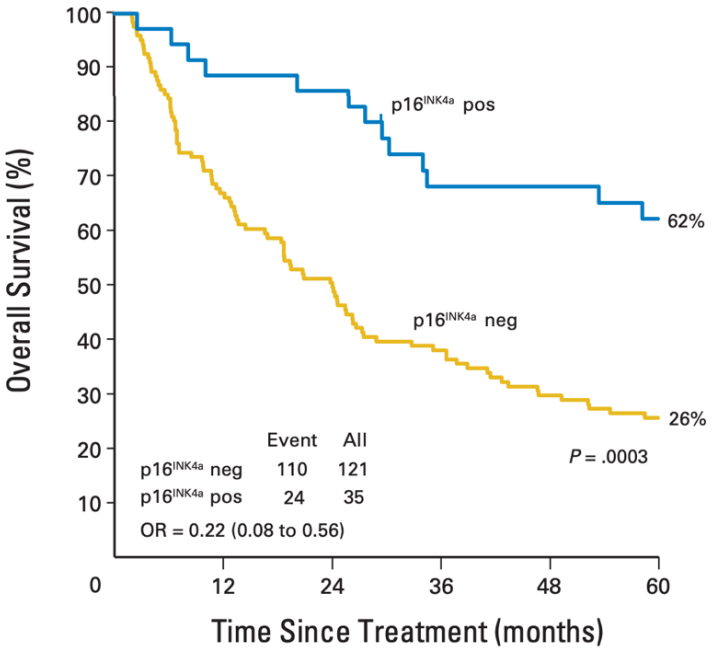

***Abb. 1**: Wirkung einer Strahlentherapie bei HPV neg. und pos. HNSCC*

Das Gesamtüberleben (overall survival) von Patienten mit HPV neg. (p16 neg.) und pos. (p16 pos.) HNSCC-Tumoren nach konventioneller Radiotherapie. Abb. aus (Lassen et al., 2009).

Eine Schwierigkeit bei der Behandlung von HPV neg. und pos. HNSCC stellen die therapiebedingten Nebenwirkungen dar, die z.T. maßgeblich die Lebensqualität und dabei auch die Compliance der Patienten verschlechtern (Epstein et. al., 1999; Mohanti et al., 2007). Trotz aktueller Bestrahlungsmethoden wie der IMRT und IGRT ist es aufgrund der physikalischen Eigenschaften von Photonen unvermeidbar, bei der

Bestrahlung eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich auch die Nachbarstrukturen mit hohen Dosen zu belasten. Dies betrifft insbesondere Organe wie die Haut, die Schleimhäute und die Speicheldrüsen. Zu den möglichen Nebenwirkungen der Therapie zählen daher u.a. Erytheme der Haut, Stomatitis, Rhinosinusitis, Ageusie, Xerostomie, Dysphagie oder auch Odynophagie (Cooper et al., 2004; Nguyen-Tan et al., 2014). Als Folge der Xerostomie kann es zu Kariesbildung oder Osteonekrosen des Kiefers kommen, während die Dysphagie und der daraus entstehende Gewichtsverlust z.T. die Implantation einer Ernährungssonde (PEG-Sonde) erfordern (Dirix et al., 2006; Nguyen et al., 2006). Daher ist es ein dringendes Ziel, für Patienten mit einem HNSCC nebenwirkungsärmere bzw. normalgewebeschonende Therapien und Bestrahlungs-alternativen zu finden.

1.3 Biologische Wirkung von Photonen

1.3.1 DNA-Schädigung und -Reparatur

Die Wirkung von Photonen auf Zellen beruht auf einer Schädigung der DNA durch Ionisationen. Diese Schädigung kann auf direktem oder indirektem Weg erfolgen (Dikomey et al., 2012, 2016). Bei der direkten Ionisation absorbieren die Atome der zellulären DNA die schädigende Strahlung und werden dabei ionisiert. Bei der indirekten Ionisation werden hingegen zunächst Radikale gebildet, die anschließend schädigend auf die DNA wirken. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Radiolyse des Wassers, bei der H-Radikale, OH-Radikale, Elektronen mit Wasserhülle und auch Hydroxy-Peroxyl-Radikale entstehen können, sofern Sauerstoff zur Verfügung steht (Herrmann et al., 2006).

Bei einer Strahlendosis von 1 Gy Photonen werden in einer normalen Körperzelle ca. 10^5 Ionisationen verursacht. Daraus entstehen ca. 2000 Basenschäden, 1000 Einzelstrangbrüche (ESB) und ca. 20-40 Doppelstrangbrüche (DSB).

Da Basenschäden und ESB noch einen unbeschädigten, komplementären DNA-Strang als Matrize besitzen, können diese Schäden nahezu zu 100% mittels der Basenexzisionsreparatur (BER) fehlerfrei repariert werden. Dagegen stellen DSB eine besondere Herausforderung an die DNA-Reparatur dar (Dikomey et al., 2012, 2016). Diese Reparatur wird durch eine komplexe Schadenserkennung ausgelöst. Die sogenannte ‚DNA Damage Response' (DDR) besteht aus einer Kettenreaktion von Marker- und Reparaturproteinen und wird von einem Zellzyklusarrest begleitet, um der Zelle mehr Zeit für die notwendige Reparatur zu geben (Jackson und Bartek, 2009). Zu Beginn spielen die Proteinkinase ATM und der MRN-Komplex (MRE11, Rad50 und Nibrin) eine wichtige Rolle bei der Detektierung eines DSB und der Phosphorylierung des Histons 2AX zum sogenannten yH2AX (Kinner et al., 2008). Die Phosphorylierung

erfolgt dabei über einen Bereich von 1-2 Megabasen (Mb) und führt zur Rekrutierung von MDC1. MDC1 bewirkt wiederum die Bindung und Akkumulierung von DNA-Reparaturproteinen wie 53BP1 und BRCA1 (Coster und Goldberg, 2010; Dikomey et al., 2012, 2016).

Die Reparatur eines DSB kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Welcher Reparaturweg letztendlich genutzt wird, unterliegt einer festgelegten Hierarchie und ist abhängig von der Zellzyklusphase und der Verfügbarkeit der daran beteiligten Proteine (Mansour et al., 2008). Dabei kann es in Tumorzellen wie u.a. auch dem HNSCC zu Abweichungen von dieser Hierarchie kommen (Shin et al., 2006).

Das Nicht-Homologe-End-Joining (NHEJ) stellt für DSB den zentralen Reparaturweg in Säugetierzellen dar. Er wird bei 80% der strahleninduzierten DSB angewandt. Er ist sehr schnell und in allen Zellzyklusphasen verfügbar. Dabei bindet ein Heterodimer bestehend aus Ku70 und Ku80 an die beiden Bruchenden des DSB und verhindert somit deren räumliche Trennung. Anschließend wird die DNA-PKcs rekrutiert, welche gemeinsam mit Ku70/Ku80 die DNA-abhängige-Protein-Kinase (DNA-PK) bildet. Mithilfe von weiteren Enzymen und einem Ligationskomplex aus XRCC4, LigIV und XLF wird schließlich der DSB repariert. Hierbei kann es allerdings zur Entfernung einzelner Nukleotide kommen (Dikomey et al., 2012, 2016; Weterings und Chen, 2008).

Nach dem NHEJ ist die Homologe Rekombination (HR) der zweitwichtigste Reparaturweg. Die HR ist weitgehend fehlerfrei, da sie nur in der S- und G2-Phase abläuft und das intakte Schwesterchromatid als Matrize verwendet. Zu Beginn wird durch den MRN-Komplex und CtIP/Exol das 5'DNA-Ende reseziert, um einen 3'-DNA-Überhang zu generieren. Rad52 und das Replikationsprotein A (RPA) stabilisieren und schützen dabei die DNA-Enden. Anschließend wird durch BRCA2 der 3'Überhang mit Rad51 beladen, welches an das Schwesterchromatid bindet und die korrekte DNA-Synthese ermöglicht (Ceccaldi et al., 2016; Dikomey et al., 2012, 2016).

Bei einem Defekt im NHEJ oder HR kann die Zelle auf das alternative-NHEJ (Alt-NHEJ) zurückgreifen. Das Alt-NHEJ findet ebenfalls in allen Zellzyklusphasen statt, verläuft jedoch langsamer und führt häufig zu Insertionen oder Deletionen von Nukleotiden. Die für diesen Reparaturweg relevanten Hauptproteine sind PARP1, XRCC1 und LigIII (Caracciolo et al., 2021). Daneben gibt es zusätzlich die Möglichkeit des ‚Single Strand Annealing' (SSA), welches bei einem DSB angewandt werden kann, der zwischen zwei repetitiven DNA-Sequenzen auf dem gleichen Strang liegt. Dieser Reparaturweg führt jedoch auch zu Mutationen, da bei der Verknüpfung der beiden Strang-Enden ein Teil der repetitiven DNA-Sequenz und die DNA zwischen den beiden Sequenzen entfernt wird (Dikomey et al., 2012, 2016).

1.3.2 Strahlenempfindlichkeit HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen

HPV pos. HNSCC zeigen nicht nur in vivo (vgl. Abb. 1) sondern auch in vitro eine höhere Strahlenempfindlichkeit als HPV neg. HNSCC. Dies kann auf eine verminderte Reparaturkapazität von strahleninduzierten DSB zurückgeführt werden (Rieckmann et al., 2013). In HPV pos. HNSCC-Zellen können die DSB wegen eines Defekts in der Homologen Rekombination (HR) nicht effizient repariert werden. Dies führt zu einer erhöhten Zahl an nicht-reparierten DSB, was mit einer verstärkten Arretierung der Zellen in der G2-Phase und vor allem erhöhten Zellabtötung einhergeht (Arenz et al., 2014; Kimple et al., 2013; Ziemann et al., 2017).

1.4 Strahlentherapie mit Protonen

1.4.1 Klinische Anwendung

Bereits in den 1940er Jahren wurde gezeigt, dass sich neben Photonen (RT) auch Protonen (PBT) für eine Therapie von Krebserkrankungen eignen (Paganetti et al., 2021). Die erste Bestrahlung eines Patienten mit Protonen erfolgte 1954 an der Universität von Kalifornien im Lawrence Berkeley Laboratory (Hallemeier et al., 2020). Es dauerte nur wenige weitere Jahre, bis die ersten Studiendaten zur Protonenstrahl-Therapie bei menschlichen Krebspatienten erhoben wurden (Falkmer et al., 1962). Dabei wurden Karzinome unterschiedlicher Entität in den Bereichen Abdomen und Becken behandelt, um die Auswirkungen der Protonenbestrahlung auf das Tumor- und das Normalgewebe zu untersuchen. Die Tumore zeigten nach der Bestrahlung überwiegend sowohl makroskopische als auch mikroskopische Zeichen der Regression, während das umliegende Normalgewebe sehr gut geschont werden konnte. Von Falkmer et al. (1962) wurde festgestellt, dass bei einigen Patienten das ganze Becken mit einer sehr hohen Protonendosis bestrahlt werden konnte und sich der Tumor weit zurückbildete, ohne dass es dabei zu ernsthaften pathologischen Veränderungen der Haut oder der Harnblase kam. Bezüglich der aufgetretenen Nebenwirkungen litten die Patienten hauptsächlich an Veränderungen der bestrahlten Hautareale in Form von Erythemen, Hautschuppung und Ulzerationen.

Im Jahr 1991 entstand in den USA das erste rein medizinische Therapiezentrum für Protonen (Barnes et al., 2018; Slater et al., 2012). Etwa drei Jahrzehnte später sind weltweit 81 Protonenstrahl-Therapiezentren in Betrieb, 41 weitere befinden sich in der Bauphase und etwa 20 Zentren sind in Planung (Tsang und Patel, 2019). In Deutschland stehen aktuell Protonen an fünf Therapiezentren in Berlin, Heidelberg, Essen, Dresden und Marburg zur Verfügung.

Besonders in den vergangenen zwei Jahrzehnten gewann für Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs die Protonenbestrahlung zunehmend an Bedeutung. Zu den beiden häufigsten

Anwendungen der Protonenstrahlen zählen dabei die passive Strahlaufstreuung und das aktive Pencil-Beam-Scanning. Bei ersterer wird der gestreute Protonenstrahl durch eine angepasste Feldapertur und Reichweitenkompensatoren gelenkt, während bei letzterer ein Dosisraster durch verschiedene einzeln abgelenkte Strahlen erzeugt wird (Li et al., 2020, Oral Oncol). Mithilfe des Scanning-Verfahrens und durch den Einsatz von Streufolien, Energiemodulationstechniken und Messingblenden konnte zudem ein verbreitertes SOBP-Feld (Spread-out Bragg Peak Modulated) erzeugt und damit ein dreidimensionales, durch CT abgegrenztes Tumorvolumen bestrahlt werden (Moreno et al., 2019). Dies ermöglichte schließlich die Etablierung der intensitätsmodulierten Protonentherapie (IMPT), von der man sich besonders bei den komplexen und unregelmäßigen anatomischen Gegebenheiten des Kopf-Hals-Bereichs sehr viele Vorteile versprach (Li et al., 2020, Oral Oncol).

In mehreren Studien wurde für HNSCC bereits die PBT mit der gängigen IMRT verglichen. Es zeigte sich, dass nach PBT die Patienten generell ein ähnlich gutes 3- bzw. 5-Jahres-Überleben hatten wie nach RT (Moreno et al., 2019). Dies konnte für unterschiedliche Lokalitäten bestätigt werden, wie u.a. für OPSCC (Gunn et al., 2016; Slater et al., 2005), für Tumore des Nasopharynx (Lewis et al., 2016; Li et al., 2021, JAMA Netw Open) und auch für Tumore der Nasenneben- und Nasenhaupthöhle (Patel et al., 2014). Entscheidend war dabei vor allem der Befund, dass mit der PBT eine deutlich bessere Schonung nahe gelegener Organe und eine signifikante Reduzierung von Nebenwirkungen möglich war (Moreno et al., 2019). Im Hinblick auf strahlungsbedingte Spätfolgen, wie bspw. der Implantation von Ernährungssonden oder dem ungewollten Gewichtsverlust, waren insgesamt signifikant weniger Patienten nach Protonentherapie betroffen als nach Photonentherapie (Blanchard et al., 2016; Gunn et al., 2016; Li et al., 2021, JAMA Netw Open; Mendenhall et al., 2014; Youssef et al., 2022). Damit zeigen die bisherigen Studien insgesamt, dass durch die Anwendung der PBT beim HNSCC ähnlich gute Heilungsraten erzielt werden können wie durch eine IMRT bei aber deutlich reduzierten Nebenwirkungen.

Die Herausforderung der PBT liegt in einer möglichst genauen und flexiblen Bestrahlungsplanung, da sie sehr empfindlich ist in Bezug auf die Partikelreichweite, die Patientenlagerung und anatomische Veränderungen. Zudem bestehen gewisse Einschränkungen bei der Umschaltzeit der Protonenenergie und bei den Algorithmen zur Optimierung der Bestrahlungsraster (Moreno et al., 2019). Hinzu kommt, dass weiterhin Unsicherheiten bei der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW) herrschen und dass teilweise noch wenige Daten zur Re-Bestrahlung und zum Risiko sekundärer Malignome nach Bestrahlung vorliegen (Moreno et al., 2019). Diese Bereiche werden jedoch weiterhin intensiv erforscht und es finden eine Vielzahl von Phase II oder III Studien zur

weiteren Untersuchung der Protonentherapie statt (NCT03217188, NCT02923570, NCT01893307, NCT03981068) (Li et al., 2020, Oral Oncol).

1.4.2 Physikalische Wirkung von Protonen

Bezüglich ihrer physikalischen Eigenschaften bestehen zwischen Photonen und Protonen wichtige Unterschiede. Bei ihrem Ein- und Durchtritt durch das bestrahlte Gewebe geben die Strahlenarten dabei unterschiedlich schnell ihre Energiedosis ab (Abb. 2A). Die in der Therapie verwendeten Photonen sind hochenergetische elektromagnetische Strahlen mit Energien von > 10 MeV. Beim Eindringen in das Gewebe kommt es zur Absorption der Photonen und damit zur Entstehung von Sekundärteilchen. Dies löst initial einen Aufbaueffekt aus, so dass erst nach einigen Zentimetern das Dosismaximum erreicht wird, bevor die absorbierte Dosis exponentiell abnimmt (Abb. 2A). Somit kann die Strahlung tief in das Gewebe eindringen und den Tumor schädigen, verursacht gleichzeitig aber auch eine Schädigung der Haut bzw. des umliegenden Normalgewebes. Dies hat ebenfalls zur Folge, dass häufig eine hohe Austrittsdosis auf das gesunde Gewebe hinter dem Zielvolumen appliziert wird (Kaiser et al., 2019). Eine hohe Tumordosis bei gleichzeitig akzeptabler Belastung des Normalgewebes kann daher nur erreicht werden, wenn wie im Falle der IMRT die Bestrahlung aus möglichst vielen Richtungen erfolgt mit jeweils unterschiedlichen Energien und Feldern (Rehman et al., 2018).

Teilchenstrahlen wie Protonen zeigen im Gegensatz zu Photonen ein invertiertes Tiefendosisprofil und eine endliche Reichweite im Gewebe (Abb. 2A). Beim Eintritt in das Gewebe wird zunächst nur ein kleiner Anteil der kinetischen Energie von den Zellen absorbiert, weshalb die Belastung im Normalgewebe zunächst sehr gering ist. Mit dem weiteren Eindringen der Protonen und der damit abnehmenden Energie nimmt die Wahrscheinlichkeit für eine Absorption stetig zu, bis am Ende der Strecke die Abgabe der maximalen Energie im sogenannten Bragg-Peak erfolgt (Wannenmacher et al., 2013). Durch die gezielte Wahl der Energie kann der Bragg-Peak und somit die maximale Dosis im Zielvolumen fokussiert werden. Bei der Bestrahlung von bspw. Augentumoren reichen dabei Energien von 60-90 MeV aus, während bei tiefliegenden Tumoren Energien von mindestens 160 MeV aufgewandt werden müssen (Wannenmacher et al., 2013). Hinter dem Bragg-Peak erfolgt ein schneller Dosisabfall, weshalb das hinter dem Tumor liegende Normalgewebe sehr effizient geschont wird. Durch Verwendung unterschiedlicher Energien bzw. Abschwächung mit entsprechenden Filtern kann der Bragg Peak ausgeweitet werden, so dass mit dem sogenannten ‚Spread Out Bragg Peak' (SOBP) selbst größere Tumoren bestrahlt werden können.

Dieser Vorteil der PBT gegenüber der RT ist in Abb. 2B anhand der Bestrahlungsplanung für ein Neuroblastom veranschaulicht (Moreno et al., 2019). Durch

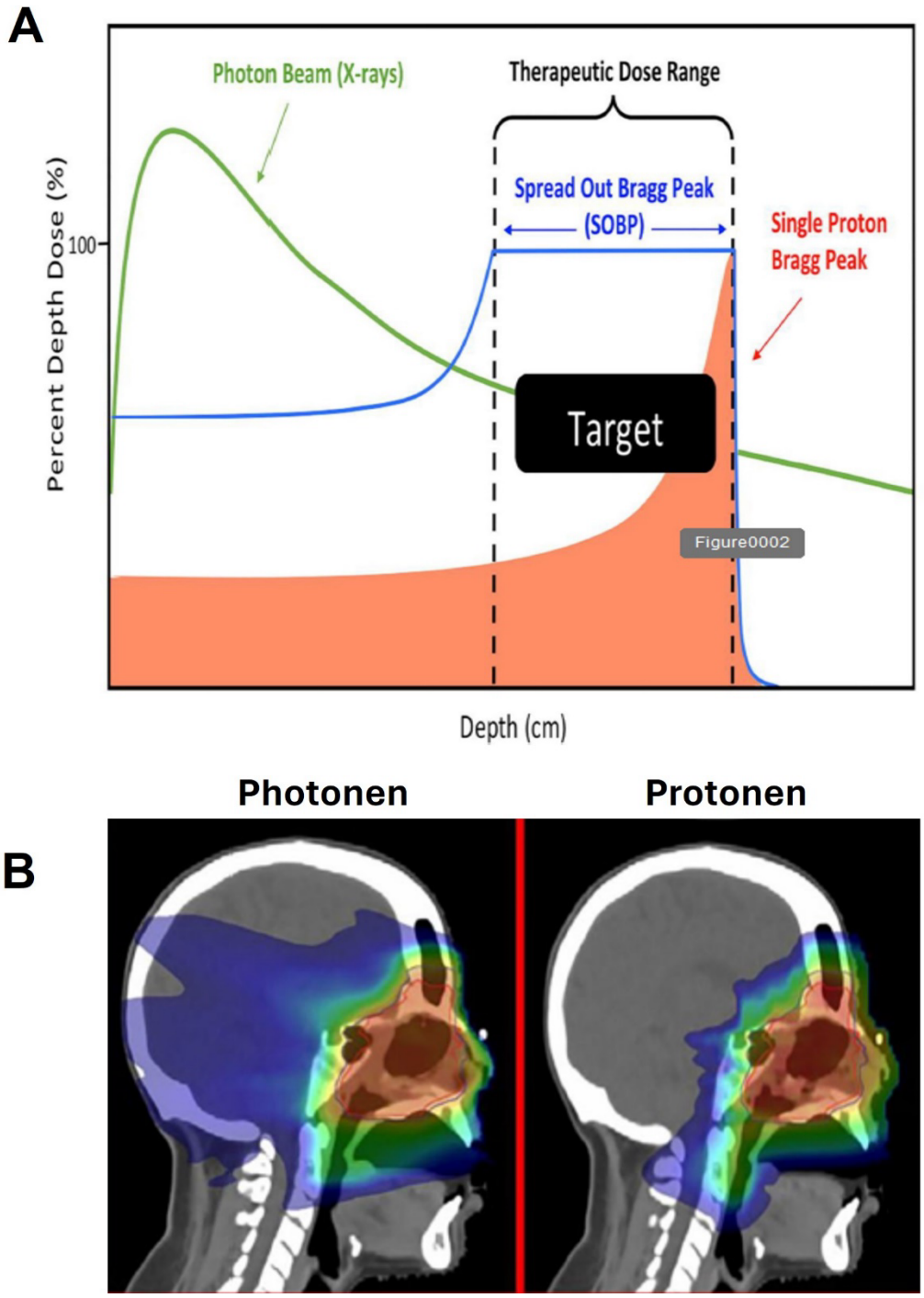

***Abb. 2**: Physikalische Wirkung von Protonen*

A) Tiefendosiskurven von Protonen und Photonen: Aufgetragen ist die absorbierte Dosis in Abhängigkeit von der Eindringtiefe, B) Dosisverteilung für ein Neuroblastom bei Photonenbestrahlung mit IMRT Plan (links) bzw. bei Protonenbestrahlung (rechts). Abb. aus (Moreno et al., 2019).

die farbliche Markierung wird angezeigt, wie viel Dosis auf das rot umrandete Tumorvolumen und das umliegende Normalgewebe appliziert wird. Dabei ist erkennbar, dass bei der Bestrahlung mit Photonen trotz IMRT-Plan ein sehr großes Areal um den Tumor herum bestrahlt wird und damit eine hohe Belastung des Normalgewebes vorliegt. Bei Bestrahlung mit Protonen ist es dagegen möglich, das Zielvolumen mit einer

hohen Dosis zu bestrahlen und gleichzeitig andere Risikoorgane zu schonen. Diese Schonung des Normalgewebes wird als wesentlicher Vorteil der Protonentherapie angesehen.

1.4.3 Biologische Wirkung von Protonen

Wie Photonen so führen auch Protonen zu DNA-Schäden sowohl durch direkte als auch indirekte Ionisation. Bei dieser Ionisation entstehen wie bei Photonen Sekundärelektronen, die weitere Ionisationen auslösen und den größten Teil des Effekts ausmachen. Die in der klinischen Behandlung genutzten Protonen zählen dabei zu den niedrig-LET-Strahlungen und unterscheiden sich daher in der Ionisationsdichte nicht nennenswert von dem Verhalten der Photonen.

In der Therapieplanung wird aktuell davon ausgegangen, dass Protonen auf Zellen nur eine geringfügig stärkere Wirkung haben als Photonen. Um solche Unterschiede in der Strahlenwirkung zu erfassen, wurde für die jeweilige Strahlenart die Relative Biologische Wirksamkeit (RBW) definiert. Dieser Wert gibt an, um welchen Faktor die jeweilige Strahlenart stärker wirkt als eine Bestrahlung mit Photonen.

Für die Tumorzellabtötung wird für die Protonenbestrahlung (PBT) aktuell von einer RBW von 1,1 ausgegangen (Vitti und Parsons, 2019). Dieser Wert basiert im Wesentlichen auf Versuchen mit Zellkulturen. Für HNSCC-Zellen wurden dabei RBW-Werte zwischen 1,0 und 1,5 gemessen (Meerz et al., 2021; Vitti et al., 2020; Wang et al., 2017; Zhou et al., 2022). Anhand der bisher vorliegenden Daten (Vitti et al., 2020; Wang et al., 2017) kann allerdings noch nicht entschieden werden, ob dabei ein Unterschied für HPV negative und positive HNSCC-Zellen besteht. Um dies endgültig zu klären, ist aufgrund der Heterogenität der HNSCC-Zellen eine Untersuchung mit einer ausreichend großen Zahl an Zelllinien erforderlich.

Auch bezüglich der durch die Protonenstrahlen verursachten DNA-Schäden zeigt sich nur eine geringe Abweichung gegenüber Photonenstrahlen. Für die Zahl der nach Bestrahlung verbliebenen DSB wurde bei Bestrahlung mit Protonen ähnlich wie für die Zellabtötung eine Zunahme um den Faktor 1,0 bis 1,6 gefunden (Keta et al., 2021; Meerz et al., 2021; Vitti und Parsons, 2019). Bezüglich der DSB-Reparaturwege wurde vermutet, dass nach Protonenstrahlung DSB vermehrt mittels HR repariert werden (Grosse et al., 2014). Eine umfassende Analyse von Meerz et al. (2021) mit insgesamt 7 HNSCC-Zelllinien zeigte jedoch, dass die Wahl des Reparaturweges nicht davon abhängt, ob die Zelle mit Photonen oder Protonen bestrahlt wurden, sondern eine Eigenschaft der jeweiligen Zelllinie ist.

Bei diesen z.T. unterschiedlichen RBW für das Zellüberleben bzw. der Zahl der residualen DSB ist zu berücksichtigen, dass die RBW auch von physikalischen Faktoren

abhängt wie der Energie des Protonenstrahls und ebenfalls von biologischen Faktoren wie der Zellzyklusphase, dem Sauerstoffgehalt oder der Art des Gewebes (Vitti und Parsons, 2019). Ein weiterer Grund liegt in den physikalischen Eigenschaften des spread-out bragg-peak (SOBP). Da der SOBP durch die Übereinanderlagerung mehrerer einzelner Strahlen erzeugt wird, gibt es entlang der Strecke des SOBP auch geringe Unterschiede in der Protonenenergie und damit auch im LET. Insbesondere am distalen Rand des SOBP nimmt die Protonenenergie stark ab, wobei der LET stark ansteigt. Es wurde mehrfach berichtet, dass zu Beginn des SOBP eine RBW von ca. 1,1 bestand, welche im distalen Bereich des SOBP auf über 1,5 stieg und am distalen Rand des SOBP sogar auf Werte zwischen 2 und 3,5 anstieg (Vitti und Parsons, 2019). Passend dazu wurde in einigen Studien auch festgestellt, dass im Verlauf des SOBP die Anzahl an DSB zunächst gleichblieb, diese jedoch am distalen Ende des SOBP stark anstieg (Chaudhary et al., 2016; Keta et al., 2021).

1.5 PARP-Inhibition

1.5.1 PARP

Die Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP) ist an einer Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse wie Zellmetabolismus, Entzündungen, Immunität, Stressreaktion, Apoptose, hormonelle Signale, Virusinfektion und vor allem der DNA-Reparatur beteiligt (Kim et al.,

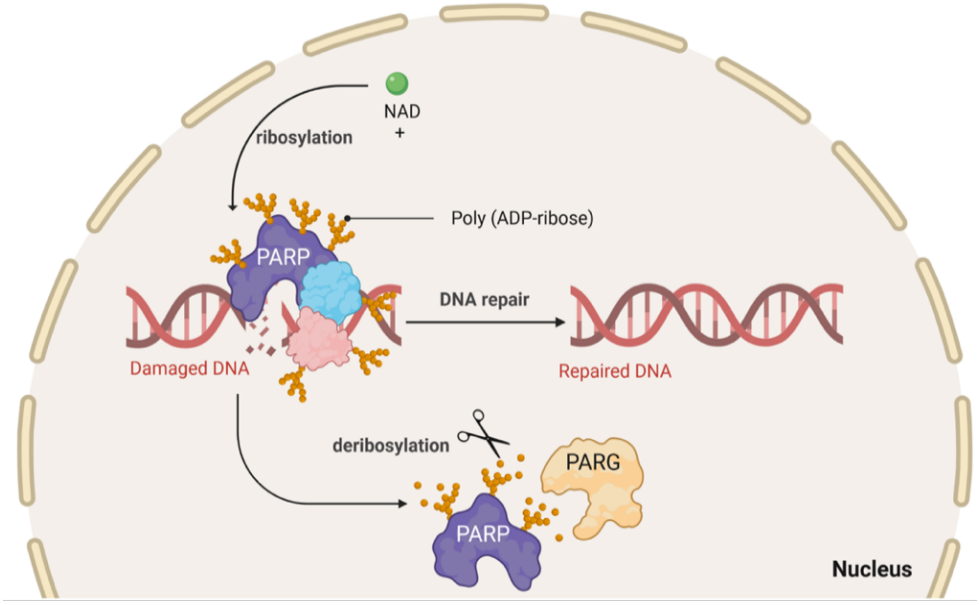

***Abb. 3**: Schadenserkennung durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)*

PARP bindet an DNA-Schäden und aktiviert dadurch seine katalytische Funktion. Durch die Spaltung von NAD+ entstehen ADP-Ribose und Nicotinamid. Aus den ADP-Ribose-Molekülen werden Poly-(ADP-Ribose)-Ketten gebildet. Diese bewirken die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen. Nach der DNA-Reparatur löst sich PARP von der DNA und wird wieder inaktiviert. Abb. aus (bpsbioscience).

2020; Rose et al., 2020). Die gesamte PARP-Familie besteht aus insgesamt 17 Mitgliedern, die je nach Prozess unterschiedlich bedeutend sind. Einzelne Komponenten wurden bereits sehr intensiv untersucht. Dies gilt insbesondere für PARP-1 und PARP-2. Für beide Proteine wurde eine zentrale Rolle in der DNA-Schadenserkennung gezeigt (Kim et al., 2020; Spiegel et al., 2021). PARP-1 und PARP-2 liegen in der Zelle normalerweise in einer inaktiven Form vor. Erst durch Bindung an die DNA werden sie aktiviert. Liegen DNA-Schäden vor, so kann PARP-1/2 über die konservierte N-terminale DNA-Schadenserkennungs- und Bindungsdomäne diese registrieren und sich daran binden. Die katalytische Domäne wird daraufhin freigelegt und beginnt mit der Polymerisation von ADP-Ribose-Einheiten (PARs) auf Zielproteinen. Dieser Prozess wird als PARylation bezeichnet (Abb. 3). Dabei wird NAD+ an der N-glykosidischen Bindung in ADP-Ribose und Nicotinamid aufgespalten und die entstehenden ADP-Ribose-Moleküle werden kovalent zu linearen und verzweigten PAR-Ketten verknüpft. Ca. 90% der PARylation bei DNA-Schäden werden durch PARP-1 geleistet, der Rest von PARP-2 (Kanev et al., 2024). Zu den Akzeptorproteinen zählen dabei u.a. Histone und andere Chromatin-assoziierte Proteine (Rose et al., 2020; Spiegel et al., 2021). Durch die negative Ladung der PAR-Ketten wird die Chromatin-Struktur aufgelockert und ermöglicht so die weitere Interaktion mit Helikasen oder DNA-Reparaturproteinen (Kanev et al., 2024; Lesueur et al., 2017). Viele wichtige DNA-Reparaturproteine wie u.a. p53, XRCC1, Ligase III, DNA-PKcs, oder Ku70 besitzen Protein-Motive zur nicht-kovalenten Interaktion mit PAR-Ketten, wodurch sie an den Ort des DNA-Schadens rekrutiert werden (Spiegel et al., 2021). Neben anderen Proteinen wird PARP auch selbst autoPARyliert. Dies führt zur elektrostatischen Destabilisierung von PARP und zur Dissoziation von der DNA (Hopkins et al., 2019). Hierdurch wird mehr Raum für die Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturproteine geschaffen und PARP kann in seinen inaktiven Zustand zurückkehren (Li et al., 2021, Front Pharmacol).

1.5.2 PARP-Inhibition

Schon sehr früh wurde erkannt, dass durch die Inhibition von PARP viele Tumorzellen gezielt abgetötet werden können. Die ersten Versuche zur PARP-Inhibition erfolgten bereits in den 1970er Jahren an HeLa Zellen durch die Behandlung mit Thymidin und Nicotinamid (Rose et al., 2020).

Die aktuellen PARP-Inhibitoren (PARPi) wirken durch kompetitive Inhibition der NAD+-Bindung an PARP (Abb. 4). Sie binden an die katalytische Stelle und beeinträchtigen dadurch die enzymatische Aktivität von PARP. Dies führt zum sogenannten ‚PARP-Trapping' und unterbindet die weitere PARylation durch PARP. Dadurch können zum einen keine weiteren DNA-Reparaturproteine rekrutiert werden. Außerdem verhindert dieses ‚Trapping', dass PARP sich von der DNA lösen kann und behindert dadurch

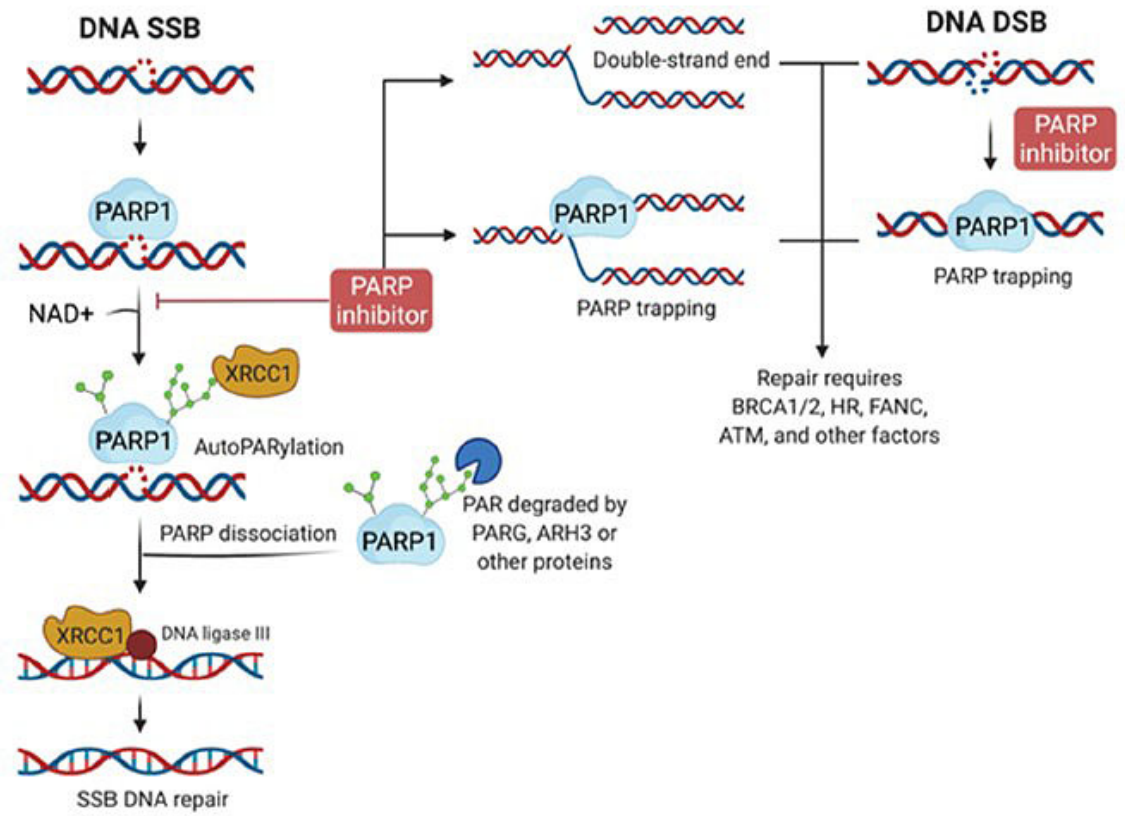

***Abb. 4**: Inhibition von PARP*

Die Inhibition von PARP unterdrückt die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB). Kollidiert dann dieser Schaden mit einer DNA-Replikationsgabel, so kann daraus ein einarmiger DSB entstehen. Dieser DSB benötigt zur Reparatur eine HR. Abb. aus (Luo und Keyomarsi, 2022).

nukleäre Prozesse, wie vor allem die DNA-Replikation. Stößt eine Replikationsgabel auf ein ‚trapped PARP', so wird die Replikation gestoppt und es entsteht ein einarmiger DSB (Hopkins et al., 2019; Kanev et al., 2024; Rose et al., 2020). Diese sogenannten Replikations-abhängigen DSB können normalerweise sehr gut durch die HR repariert werden. Liegt in der Tumorzelle jedoch ein Defekt der HR vor, so wie in einer Brustkrebszelle bei einem mutierten BRCA1 oder BRCA2, kann dieser Schaden nicht repariert werden bzw. die Zelle muss auf andere fehlerhafte Reparaturwege wie NHEJ oder alt-NHEJ ausweichen. Dies kann dann zu genomischer Instabilität, chromosomalen Fusionen, Translokationen oder sogar dem Zelltod führen (Helleday, 2011; Li et al., 2021, Front Pharmacol; Luo und Keyomarsi, 2022; Spiegel et al., 2021). Daher kann eine PARP-Inhibition in HR-defizienten Zellen für eine gezielte Zellinaktivierung genutzt werden, während sie bei HR-kompetenten Zellen ohne Wirkung ist (Kanev et al., 2024; Rose et al., 2020). Dieser gezielte Zelltod verursacht durch den Synergismus aus einem genetischen Defekt und einer pharmakologischen Behandlung, wird generell als ‚Synthetic Lethality' bezeichnet.

Aktuell sind in den USA von der ‚Food and Drug Administration' (FDA) sowie in Europa

von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) die vier PARP-Inhibitoren (PARPi) Olaparib, Rucaparib, Niraparib und Talazoparib zugelassen (Rose et al., 2020). Olaparib erlangte als erstes im Jahr 2014 die Zulassung für die Behandlung von fortgeschrittenen Ovarial-Karzinomen mit BRCA1/2-Mutationen. Diese Mutationen sind gut erforscht und verursachen einen Defekt in der HR, weshalb hier das Prinzip der ‚Synthetic Lethality' erstmals angewandt werden konnte. In den Folgejahren wurden die PARPi Rucaparib (2016), Niraparib (2017) und Talazoparib (2018) entwickelt und zugelassen (Rose et al., 2020). Zu den Indikationen zählen dabei überwiegend Ovarial-Karzinome oder Brustkrebs, aber auch Pankreas-Karzinome und Prostatakrebs.

In den meisten klinischen Studien wurde die Wirkung von PARPi-Monotherapien untersucht, insbesondere mit Erhaltungstherapien nach erfolgter Chemotherapie. Die PARPi-Behandlungen waren dabei der Standard-Chemotherapie überlegen und erzielten ein längeres progressionsfreies Überleben (PFS) und eine höhere Lebensqualität. Dies zeigte sich bei den Phase II und III Studien PRIMA, SOLO1, SOLO2, ARIEL2 zum Ovarial-Karzinom sowie bei den Studien OlympiAD und EMBRACA zum Mammakarzinom, den Studien TOPARP und GALAHAD zum Prostatakrebs; sowie der POLO-Studie beim Pankreaskarzinom (Cortesi et al., 2021; Fu et al., 2023; Litton et al., 2018; Rose et al., 2020).

PARPi wurde aber ebenfalls in Kombination mit einer Chemotherapie getestet. In den Phase III Studien VELIA und PAOLA wurde für das Ovarial-Karzinom und der BROCADE3 für Brustkrebs gezeigt, dass mit der Kombination aus dem PARPi Veliparib und einer Chemotherapie als Erstlinien- und Erhaltungstherapie ein signifikant besseres PFS erzielt werden kann als durch alleinige Chemotherapie (Rose et al., 2020). Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht für alle Inhibitoren erreicht werden.

Eine Therapie mit PARPi kann teilweise auch zu schweren myelodepressiven Nebenwirkungen wie Anämie, Neutropenie oder Thrombozytopenie führen. Diese Nebenwirkungen fielen jedoch für die verschiedenen PARPi ganz unterschiedlich aus. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung der Myelodepression mit der PARP-Trapping-Potenz des jeweiligen Inhibitors korreliert (Fu et al., 2023; Hopkins et al., 2019). Veliparib hat dabei eine niedrige PARP-Trapping-Potenz. Dies bedeutet, dass die Behandlungs-Dosis, die zur Inhibition der PAR-Synthese nötig ist, niedriger ist als die Dosis, welche zum PARP-Trapping und zu myelotoxischen Nebenwirkungen führt (Hopkins et al., 2019). Talazoparib hingegen zeigt die stärksten hämatologischen Nebenwirkungen, was mit der mit Abstand höchsten Trapping-Potenz dieses Inhibitors korreliert. Die Trapping-Potenz von Talazoparib ist etwa 100 bis 1000-fach höher als die von Olaparib und nochmals 5- bis 10-fach höher als die von Rucaparib, Veliparib oder Niraparib (Hopkins et al., 2019; Rose et al., 2020; Rudolph et al., 2022). Es konnte

gezeigt werden, dass die hohe Trapping-Potenz von Talazoparib überwiegend über PARP-1 vermittelt wird. PARP-1 scheint somit die treibende Komponente der Zytotoxizität der PARPi in der Monotherapie zu sein (Hopkins et al., 2019).

Diese Unterschiede zwischen den PARPi sind auch bei Kombination mit einer Chemotherapie von Bedeutung. So wird bei Kombination von Veliparib mit einer Chemotherapie keine Steigerung der myelodepressiven Nebenwirkungen beobachtet, wohl aber bei Kombination mit Talazoparib (Hopkins et al., 2019; Rose et al., 2020; Rudolph et al., 2022).

In diversen in vitro und auch in vivo Studien werden aktuell weitere Möglichkeiten einer Kombination mit PARPi untersucht wie u.a. bei Therapien mit Topoisomerase-I-Inhibitoren, PI3K-Inhibitoren, DNMT-Inhibitoren oder PD-1-Inhibitoren (Rose et al., 2020). Hierbei wird es darauf ankommen, die jeweils unterschiedlichen Profile der Inhibitoren zu berücksichtigen.

1.5.3 PARP-Inhibition in Kombination mit Photonen

Eine große Potenz für PARPi wird insbesondere für die Kombination mit einer Strahlentherapie mit Photonen gesehen (Powell et al., 2010). Dies beruht darauf, dass durch Photonen vor allem SSB und Basenschäden erzeugt werden, an deren Reparatur PARP beteiligt ist. Diese Schäden können in der Regel sehr effektiv von den Zellen mittels BER repariert werden. Durch eine Inhibition von PARP wird diese Reparatur jedoch deutlich behindert (Noel et al., 2006), so dass es wesentlich häufiger zur Kollision unreparierter DNA-Schäden mit einer Replikationsgabel kommt und so replikationsabhängige, einarmige DSB entstehen (Abb. 4). In Zellen mit defekter HR ist daher entsprechend des Prinzips der Synthetic Lethality der stärkste Einfluss der PARPi auf die Strahlenempfindlichkeit zu erwarten (Abb. 4).

Von Noel et al. (2006) wurde entsprechend dem obigen Konzept erstmals gezeigt, dass durch die Kombination von PARPi und Photonenbestrahlung vor allem für S-Phase-Zellen eine Strahlensensibilisierung erreicht wird. Für asynchrone Zellkulturen zeigte sich demgemäß, dass diese Strahlensensibilisierung umso größer ausfällt, je höher der jeweilige Anteil der S-Phase-Zellen ist (Dungey et al., 2008). Entsprechend des Prinzips des Synthetic Lethality ist diese Strahlensensibilisierung besonders stark für Brustkrebszellen bzw. Ovarialkarzinomzellen mit defekter HR (Zhao et al., 2019; Bi et al., 2018). Für kleinzellige Lungenkarzinomzellen (SCLC) wurde erstmals beschrieben, dass das Ausmaß der Strahlensensibilisierung je nach PARP-Inhibitor deutlich variieren kann und durch den Inhibitor Talazoparib eine wesentlich stärkere Strahlensensibilisierung erreicht werden kann als durch den PARP-Inhibitor Veliparib (Laird et al., 2018). Dies wird darauf zurückgeführt, dass das ‚Trapping' von PARP durch

Talazoparib wesentlich stärker ist als durch Veliparib, während sich hinsichtlich der Hemmung der PAR-Polymerisation die beiden Inhibitoren nur wenig unterscheiden (Laird et al., 2018). Von Jonuscheit et al. (2021) wurde für Melanomzellen gezeigt, dass dieser stärkere Effekt von Talazoparib allerdings mit einer deutlich erhöhten Zelltoxizität einhergeht.

Für HNSCC-Zellen konnte die strahlensensibilisierende Wirkung von PARPi durch das Marburger Labor gezeigt werden (Ziemann et al., 2017). Dabei wurde außerdem festgestellt, dass dieser Effekt bei HPV pos. Zellen deutlich stärker ausfällt als für HPV neg. Zellen. Dies konnte auf den Defekt der HR in den HPV pos. Zellen zurückgeführt werden, womit sich durch das Prinzip der ‚Synthetic Lethality' für diese Zellen ein verstärkter Effekt von PARPi ergibt.

Entsprechende Tendenzen hatten sich bereits durch Untersuchungen von Weaver et al. (2015) angedeutet und auch in anderen Arbeitsgruppen konnte für HNSCC-Zellen diese strahlensensibilisierende Wirkung von PARPi in Kombination mit einer Photonenbestrahlung bestätigt werden (Dok et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhou et al., 2022).

Neben der Forschung an Zellkulturen zeigte sich auch in zahlreichen klinischen Studien für unterschiedliche Tumorentitäten die verstärkende Wirkung von PARPi bei Kombination mit einer Photonentherapie (Argiris et al., 2021; Chabot et al., 2017; Czito et al., 2017; de Haan et al., 2021; Jagsi et al., 2018; Karam et al., 2018; Loap et al., 2021; 2022; Mehta et al., 2015; Reiss et al., 2017; Sim et al., 2021; Tuli et al., 2019). In Übersichtsarbeiten wird aber darauf hingewiesen, dass es bezüglich der Toxizität und der Nebenwirkungen der PARP-Inhibitoren noch zu wenig Kenntnisse gibt, so dass es weiterhin unklar ist, welcher PARP-Inhibitor für die jeweilige Patientengruppe am besten geeignet ist (Barcellini et al., 2021; Sun et al., 2023).

1.5.4 PARP-Inhibition in Kombination mit Protonen

Vielversprechende präklinische Forschungsergebnisse liegen auch für die Kombination von PARPi mit einer Protonenbestrahlung vor. So konnte für Zellen verschiedener Tumorentitäten wie NSCLC (Hirai et al., 2016), Chondrosarkom (Césaire et al., 2019), Lungen- und Pankreaskarzinom (Bright et al., 2022; Waissi et al. 2021), Ösophaguskarzinom (Kageyama et al., 2020), sowie Brustkrebs (Park et al., 2024) gezeigt werden, dass auch die Wirkung von Protonen durch PARPi verstärkt wird. Entsprechende Ergebnisse wurden auch für HNSCC-Zellen gefunden (Wang et al., 2020; Lee et al., 2022; Zhou et al., 2022). Die Verstärkung nach Protonen war dabei ähnlich hoch wie nach Photonen.

Obwohl bereits zahlreiche klinische Studien mit Protonen durchgeführt wurden bzw. aktuell geplant sind, gibt es scheinbar noch keine Studie, bei der gezielt die Wirkung von Protonen in Kombination mit PARPi getestet wird (https://classic.clinicaltrials.gov/). Ein wesentlicher Grund dafür könnte sein, dass noch zu wenig Erkenntnisse über die Wirkung der unterschiedlichen PARP-Inhibitoren in Kombination mit Protonen vorliegen. Hier fehlen noch weitere präklinische Untersuchungen, die zeigen, welcher Inhibitor für die jeweilige Tumorentität am besten geeignet ist.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Die Therapie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) erfolgt vor allem bei einem fortgeschrittenen Stadium durch eine Cisplatin basierte Radiochemotherapie. Durch diese Therapie kann bei HPV pos. HNSCC ein sehr gutes Gesamtüberleben erzielt werden, nicht jedoch für HPV neg. HNSCC. Allerdings ist diese Therapie mit erheblichen Nebenwirkungen und Spätfolgen verbunden. Daher besteht die dringende Notwendigkeit, diese Therapie weiter zu verbessern, sodass die Normalgewebetoxizität reduziert und das Gesamtüberleben für HPV neg. HNSCC gesteigert werden kann. Als ein vielversprechender Ansatz wird diesbezüglich eine Strahlentherapie mit Protonen angesehen, da sie eine hohe Schonung des Normalgewebes ermöglicht.

Mit dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Wirkung Protonenstrahlen auf das Überleben von HNSCC-Zellen haben und ob dabei ein ähnlich deutlicher Unterschied zwischen HPV neg. und pos. Zellen vorliegt, wie es zuvor für Photonenbestrahlung beschrieben wurde. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Wirkung der Protonenbestrahlung durch ein Targeting von PARP weiter gesteigert werden kann. Dabei soll neben bereits bekannten Inhibitor Olaparib auch der besonders stark wirksame eingeschätzte Inhibitor Talazoparib untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten an fünf HPV neg. und fünf HPV pos. HNSCC-Linien durchgeführt werden, um damit auch die große Heterogenität dieser beiden Entitäten zu berücksichtigen.

Die folgenden Fragen sollten durch die Untersuchungen beantwortet werden:

- Reagieren HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen auf Protonenbestrahlung sensibler als auf Photonenbestrahlung?
- Zeigen HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen nach Protonenbestrahlung ähnlich große Unterschiede wie nach Photonenbestrahlung?
- Gibt es Unterschiede in der RBW zwischen HPV neg. und pos. HNSCC-Linien nach Protonenbestrahlung?

- Kann die Wirkung von Protonen durch eine PARP-Inhibition gesteigert werden?
- Unterscheiden sich die beiden PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib in ihrer Wirkung?
- Haben Olaparib und Talazoparib eine unterschiedliche Wirkung auf HPV neg. oder pos. HNSCC-Linien?

Insgesamt sollen mit diesen Untersuchungen wichtige Voraussetzungen für die klinische Anwendung von Protonen allein sowie in Kombination mit einer PARP-Inhibition bei der Therapie von HPV neg. und pos. HNSCC erarbeitet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Firma, Sitz
Bestrahlungskammern aus Plexiglas	*Hausanfertigung*	Technische Werkstädten, Abteilung Feinmechanik, Universität Marburg, FB 20, Baldingerstraße, 35032 Marburg
Casy Cell Counter	Casy® TTT 150	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Feinwaage	Scout™ Pro SPU602	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Feuchtkammern aus Stahl		Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Premium	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	HERAFreeze Basic	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Heizblock	ThermoCell CHB-202	Hangzhou Bioer Technology co. Ltd, High Tech (Binjiang)District, Hangzhou, China
Inkubatoren	HERACell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	INCO2 153	Memmert GmbH & Co. KG, Büchenbach, Deutschland
Kippschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co KG., Schwabach, Deutschland
Magnetrührer	D-6010	Neolab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kolbenhubpipetten	Reference 2-20 µl, Reference 10-100 µl, Reference 50-200 µl, Reference 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kombi-Kühlschrank	Liebherr Comfort	Liebherr-International

(4°C/-20°C)		AG, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Liebherr Mediline	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Laminar Flow / Clean Bench	Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	NuAireNU-543-600 EC	ibs | tecnomara GmbH, Fernwald, Deutschland
Mikroskope	EVOS™ XL Core	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	Fluoreszenzmikroskop DM5500 B	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
	Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
	Routine Zellkulturmikroskop CKX41	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Protonen-Bestrahlungsanlage		Marburger Ionenstrahl-Therapiezentrum (MIT), Marburg, Deutschland
Pipettierhilfen	accu-jet® pro Volt	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
	Pipetboy	INTEGRA Biosystems Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
	pipetus® 100-240	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Rotator	Intelli-Mixer	Neolab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Röntgen-Bestrahlungsanlage	X-Rad 320 iX	Precision X-Ray Inc./ Römatec
Styropor-Thermobox		
Umluft-Brutschrank	Heraeus B 15 Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vakuumpumpen	CVC 2000 ii	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vertikaler Standautoklav	V-65	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Vortex Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY,

		USA
Wärmebecken		
Zentrifugen	Biozym Color Sprout Plus Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg, Deutschland
	Heraeus Megafuge 16R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Materialien	**Größe**	**Firma**
6-Wellplatten		Greiner Bio-on GmbH, Schwerte, Deutschland
12-Wellplatten		Greiner Bio-on GmbH, Schwerte, Deutschland
CASYcups		OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Deckgläschen	15 mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Microlance™ 3 Kanülen	19 G	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Parafilm	4 in. x 125 ft. roll	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen, Kalksoda-Klarglas, Gesamtlänge 150 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-on GmbH, Schwerte, Deutschland
Safe Seal Micro Tubes	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger Superfrost® Plus		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zellkulturflaschen	T25, T75, T175	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Software

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Software

Bezeichnung	Hersteller/Entwickler	Verwendung
Fiji ImageJ	Wayne Rasband (National Institutes of Health)	Zählen von Kolonien
GraphPad Prism 8	Graphpad Software, Inc.	Graphiken, Statistik
Leica LAS X	Leica Microsystems, Life Science Softwareplattform	Bildnachbearbeitung der mikroskopierten Fluoreszenz-Bilddateien
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation	Auswertung der Daten

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
AMPUWA®	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V, pH 7.0	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
CASYblue	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
CASYclean	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
CASYton	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol absolut, vergällt mit MEK	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Kaiserstr. 221, D-66133 Saarbrücken
Fetal Bovine Serum (FBS)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Formaldehydlösung 37 %, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
MEM NEAA (100X) Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Natriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Olaparib (AZD2281, Ku-0059436)	Selleck Chemicals, Houston, TX, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Prolong Gold antifade reagent with Dapi	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Roswell-Park Memorial Institute	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA,

RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX™	USA
Talazoparib (BMN 673)	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypsin-EDTA	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	**Hersteller**
Anti-CenpF, (mouse, monoclonal, #MA1-23185)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
53BP1 Antibody NB 100-305 (rabbit, polyclonal; #NB100-305)	Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO, USA
AlexaFluorPlus 647 (goat anti-mouse IgG (H+L), #32728)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
AlexaFluor488 (donkey anti-rabbit IgG (H+L), #A-21206)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.1.5 Allgemeine Puffer und Reagenzien

Ethanol 70% – (Lagerung bei Raumtemperatur)
Ethanol absolut, vergällt 3,5 l
Vollentsalztes (VE) Wasser 1,5 l

Kristallviolett-Fixierlösung – (Lagerung bei Raumtemperatur)
0,1% Kristallviolett; 10% Formaldehyd in vollentsalztem (VE) Wasser

Fixierlösung – (Lagerung bei -20°C)
4% PFA in PBS

Physiological Buffer (PB) – (Lagerung bei +4°C)
100mM Kaliumacetat 9,8g
30mM KCl 2,24g
10mM Na2HPO4 1,42g
1mM MgCl2 1ml 1M Stock
pH auf 7,4 mit 1M KH2PO4 einstellen (13,61g add 100ml)

Blocking Solution
3% BSA in PBS

Präextraktions Puffer
0,05% Triton X in PB

DTT-Puffer
0,1% 1M DTT in PB

Wasch-Puffer
0,5% Tween-20 in PBS

Antibody Solution
1,5% BSA; 0,5% Tween-20 in PBS

2.1.6 Zellkulturmedium (Vollmedium)

Roswell's Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit GlutaMAX™	500ml
Fetales Kälberserum (FBS)	50ml
Penicillin-Streptomycin	5ml
MEM NEAA (100X) Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids	5ml

2.1.7 Zellkulturlinien

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Zellkulturlinien

Zelllinie	Alter und Geschlecht	Lokalisation	TNM	p53-Status	Quelle/ Labor
HPV neg.					
UMSCC-3	73/f	LK-Metastase	T1N0M0	mut	UM
UMSCC-6	37/m	Mundhöhle	T2N0M0	wt	UM
UMSCC-11b	65/m	Larynx	T2N2aM0	mut	UM
UTSCC-33	86/f	Mundhöhle	T2N0M0	mut	UT
FaDu	56/m	Rachen	TxNxMx	mut	UDr
HPV pos.					
UDSCC-2	58/m	Hypopharynx	T1N2M0	wt	TUM
UMSCC-47	53/m	Mundhöhle	T3N1M0	wt	UM
UMSCC-104	56/m	Mundhöhle	T4N2bM0	wt	UM
93VU-147T	58/m	Mundhöhle	T4N2M0	wt	UA
UPCI:SCC-154	54/m	Mundhöhle	T4N2M0	wt	UP

aus: (Arenz et al., 2014; Lin et al., 2007; Mandic et al., 2005; Martin et al., 2014; White et al., 2007)
f: weiblich; m: männlich; LK: Lymphknoten; mut: mutiert; wt: Wildtyp
UM: University of Michigan, USA; UT: University of Turku, Finnland; UDr: Universität Dresden, Deutschland; TUM: Technische Universität München, Deutschland; UA: University Medical Center Amsterdam, Niederlande; UP: University of Pittburgh, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die in Tab. 6 aufgelisteten Zelllinien wurden unter konstanten Konditionen im Brutschrank (37°C, 5% CO_2, 95% relative Luftfeuchtigkeit) und je nach Bedarf in T175-, T75- oder T25-Flaschen kultiviert. Für alle Zelllinien wurde dabei das gleiche Vollmedium verwendet. Um eine ideale Zellproliferation und eine hohe Stoffwechselaktivität der Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert. Für die Passagierung der Zellen und auch für die Experimente wurde eine Konfluenz des Zellrasens von 70-80% angestrebt, da sich bei dieser Konfluenz die Zellen noch in der Phase des exponentiellen Wachstums befanden. Die Zellkulturen wurden höchstens bis zur 20. Passage verwendet.

Bei den Versuchen wurde das vorgewärmte Vollmedium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit PBS (Raumtemperatur) gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurde der Zellrasen mit Trypsin/EDTA (vorgewärmt, 4 ml für T175-, 2 ml für T75- oder 1 ml für T25-Flaschen) bedeckt und für 5-10 min je nach Zelllinie im Brutschrank inkubiert. Am Lichtmikroskop wurde anschließend überprüft, ob alle Zellen vom Flaschenboden losgelöst waren, bevor die proteolytische Wirkung des Trypsin/EDTAs mit dem Zusatz von Vollmedium gestoppt wurde. Um bestehende Zellverbände zu vereinzeln, wurde die Zellsuspension mit einer serologischen Pipette auf und ab pipettiert. Da jede Zelllinie unterschiedliche Wachstums- und Stoffwechsel-Eigenschaften aufweist, wurden sie in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:12 mit Vollmedium verdünnt und anschließend in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Für die Durchführung eines Experimentes wurde die Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen bei 300 G zentrifugiert, um alle lebendigen Zellen vom Zelldetritus zu trennen. Der Überstand wurde aus dem Zentrifugenröhrchen anschließend abgesaugt und das Zellpellet erneut mit Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zelldichte mit dem Casy Cell Counter gemessen. Dazu wurden 10ml CASYton mit 10 µl Einzelzellsuspension versetzt und dreimal vom Casy Cell Counter gemessen. Mit der bekannten Zelldichte konnte für jedes Experiment eine entsprechende neue Zellsuspension berechnet, angesetzt und in T25-Flaschen bzw. 12-Wellplatten kultiviert werden.

2.2.2 Photonenbestrahlung

Die Zellkulturproben wurden in der Röntgenbestrahlungsanlage X-Rad 320 iX (320 keV Beschleunigungsspannung, 8 mA Stromstärke, 1,0 Gy/min Dosisrate, 0,5 mm Cu- und 0,5 mm Al-Filter, 60 cm Fokus-Objekt-Abstand) des strahlenbiologischen Labors der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte in T25-Flaschen bzw. in 12-Wellplatten mit Einzeldosen von 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy.

Die Kontrollproben wurden für den Zeitraum der Bestrahlung ebenfalls aus dem Brutschrank genommen, um den gleichen Luft- und Temperaturbedingungen ausgesetzt zu sein wie die bestrahlten Proben.

2.2.3 Protonenbestrahlung

Die Zellkulturproben wurden am Marburger Ionenstrahl-Therapiezentrum (MIT) mit einem horizontalen Protonenstrahl mit Energien von 49-220 MeV/u mit Einzeldose von 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy bestrahlt. Dafür wurde ein ‚*spread-out bragg-peak*' (SOBP) von 1-2 cm verwendet, in welchem die Proben mittig positioniert wurden. Die Bestrahlung erfolgte in T25 Flaschen bzw. in Parafilm-abgedichteten 12-Wellplatten, welche in

flüssigkeitsdichten Bestrahlungskammern aus Plexiglas eingefasst wurden. Die Bestrahlungskammern wurden dann aufrecht auf dem Bestrahlungstisch aufgestellt und mithilfe eines Laser-Rasters in einem 18x18 cm^2 Bestrahlungsfeld vor dem Protonenstrahl positioniert.

Die Kontrollproben wurden für den Zeitraum der Bestrahlung ebenfalls aus dem Brutschrank genommen und in Thermoboxen ins MIT transportiert, um den gleichen Luft- und Temperaturbedingungen ausgesetzt zu sein wie die bestrahlten Proben.

2.2.4 Behandlung der Zellen

Olaparib: Vor Beginn der Experimente wurde der PARP-Inhibitor Olaparib (AZD2281, Ku-0059436, Selleckchem, 10 mg, Pulverform) nach Angaben des Herstellers in DMSO gelöst und eine 10 mM Stammsuspension hergestellt. Die Stammsuspension wurde in Micro Tubes aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die Experimente wurde aus der Stammsuspension und Vollmedium eine frische 1 µM Arbeitssuspension hergestellt. Das Zellkulturmedium wurde nach der anfänglichen Inkubationszeit aus den T25-Zellkulturflasche bzw. den 12-Wellplatten abgesaugt und durch 4 ml Arbeitssuspension pro Flasche bzw. 500 µl Arbeitssuspension pro Well ersetzt. Nach 1h Inkubationszeit des PARP-Inhibitors Olaparib erfolgte die Bestrahlung.

Talazoparib: Vor Beginn der Experimente wurde der PARP-Inhibitor Talazoparib (BMN 673, Item No 19782, Cayman chemicals, 1 mg, Pulverform) nach Angaben des Herstellers in DMSO gelöst und eine 1 mM Stammsuspension hergestellt. Die Stammsuspension wurde in Micro Tubes aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die Experimente wurde aus der Stammsuspension und Vollmedium eine frische 1 µM Arbeitssuspension hergestellt. Das Zellkulturmedium wurde nach der anfänglichen Inkubationszeit aus den T25-Zellkulturflasche bzw. den 12-Wellplatten abgesaugt und durch 4 ml Arbeitssuspension pro Flasche bzw. 500 µl Arbeitssuspension pro Well ersetzt. Nach 1h Inkubationszeit des PARP-Inhibitors Talazoparib erfolgte die Bestrahlung.

Kontrolle: Für die Kontrollproben wurde eine Arbeitssuspension aus DMSO und Vollmedium hergestellt, wobei die Zusammensetzung den gleichen Volumina der oben beschriebenen Arbeitssuspension von Talazoparib entsprach. Dadurch wurden die Kontrollproben der gleichen Menge zytotoxischen DMSO ausgesetzt und bei der Auswertung der Kolonien bzw. der Zellkerne konnte gezielt der Einfluss der PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib betrachtet werden.

Im Falle einer alleinigen Bestrahlung wurden die Zellen 24 h inkubiert und anschließend mit Photonen oder mit Protonen bestrahlt. Bei einer Kombinations-behandlung mit PARP-Inhibitoren wurden die Zellen erst 23 h inkubiert, dann mit den

PARP-Inhibitoren behandelt und nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit schließlich bestrahlt. Diese 24 h Inkubationszeit ermöglichten es den neu ausgesäten Zellen, zu adherieren und mit ihrem Zellzyklus fortzuschreiten. Im Anschluss an die Bestrahlung bzw. kombinierte Behandlung wurden die Wellplatten weitere 24 h inkubiert.

2.2.5 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest (CFA) basiert auf der Fähigkeit einzelner Zellen, Kolonien durch unbegrenzte Zellteilung zu bilden und ist der Goldstandard zur Ermittlung des klonogenen Überlebens (Puck et al., 1965).

Die Zelllinien wurden wie oben (*2.2.1)* beschrieben kultiviert und passagiert. Anschließend wurde eine Zellsuspension mit gewünschter Zellanzahl hergestellt und in T25 Flaschen ausgesät (vgl. Tab. 7). Im Falle der alleinigen Bestrahlung wurden die Zellen 48 h inkubiert und anschließend mit Photonen oder mit Protonen bestrahlt. Bei einer Kombinationsbehandlung mit PARP-Inhibitoren, wurden die Zellen erst 47 h inkubiert, dann mit den PARP-Inhibitoren behandelt und nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit schließlich bestrahlt. Diese 48 h Inkubationszeit ermöglichten es den neu ausgesäten Zellen, zu adherieren und mit ihrem Zellzyklus fortzuschreiten.

Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die T25 Flaschen für weitere 24 h inkubiert (delayed plating). Die Zellen wurden anschließend wieder in Einzelzellsuspension gebracht, die Zelldichte gemessen und für den Koloniebildungstest in 6-Wellplatten ausplattiert (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Aussaat der Zellen für den Koloniebildungstest

Zelllinie	**Zellzahl/Well**			
	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
UMSCC-3	400			2000
UMSCC-6 *	300 / 500	500 / 1000	1000 / 2000	2000 /4000
UMSCC-11b	150			2000
UTSCC-33	600			1500
FaDu	150			3000
UDSCC-2	500			12000
UMSCC-47	500			8000
UMSCC-104	500			6000
93VU-147T	400			4000
UPCI:SCC-154 *	800 / 1000	1500 / 3000	8000 / 16000	20000 / 40000

*1. Zellzahl/Well für Experimente ohne vorherige Behandlung oder bei Behandlung mit DMSO bzw. Olaparib /
2. Zellzahl/Well bei Behandlung mit Talazoparib

Je nach Zelllinie erfolgte für den Kolonietest eine Inkubation der 6-Wellplatten für 8 – 24 Tage. Dabei wurde die Koloniebildung und das Größenwachstum der Kolonien alle paar Tage unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Als Kolonie wurden hierbei Zellverbände ab 50 Zellen gewertet.

Sobald die Kolonien gut von allen einzelnen Zellen oder Mikrokolonien abgrenzbar waren, wurde das restliche Vollmedium mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und die Wellplatten wurden mit PBS gewaschen. Die Kolonien wurden dann für 30 min mit einer Kristallviolett-Fixierlösung bedeckt, wodurch die Zellen eine rosa-violette Färbung erhalten. Mittels Formaldehyds wurden die Zellen fixierte. Der Überstand der Kristallviolett-Fixierlösung wurde mit einer serologischen Pipette abgesaugt, die 6-Wellplatten in einem VE-Wasserbad gewaschen und schließlich zum Trocknen an der Luft aufgestellt.

Mithilfe des Olympus IX81-Fluoreszenzmikroskop konnten die 6-Wellplatten bei 2,5-facher Vergrößerung eingescannt werden. Die Markierung und Auszählung der Kolonien wurden mit der Software Fiji Image J durchgeführt, während die Dokumentation und Auswertung der Ergebnisse in Excel erfolgten. Der Wert der Angehrate (Plating efficiency, PE) beschreibt die Anzahl an Kolonien, welche aus den vorher definierten und ausplattierten Zellen pro Well gewachsen sind. Das Zellüberleben (Survival fraction, SF) beschreibt die Anzahl an Kolonien, welche aus behandelten Zellen gewachsen sind und ist genormt auf die PE der unbehandelten Zellen.

Zur Auswertung der Daten erfolgte eine Kurvenanpassung mittels der linear-quadratischen Gleichung

$$SF(D) = \exp (- \alpha \times D - \beta \times D^2).$$

Dabei ist D die Dosis und SF(D) das Zellüberleben bei dieser Bestrahlungsdosis.

2.2.6 53BP1/CenpF-Immunfluoreszenz

Der Nachweis der DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erfolgte durch den 53BP1-Fociassay. Mit Hilfe dieses Assays können die Reparaturkomplexe nachgewiesen werden, die sich nach der Erzeugung eines DSB bilden. Zur Bestimmung der jeweiligen Zellzyklusphase wurde dieser Assay mit einer Färbung des Zentromerproteins F (CenpF) kombiniert. CenpF ist in der G2-Phase Teil der Kernmatrix und an der Vorbereitung der Chromosomensegregation beteiligt. Die Expression CenpF startet in der S-Phase und erreicht in der G2-Phase ihr Maximum. Durch diese Zellzyklus-abhängige Expression kann bei Immunfärbung gut zwischen G1-Phase-Zellen (kein CenpF Signal, CenpF -), S-Phase-Zellen (schwaches CenpF-Signal, CenpF +) und G2-Zellen (starkes CenpF-Signal, CenpF ++) unterschieden werden.

Zur Vorbereitung wurden unter sterilen Bedingungen in jedes Well ein Deckgläschen gelegt. Die Zelllinien wurden wie oben (*2.2.1 Zellkultur*) beschrieben kultiviert und passagiert. Anschließend wurde eine Zellsuspension mit gewünschter Zelldichte hergestellt und jeweils 1 ml auf die Deckgläschen in den 12-Wellplatten ausgesät (vgl.

Tab. 8). Damit die Zellen nur auf der Oberseite der Deckgläschen adherieren, wurden die Deckgläschen mit einer frischen Pipettenspitze an den Wellboden angedrückt. Im Falle der alleinigen Bestrahlung wurden die Zellen 24 h inkubiert und anschließend mit Photonen oder mit Protonen bestrahlt. Bei einer Kombinationsbehandlung mit PARP-Inhibitoren, wurden die Zellen erst 23 h inkubiert, dann mit den PARP-Inhibitoren behandelt und nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit schließlich bestrahlt. Diese 24 h Inkubationszeit ermöglichten es den neu ausgesäten Zellen, zu adherieren und mit ihrem Zellzyklus fortzuschreiten.

Tab. 8: Aussaat der Zellen für die 53BP1/CenpF-Immunfluoreszenz-Färbung

Zelllinie	**Zellzahl/Well**	
	0 Gy	2 Gy
UMSCC-6 *	60 000 / 80 000	60 000 / 80 000
UPCI:SCC-154	110 000	110 000

*1. Zellzahl/Well für Experimente ohne vorherige Behandlung oder bei Behandlung mit DMSO bzw. Olaparib /
2. Zellzahl/Well bei Behandlung mit Talazoparib

Die Wellplatten wurden danach auf Eis gestellt und das Vollmedium abgesaugt. Nach einmaligem Waschen des Zellrasens mit je 1 ml/Well PBS, wurden die Zellen für 5 min mit 1 ml/Well DTT-Puffer behandelt. Im Anschluss wurde der DTT-Puffer entfernt und durch 1 ml/Well Präextraktions Puffer ersetzt. Nach weiteren 5 min erfolgte eine zweite Behandlung mit DTT-Puffer. Unter dem Abzug wurden die Zellen mit 300 µl/Well PFA für 10 min bedeckt. Nach dem Absaugend es PFA wurden die Zellen dreimal mit 1 ml/Well PBS gewaschen und dabei auf einen Kippschüttler gestellt.

Im nächsten Schritt erfolgte das Blocking der Zellen mit 1 ml/Well Blocking Solution. Diese erste Runde Blocking Solution wurde nach 3 min durch frische Blocking Solution ersetzt und dann zur Inkubation über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Für den Färbeprozess wurden lichtdichte Feuchtkammern vorbereitet und mit feuchten Tüchern und beschriftetem Parafilm ausgelegt. Die primären Antikörper Anti-CenpF (monoklonal, mouse) und Anti-53-BP1 (polyclonal, rabbit) wurden im Verhältnis 1:750 bzw. 1:500 in der Antibody Solution verdünnt, während die sekundären Antikörper AlexaFluorPlus647 (goat anti-mouse IgG) und AlexaFluor488 (donkey anti-rabbit IgG) beide im Verhältnis 1:1000 in der Antibody Solution verdünnt wurden. Auf den Parafilm wurden in Tropfen jeweils 50 µl der primären Antikörper-Lösung pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit dem Zellrasen nach unten in die Tropfen gelegt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit dem Zellrasen nach oben wieder in die 12-Wellplatten gelegt und dreimal für 5 min mit jeweils 1 ml/Well Wasch-Puffer gewaschen. Nach Entfernung der primären Antikörper-Tropfen von der Oberfläche des Parafilm erfolgt die Behandlung der Deckgläschen mit der

sekundären Antikörper-Lösung nach dem gleichen Schema wie bereits beschrieben, jedoch geschützt vor Licht, um die Fluoreszenz der sekundären Antikörper zu schützen. Die Objektträger werden in der Zwischenzeit beschriftet und jeweils 8 µl Prolong Gold antifade reagent mit Dapi aufgetropft. Die gewaschenen Deckgläschen werden mit dem Zellrasen nach unten in die Tropfen gelegt und leicht angedrückt, um Luftblasen auszuschließen. Bis zur Auswertung mit dem wurden die fertigen Objektträger lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Mit dem Leica Fluoreszenzmikroskop DM5500 B wurden von allen Entitäten Aufnahmen der gefärbten Zellkerne angefertigt. Es wurden mindestens 100 Zellkerne pro Entität auf mindestens zwei unterschiedlichen Bildausschnitten angestrebt. Das blaue Dapi Signal markierte die Zellkerne, das pinke Fluoreszenzsignal markierte die primären CenpF-Antikörper und das grüne Fluoreszenzsignal die 53BP1-Antikörper. Zur Kontrastierung des Farbsignals wurden die Bilder mit dem Leica LAS X Programm nachbearbeitet.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Dokumentation und Auswertung der Experimente erfolgten in Excel. Dazu zählten die Berechnung des arithmetischen Mittelwerts, der Standardabweichung und des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM).

Die weitere statistische Auswertung und Erstellung von Graphiken erfolgten in Graph Pad Prism. Als statistisch signifikant gelten Unterschiede der Daten mit einem p-Wert von $<0,05$ (in einer Graphik mit $*$ gekennzeichnet), während Daten mit einem p-Wert von $<0,01$ als hoch signifikant gelten (mit $**$ gekennzeichnet); nicht signifikante Unterschiede ($p>0,05$) werden mit ‚ns' gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Strahlenempfindlichkeit nach Photonenbestrahlung

Das erste Ziel der Arbeit war es, den Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit der HPV neg. und HPV pos. Zelllinien nach Photonenbestrahlung zu bestätigen. Diese Untersuchungen wurden mit fünf HPV neg. und fünf HPV pos. HNSCC-Zelllinien durchgeführt, wobei das Zellüberleben mittels Koloniebildungstest (Abb. 5A) bestimmt wurde. Abb. 5B zeigt das Zellüberleben der HPV neg. Linie UMSCC-6 im Vergleich zum Überleben der HPV pos. Linie UPCI:SCC-154 nach einer Photonenbestrahlung mit Dosen bis zu 6 Gy. Für die HPV pos. Zellen wird eine deutlich höhere Strahlenempfindlichkeit beobachtet. Abb. 5C zeigt das Zellüberleben aller 10 Linien für eine Röntgendosis von 6 Gy. Die HPV pos. Zelllinien haben dabei im Mittel mit einem

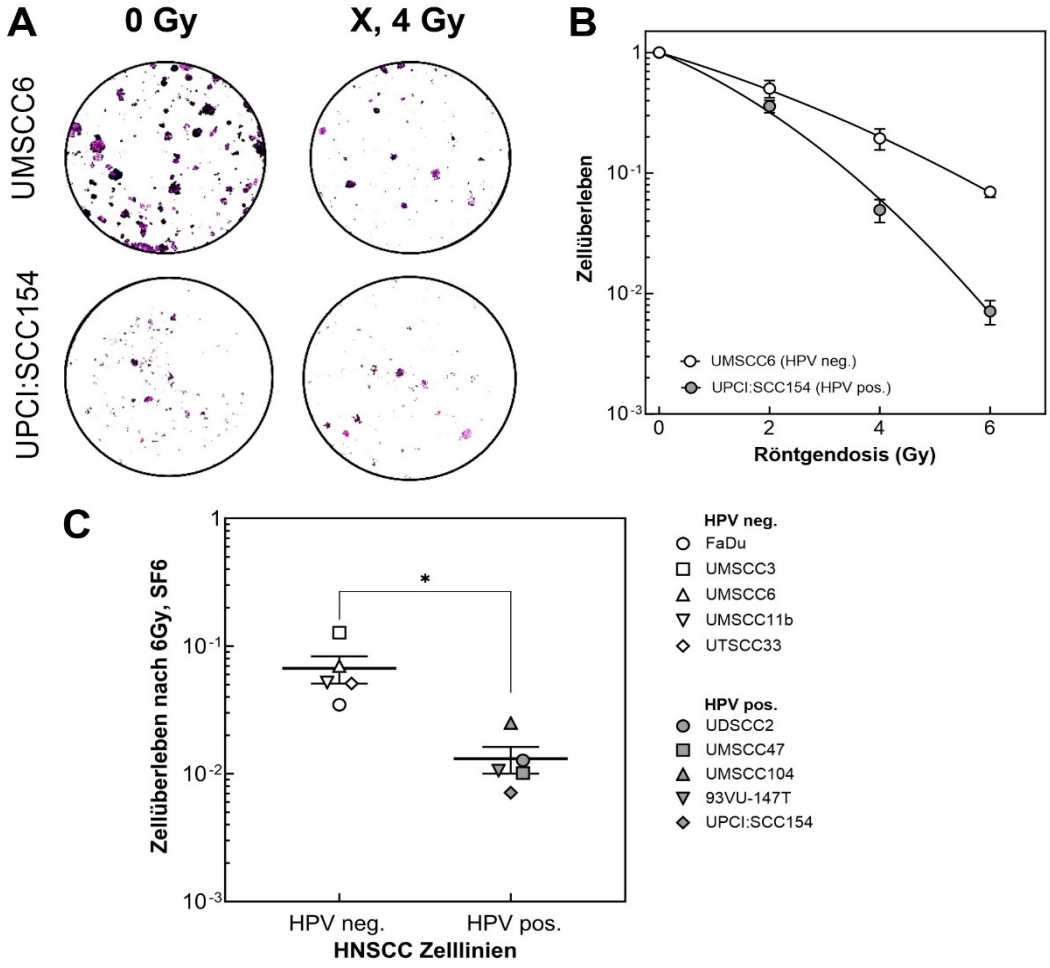

***Abb. 5**: Photonenempfindlichkeit von HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen*

Bestrahlung von HPV neg. und pos. Zelllinien mit einer Dosis von bis zu 6 Gy und anschließender Bestimmung des Zellüberlebens mittels Koloniebildungstest. A) Nachweis des Zellüberlebens mittels Koloniebildungstest. B) Wirkung der Photonenbestrahlung auf das Zellüberleben der HPV neg. Linie UMSCC-6 sowie der HPV pos. Linie UPCI:SCC-154. C) Zellüberleben nach Bestrahlung mit 6 Gy für alle getesteten HNSCC-Zelllinien, Vergleich mittels t-Test. *Abgebildet ist der arithmetische Mittelwert ± SEM, n ≥ 3, ** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant.*

Zellüberleben von SF_6=0.013±0.003 eine signifikant höhere Strahlenempfindlichkeit als die HPV neg. Zelllinien mit einem mittleren Zellüberleben von SF_6=0.067±0.016 (P=0.011).

Diese Ergebnisse bestätigten den bereits bekannten Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit zwischen HPV neg. und HPV pos. HNSCC nach Photonenbestrahlung, wie er bereits mehrfach in anderen Publikationen beschrieben wurde (Arenz et al., 2014; Lerch et al., 2020).

3.2 Strahlenempfindlichkeit nach Protonenbestrahlung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die HNSCC-Zellen bei einer Bestrahlung mit Protonen eine ähnliche Strahlensensibilität zeigen, wie nach der Bestrahlung mit

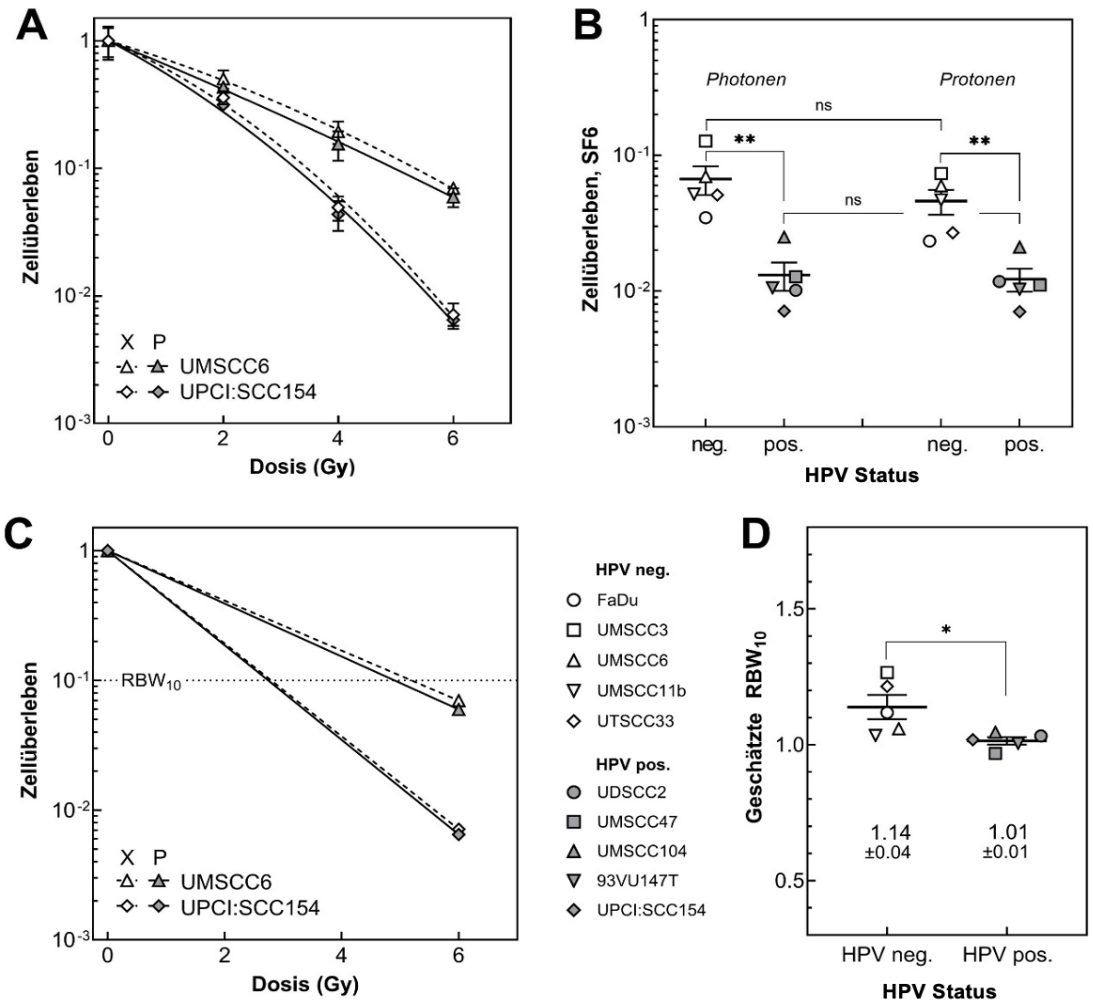

***Abb. 6**: Vergleich der Photonen- und Protonenempfindlichkeit*

Bestrahlung von HPV neg. und pos. Zelllinien mit Photonen bzw. Protonen mit Dosen bis zu 6 Gy und anschließender Bestimmung des Zellüberlebens mittels Koloniebildungstest. A) Wirkung der Photonen- bzw. Protonenbestrahlung auf das Zellüberleben der HPV neg. Linie UMSCC-6 sowie der HPV pos. Linie UPCI:SCC-154. B) Zellüberleben nach Bestrahlung mit 6 Gy (SF_6) Photonen bzw. Protonen für alle getesteten HPV neg. und pos. HNSCC-Zelllinien. C) Berechnung der RBW bei der Überlebensrate von 10% mittels der SF_6. D) Vergleich der RBW für HPV neg. und pos. Zellen. Vergleich mittels t-Test. *Abgebildet ist der arithmetische Mittelwert ± SEM, n ≥ 3, ** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant.*

Photonen und ob es auch hier wieder einen signifikanten Unterschied des Zellüberlebens zwischen HPV neg. und pos. Zelllinien gibt.

Abb. 6A zeigt das Zellüberleben der HPV neg. Linie UMSCC-6 sowie der HPV pos. Linie UPCI:SCC-154 sowohl nach Bestrahlung mit Protonen als auch Photonen mit jeweils Dosen bis zu 6 Gy. Für beide Linien zeigen sich nur geringe Unterschiede mit im Mittel einem etwas geringeren Zellüberleben nach Bestrahlung mit Protonen.

Abb. 6B zeigt für alle Linien das Zellüberleben nach Photonen bzw. Protonen für eine Dosis mit 6 Gy, SF_6. Es ist deutlich zu erkennen, dass auch für Protonen ein ähnlich deutlicher Unterschied zwischen HPV neg. und pos. Zellen vorliegt, wie zuvor für Photonen beschrieben. Mit im Mittel einer Überlebensrate von SF_6=0.012±0.002 wird für HPV pos. Zellen wiederum ein hoch signifikant niedrigeres Zellüberleben gefunden als für die HPV neg. Zelllinien mit SF_6=0.046±0.010 (P=0.009). Vergleicht man für die beiden Gruppen jeweils das Zellüberleben nach den unterschiedlichen Strahlenarten, so wird für die HPV neg. Zellen mit SF_6=0.046±0.010 nach Protonen ein etwas geringerer Wert als nach Photonen mit SF_6=0.067±0.016 gemessen, was aber mit P=0.297 nicht signifikant ist. Für die HPV pos. Zellen werden mit SF_6=0.012±0.002 nach Protonen und SF_6=0.013±0.003 nach Photonen nahezu identische Werte (P=0.828) gefunden.

Mittels der Überlebensraten nach 6 Gy, SF_6, wurde für alle Zelllinien die Dosis abgeschätzt, bei der jeweils eine Überlebensrate von 10% vorliegt (Abb. 6C). Anhand dieser Werte wurde für die Protonen gemäß der Gleichung

$$RBW_{10} = \frac{D_{10}\,(X)}{D_{10}\,(P)}$$

die relative biologische Wirkung (RBW_{10}) berechnet. Abb. 6D zeigt die so abgeschätzten Werte. Für die HPV neg. Zelllinien lag die RBW_{10} im Mittel bei 1.14±0.01 und für die HPV pos. Zelllinien bei RBW_{10}=1.01±0.01. Damit zeigt sich, dass bei den HPV neg. Zellen die Protonen eine etwas stärkere (P=0.016) Abnahme des Zellüberlebens bewirken als Photonen, nicht jedoch bei den HPV pos. Zellen.

3.3 Steigerung der Strahlenempfindlichkeit durch PARP-Inhibitoren

Es sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung mit PARP-Inhibitoren einen strahlensensibilisierenden Einfluss auf die HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen bei Protonenbestrahlung hat und ob es dabei einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Entitäten gibt. Grundlage für diesen Ansatz war eine Arbeit von Ziemann et al. (2017), in welcher ein Defekt in der Homologen Rekombination (HR) bei den HPV pos.

HNSCC-Zellen durch das Ausbleiben des Rad51-Signals nach Bestrahlung mit Photonen nachgewiesen werden konnte. Aufgrund dieses Defekts zeigten die HPV pos. Linien bei einer Inhibition von PARP mittels Olaparib eine signifikant stärkere Strahlensensibilisierung als die HPV neg. Zellen.

Zur Unterdrückung von PARP wurden in dieser Arbeit sowohl Olaparib als auch Talazoparib verwendet. Die Zellen wurden jeweils mit 1 µM inkubiert und dann nach

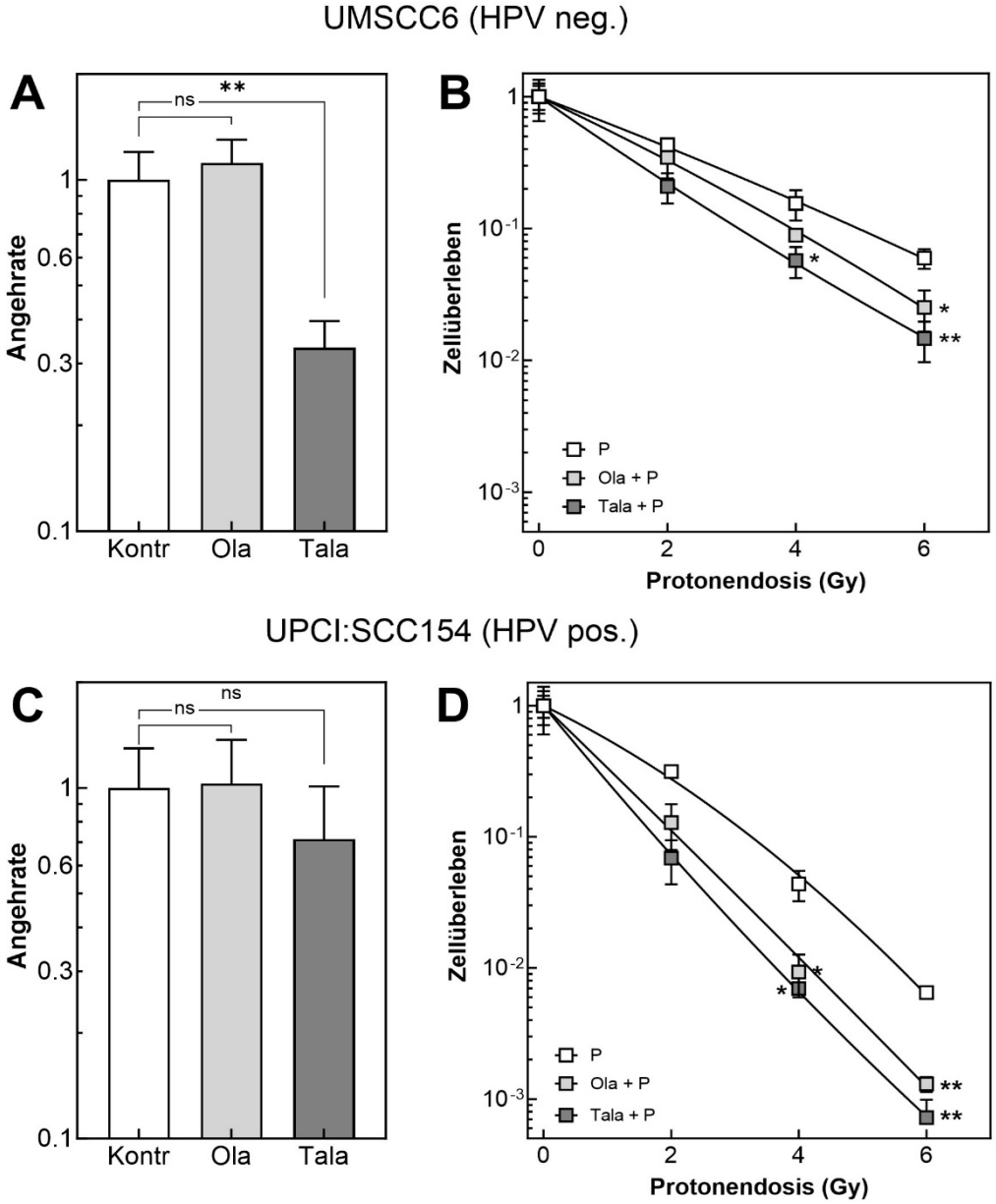

***Abb. 7**: Wirkung einer PARP-Inhibition auf die Protonenstrahlenempfindlichkeit*

Behandlung von HPV neg. und pos. Zelllinien mit 1 µM Olaparib bzw. 1 µM Talazoparib vor einer Bestrahlung mit Protonen mit Dosen bis zu 6 Gy; Bestimmung des Zellüberlebens mittels Koloniebildungstest. A+C) Wirkung der PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib auf die Angehrate (PE) der HPV neg. Linie UMSCC-6 sowie der HPV pos. Linie UPCI:SCC-154. B+D) Wirkung der PARP-Inhibitoren bei Kombination mit Protonenbestrahlung auf das Zellüberleben (SF) der HPV neg. Linie UMSCC-6 sowie der HPV pos. Linie UPCI:SCC-154. Vergleiche mittels t-Test. *Abgebildet ist der arithmetische Mittelwert ± SEM, n ≥ 3, ** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant.*

einer Stunde mit bis zu 6 Gy Protonen bestrahlt und nach weiteren 24 h Inkubationszeit das Zellüberleben mittels Koloniebildungstest bestimmt.

Abb. 7A+C zeigen die Angehraten (PE) der HPV neg. Zelllinie UMSCC-6 und der HPV pos. Zelllinie UPCI:SCC-154 allein nach der PARP-Inhibition durch Olaparib bzw. durch Talazoparib. Beide Zelllinien reagieren nach Talazoparib mit einer verminderten Koloniebildung. Für die HPV neg. Linie UMSCC-6 wird dabei mit PE=0,33 eine signifikant stärkere Abnahme der PE gefunden als für die HPV pos. Linie UPCI:SCC-154 mit einer Abnahme auf PE=0,71. Bei Behandlung mit Olaparib zeigt sich für keine der beiden Zelllinien eine signifikante Abnahme (UMSCC-6: PE=1,12; UPCI:SCC-154: PE=1,03).

Bei Kombination der PARP-Inhibitoren mit einer Protonenbestrahlung wird für beide Zelllinien eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit beobachtet (Abb. 7B+D). Mit steigender Dosis wird dabei der Unterschied im Zellüberleben zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen stetig größer mit signifikanten Unterschieden ab einer Dosis von 4 Gy. Auch hier zeigt der PARP-Inhibitor Talazoparib für alle applizierten Dosen einen stärkeren Effekt auf das Zellüberleben als der PARP-Inhibitor Olaparib.

Um für beide Zelllinien den strahlensensibilisierenden Effekt der PARP-Inhibitoren (PARPi) zu quantifizieren, wurde mittels eines linear-quadratischen Kurvenanpassung jeweils die Dosis, D_{10}, ermittelt, bei der eine Überlebensrate von 10% vorliegt (Tab. 9) und daraus der Dosisverstärkungsfaktor (DEF) nach der Gleichung

$$DEF = \frac{D_{10}\,(P)}{D_{10}\,(PARPi+P)}$$

berechnet.

Tab. 9: Strahlensensibilisierung durch PARP-Inhibition

	UMSCC-6			**UPCI:SCC-154**		
Behandlung	P	Ola + P	Tala + P	P	Ola + P	Tala + P
D_{10} (Gy) [1]	4,97	3,94	3,11	3,17	2,10	1,75
DEF [2]	1	1,26	1,60	1	1,51	1,81

*1. Dosis der Protonenstrahlung bei der Überlebensrate von 10%.
2. Dosisverstärkungsfaktor (DEF)

Für Talazoparib wird jeweils ein deutlich höherer Verstärkungsfaktor als für Olaparib gefunden, der jeweils für die HPV pos. Linie UPCI:SCC-154 höher ist als für die HPV neg. Linie UMSCC-6. Damit deuten diese Daten an, dass bei Bestrahlung mit Protonen eine PARP-Inhibition bei HPV pos. Zellen eine stärkere Sensibilisierung bewirkt als für HPV neg. Zellen.

3.4 Replikationsstress durch PARP-Inhibitoren

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine PARP-Inhibition auf die DNA und die DNA-Reparaturkapazität der HPV neg. und pos. HNSCC hat.

Dafür wurden HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen wie im vorherigen Versuch mit 1 µM Olaparib bzw. 1 µM Talazoparib behandelt, nach 24 h Inkubationszeit fixiert und DNA-Schäden mittels Immunfluoreszenz und Nachweis des DNA-Reparaturproteins 53BP1 bestimmt. Zur Unterscheidung der Zellzyklusphasen wurde zudem der Zellzyklusmarker CenpF genutzt. Dieser markiert das Zentromerprotein F, welches am stärksten in der G2-Phase exprimiert wird und auch zu einem geringeren Umfang in der S-Phase auftreten kann. G1-Phase-Zellen sowie Mitose-Zellen haben dagegen keine CenpF-Markierung. Abb. 8A zeigt UMSCC-6-Zellen nach Behandlung mit Talazoparib. Anhand der CenpF-Markierung kann gut zwischen G1-, sowie S- und G2-Phase-Zellen unterschieden werden.

In den beiden G1-Phase-Zellen ist jeweils ein deutlich markierter, lokal konzentrierter 53BP1-Foci sichtbar. Solch ein Foci bildet sich, wenn in der Zelle ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB) vorliegt. Außerdem ist in einigen Zellen ein diffuses, gesprenkeltes 53BP1-Signal zu erkennen. Dies ist ein Indiz für die Unterbrechung der DNA-Synthese in den zahlreichen Replikationsgabeln, an die sich dann 53BP1 ansiedelt. Dieses gesprenkelte 53BP1-Signal ist somit ein Hinweis darauf, dass in der Zelle ein sogenannter Replikationsstress (RS) vorliegt.

Bei Auswertung des 53BP1-Signals zeigt sich, dass in unbehandelten Zellen nur äußerst selten ein RS vorliegt (Abb. 8B+E). Erst bei Behandlung mit den PARP-Inhibitoren wird ein RS beobachtet, wobei hier Talazoparib einen etwa 2–3-mal stärkeren Effekt auf die Zellen hat als Olaparib. Insbesondere bei der HPV neg. Linie UMSCC-6 tritt nach PARP-Inhibition gehäuft RS auf. Nach Behandlung mit Olaparib wird in ca. 5% der Zellen ein RS und nach Behandlung mit Talazoparib sogar in 14% ein signifikanter Anstieg des RS beobachtet. Im Gegensatz dazu wird für die HPV pos. Zelllinie nur wenig RS beobachtet mit 0,5% nach Olaparib und 1,8% nach Talazoparib.

In Abb. 8C und F ist dargestellt, in welcher Zellzyklusphase sich die Zellen befanden, in denen nach Talazoparib-Behandlung ein RS nachgewiesen wurde. Hier zeigt sich, dass eindeutig der größte Anteil der Zellen mit RS sich in der S-Phase befanden, deutlich weniger in der G2-Phase und so gut wie keine Zellen in der G1-Phase sind. Diese Verteilung bestätigt, dass durch das gesprenkelte 53BP1-Signal tatsächlich ein DNA-

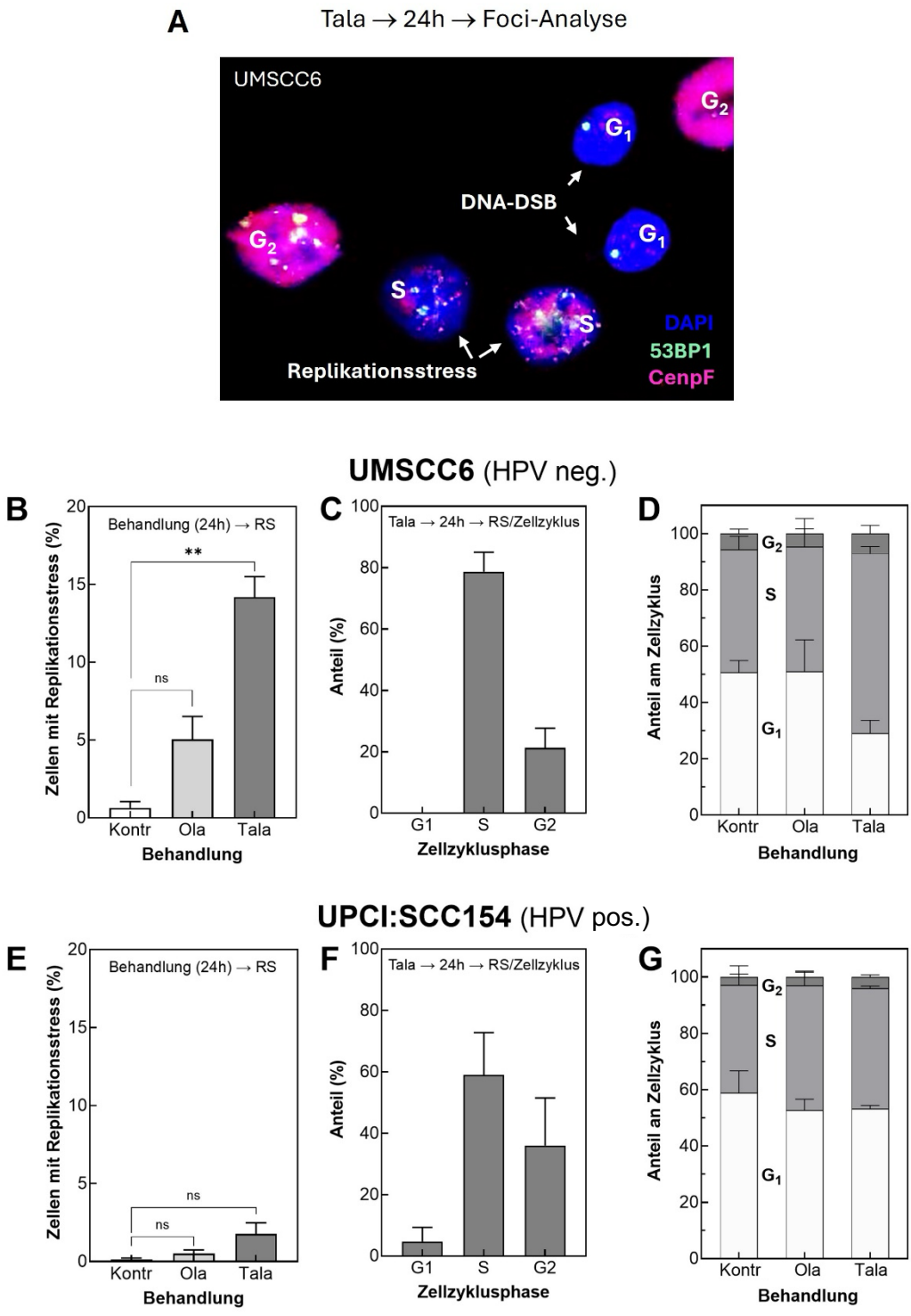

***Abb. 8**: Replikationsstress durch PARP-Inhibition*

HPV neg. Zellen UMSCC-6 sowie HPV pos. Zellen UPCI:SCC-154 wurden mit je 1 µM Olaparib bzw. 1 µM Talazoparib für 24 h inkubiert. A) Nachweis der DNA-Schäden durch immunhistochemische Färbung der 53BP1-Foci sowie Bestimmung der Zellzyklusphase mittels CenpF-Färbung; G1-Phase-Zellen: kein CenpF-Signal; S-Phase-Zellen: schwaches CenpF-Signal; G2-Phase-Zellen: starkes CenpF-Signal. Identifikation von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) anhand markanter 53BP1-Foci und Nachweis von gestörter Replikation (Replikationsstress, RS) anhand versprenkelter 53BP1-Foci. B+E) Anteil an Zellen, die nach Behandlung RS aufwiesen. C+F) Anteil der Zellzyklusphasen bei den mit Talazoparib behandelten Zellen mit RS. D+G) Anteil der Zellzyklusphasen in Abhängigkeit der Behandlung bei Nachweis mittels der CenpF-Färbung. Vergleiche mittels t-Test. *Abgebildet ist der arithmetische Mittelwert ± SEM, n ≥ 3, ** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant.*

RS nachgewiesen wird. Dass scheinbar auch in G2-Phase-Zellen RS nachgewiesen wird, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die CenpF-Expression nicht durch das Auftreten eines RS gestoppt wird und so späte S-Phase-Zellen eine ähnlich starke CenpF-Expression erreichen, wie sie ansonsten für G2-Phase-Zellen beobachtet wird und diese Zellen daher aufgrund ihrer CenpF-Expression irrtümlich als G2-Phase-Zellen detektiert wurden.

Für die UPCI:SCC-154 (Abb. 8F) ist im Prinzip eine ähnliche Verteilung zu erkennen wie für die UMSCC-6. Da unter den UPCI:SCC-154-Zellen jedoch insgesamt weniger Zellen RS aufwiesen (Abb. 8E), konnten für die Verteilung der RS-Zellen auf den Zellzyklus deutlich weniger Zellen ausgewertet werden. Es ist anzunehmen, dass bei einer höheren Zahl an Zellen sich die Verteilung der UPCI:SCC-154 der Verteilung angenähert hätte, wie sie bei den UMSCC-6-Zellen vorliegt.

Anhand der CenpF-Färbung wurde zudem bestimmt, welche Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit von der Behandlung jeweils vorliegt (Abb. 8D+G). Bei Behandlung mit Olaparib lag sowohl für die HPV neg. Linie UMSCC-6 als auch für die HPV pos. Linie UPCI:SCC-154 die gleiche Verteilung vor wie für unbehandelte Zellen. Etwas mehr als die Hälfte der Zellen befinden sich in der G1-Phase, ca. 40-45% in der S-Phase und ca. 3-6% in der G2-Phase. Für die UMSCC-6- aber nicht für die UPCI:SCC-154-Zellen zeigt sich dagegen nach Behandlung mit Talazoparib eine deutliche Abweichung von dieser Verteilung mit einem Anstieg in der S-Phase auf ca. 64% und Abnahme der G1-Phase auf 29% (Abb. 8D). Diese Daten zeigen, dass Talazoparib bei den UMSCC-6-Zellen durch die Induktion des RS eine Arretierung in der S-Phase bewirkt. Bei der HPV pos. Linie UPCI:SCC-154 führt die Talazoparib-Behandlung dagegen nur selten zu RS, weshalb auch kein signifikanter Anstieg in der S-Phase beobachtet wird.

3.5 Residuale Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung

Mithilfe des 53BP1-Fociassays wurde in den Zellen ebenfalls die Zahl der nach Bestrahlung residualen DSB nachgewiesen, um damit den Einfluss der PARP-Inhibition auf die DSB-Reparaturfähigkeit der Zellen zu bestimmen. Die HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen wurden dafür mit 2 Gy Photonen bzw. Protonen bestrahlt und nach 24h die Zahl der verbleibenden 53BP1-Foci bestimmt (Abb. 8A). Die Auswertung erfolgte dabei nur für G1-Phase-Zellen, wie sie anhand der CenpF-Färbung identifiziert werden konnten. Zellen in der G1-Phase haben einen einfachen Chromosomensatz, so dass die DNA-Schäden aller G1-Phase-Zellen direkt miteinander verglichen werden konnten.

In Abb. 9 ist immer paarweise die Anzahl der 53BP1-Foci für die Bestrahlung mit Photonen bzw. Protonen dargestellt. Ohne Behandlung liegt bei beiden Linien im Mittel

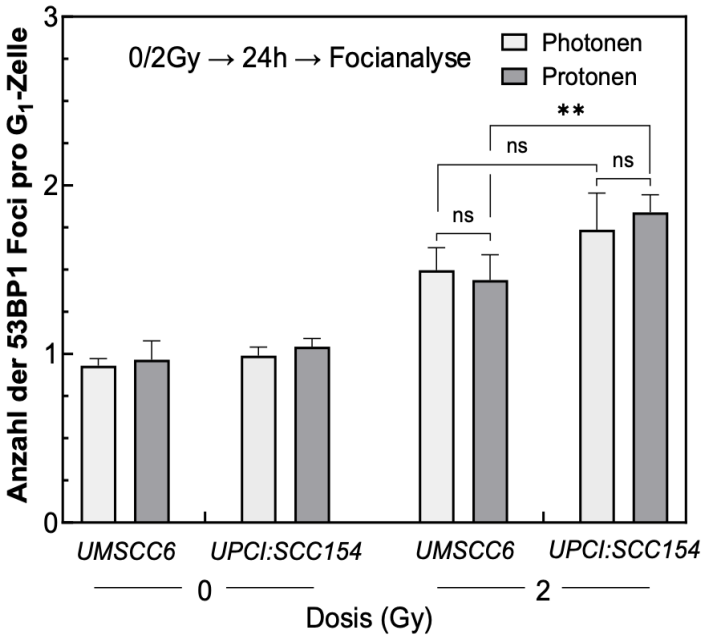

***Abb. 9**: Residuale DSB bei Bestrahlung mit Photonen und Protonen*

HPV neg. UMSCC-6-Zellen und HPV pos. UPCI:SCC-154-Zellen wurden mit 2 Gy Photonen bzw. Protonen bestrahlt. Nach einer Inkubation von 24 h wurde die Anzahl der residualen DSB in der G1-Phase-Zellen mittels immunhistochemischer Färbung der 53BP1-Foci bestimmt. *Abgebildet ist der arithmetische Mittelwert ± SEM, n ≥ 3, ** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant.*

ca. ein 53BP1-Foci pro Zelle vor. Bei Bestrahlung nimmt dieser Wert zu. Dabei zeigt sich kein Unterschied für die beiden Bestrahlungsarten. Im Mittel scheint der Anstieg der residualen DSB bei den UPCI:SCC-154 etwas stärker zu sein als bei den UMSCC-6-Zellen, wobei aber nur für die Bestrahlung mit Protonen ein signifikanter Unterschied nachzuweisen ist. Diese Daten zeigen damit, dass bezüglich der Zahl der residualen DSB kein erkennbarer Unterschied zwischen Photonen und Protonen vorliegt, diese aber in den HPV pos. Zellen im Mittel etwas höher sind als in den HPV neg. Zellen.

3.6 Residuale Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung und PARP-Inhibition

Es sollte ebenfalls bestimmt werden, wie sich eine PARP-Inhibition auf die Zahl der residualen DSB nach Bestrahlung mit Protonen auswirkt. Dafür wurden die HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen mit 1 µM Olaparib bzw. 1 µM Talazoparib behandelt, eine Stunde später mit 2 Gy Protonen bestrahlt und nach weiteren 24 h die Zahl der residualen 53BP1-Foci in den G1-Phase-Zellen bestimmt. Die Auswertung erfolgte wieder am Leica Fluoreszenzmikroskop.

Bei den unbestrahlten Proben lag im Mittel 1 Foci pro Zelle vor. Die PARP-Inhibition bewirkt dabei keine Steigerung der Foci (Abb. 10A+B). Dies zeigt, dass eine alleinige PARP-Inhibition keine zusätzlichen DSB in der DNA verursacht. Bei einer Bestrahlung mit 2 Gy Protonen nimmt die Anzahl der residualen 53BP1-Foci jeweils zu, so wie es bereits oben beschrieben wurde (Abb. 9). Bei Behandlung mit Olaparib wird für beide

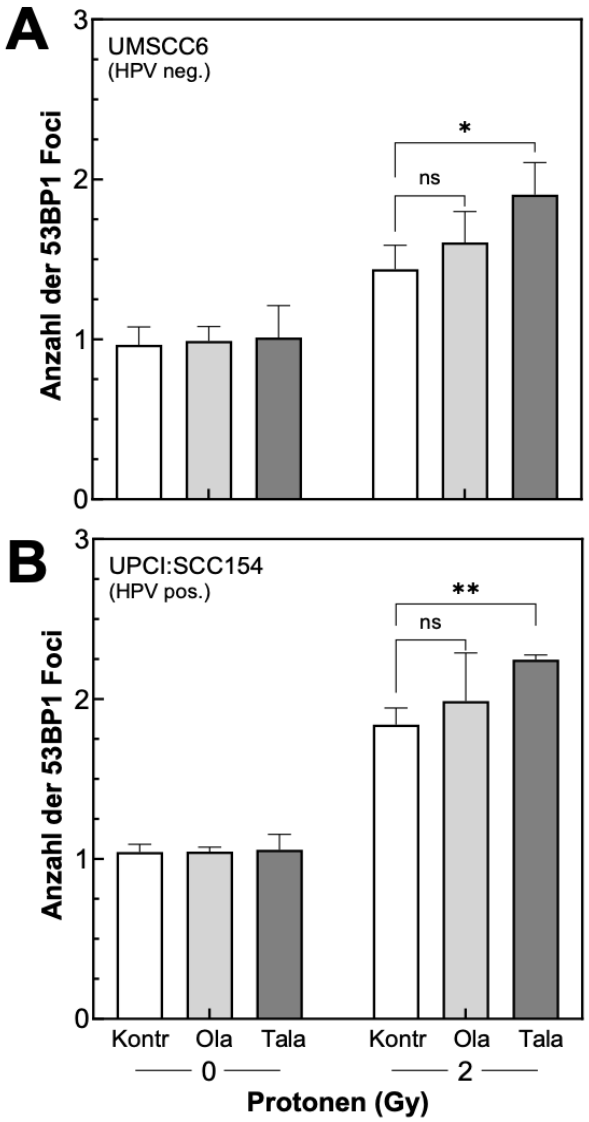

***Abb. 10**: Residuale DSB nach PARP-Inhibition und Bestrahlung mit Protonen*

HPV neg. sowie pos. HNSCC-Zellen wurden mit 1 µM Olaparib bzw. 1 µM Talazoparib behandelt und nach einer Stunde mit 2 Gy Protonen bestrahlt. Nach einer Inkubation von 24 h wurde die Zahl der residualen DSB in G1-Phase-Zellen mittels immunhistochemischer Färbung der 53BP1-Foci bestimmt. A+B) Anzahl residualer DSB in G1-Phase-Zellen der HPV neg. Linie UMSCC-6 sowie der HPV pos. Linie UPCI:SCC-154. *Abgebildet ist der arithmetische Mittelwert ± SEM, n ≥ 3, ** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant.*

Linien eine leichte Zunahme beobachtet, die aber nicht signifikant ist. Bei Behandlung mit Talazoparib zeigt sich dagegen eine deutlich größere Zunahme der Foci, die für UMSCC-6-Zellen signifikant und für UPCI:SCC-154-Zellen sogar hochsignifikant ist. Damit wird gezeigt, dass Olaparib nur einen geringen, Talazoparib dagegen einen deutlichen Einfluss auf die Zahl der residualen DSB hat.

3.7 Assoziation zwischen residualen DSB und dem zellulären Überleben

Es war untersucht worden, wie sich einerseits eine PARP-Inhibition auf das Zellüberleben nach Bestrahlung auswirkt (Abb. 7) und anderseits die Zahl der residualen

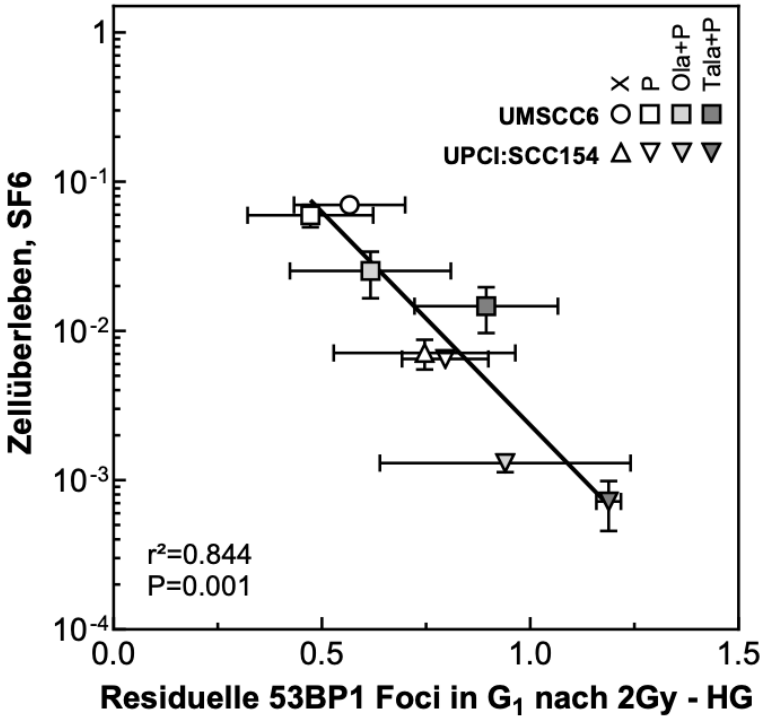

***Abb. 11**: Assoziation zwischen residualen DSB und dem zellulären Überleben*

Bestrahlung der HPV neg. Zellen UMSCC-6 bzw. HPV pos. Zellen UPCI:SCC-154 mit Photonen bzw. Protonen und zusätzlicher Behandlung mit Olaparib oder Talazoparib (siehe Abb. 7 und 10). Aufgetragen ist das zelluläre Überleben nach 6 Gy Bestrahlung gegen die Zahl der residualen DSB nach 2 Gy. *Abgebildet ist der arithmetische Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.*

DSB beeinflusst (Abb. 10). Es sollte daher überprüft werden, ob diese Effekte miteinander korrelieren und ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern besteht. Dafür wurde das zelluläre Überleben nach Bestrahlung mit 6 Gy gegen die Anzahl der residualen 53BP1-Foci nach Bestrahlung mit 2 Gy aufgetragen (Abb. 11). Bei den Foci wurden dafür jeweils die Werte um die Zahl der Foci in den unbestrahlten Proben (HG) korrigiert.

Es zeigte sich, dass eine hoch-signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Parametern besteht (P=0,001, r^2=0,844). Dies bedeutet, dass mit steigender Anzahl der residualen 53BP1-Foci jeweils eine entsprechende Abnahme des Zellüberlebens einhergeht (Abb. 11). Dies gilt sowohl für die HPV neg. Linie UMSCC-6 als auch für die HPV pos. Linie UPCI:SCC-154. Vergleicht man die alleinige Photonenbestrahlung mit der alleinigen Protonenbestrahlung, so bewirken beide eine ähnliche Anzahl residualer DSB und ein ähnliches zelluläres Überleben. In der Assoziation sind daher die Werte für die jeweilige Zelllinie nah beieinander angesiedelt. Mit einer zusätzlichen PARP-Inhibition geht eine steigende Anzahl der 53BP1-Foci und ein niedrigeres Zellüberleben einher. Dies gilt besonders bei Behandlung mit dem PARP-Inhibitor Talazoparib. Betrachtet man die Assoziation in Abhängigkeit vom HPV-Status der HNSCC, so fällt auf, dass die HPV pos. Linie nach allen Behandlungsarten ein niedrigeres Überleben

zeigt als die HPV neg. Linie. Selbst nach alleiniger Bestrahlung mit Photonen oder Protonen haben die UPCI:SCC-154-Zellen ein niedrigeres Zellüberleben als die UMSCC-6-Zellen nach kombinierter Talazoparib-Behandlung und Protonenbestrahlung. Insgesamt zeigen diese Daten damit, dass insbesondere nach PARP-Inhibition die Zunahme der Strahlenempfindlichkeit jeweils durch einen entsprechenden Anstieg in der Zahl der residualen DSB erklärt werden kann.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Protonen auf HPV neg. und pos. HNSCC-Zellen zu bestimmen und sie mit der von Photonen zu vergleichen. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Wirkung von Protonen durch eine PARP-Inhibition gesteigert werden kann.

Die Untersuchungen wurden mit jeweils fünf HPV neg. (UMSCC-3, UMSCC-6, UMSCC-11b, UTSCC-33, FaDu) sowie fünf HPV pos. (UDSCC-2, UMSCC-47, UMSCC-104, 93VU-147T, UPCI:SCC-154) Zelllinien durchgeführt. Diese HNSCC-Linien sind bereits in der präklinischen Forschung etabliert (Arenz et al., 2014; Lin et al., 2007; Mandic et al., 2005; Martin et al., 2014; White et al., 2007). Die Linien bilden zudem die starke Heterogenität der HNSCC-Zellen ab (Kasten-Pisula et al., 2011), welche auch in der eigenen AG oftmals dargestellt wurde (Arenz et al., 2014; Lerch et al., 2020; Subtil et al., 2022; Ziemann et al., 2017).

4.1 Zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Für die zehn HPV neg. und pos. HNSCC wurde nach Photonendosen von 0, 2, 4 und 6 Gy die Strahlenempfindlichkeit der Zellen mittels Koloniebildungstest bestimmt. Mit steigender Photonen-Dosis zeigten alle Zelllinien ein Abnehmen des Koloniewachstum. Wie bereits aus vielen vorherigen Arbeiten bekannt (Lerch et al., 2020; Arenz et al., 2014; Rieckmann et al., 2013; Ziemann et al., 2017), konnte für die HPV pos. Linien ein signifikant stärkeres Ansprechen auf die Bestrahlung (SF_6=0.013±0.003) festgestellt werden als für die HPV neg. Linien (SF_6=0.067±0.016) (P=0.011). Dieser Unterschied in der Strahlensensibilität zwischen den beiden Entitäten spiegelt sich auch im klinischen Überleben der Patientenkollektive wider (vgl. Abb. 1; Lassen et al., 2009, 2018). Ein pos. p16-Status bei einer HPV-Infektion dient daher als prognostischer Marker für ein höheres Gesamtüberleben (Ang et al., 2010; Lassen et al., 2009, 2018; Linge et al., 2018; Lohaus et al., 2014; Nguyen-Tan et al., 2014).

Ziel war es, für die fünf HPV neg. und fünf HPV pos. Linien die Wirkung der Photonen mit der von Protonen zu vergleichen. Die Zellen wurden dabei ebenfalls mit Protonendosen bis zu 6 Gy bestrahlt. Damit sollte sichergestellt werden, dass auch kleine Unterschiede in der Strahlensensibilität erfasst werden. Sowohl für die HPV neg. als auch die HPV pos. Zelllinien zeigte es sich, dass zwischen der Wirkung von Photonen und Protonen nur sehr geringe Unterschiede im zellulären Überleben bestehen (vgl. Abb. 6). Dies stimmt überein mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Dok et al., 2024; Meerz et al., 2021; Vitti et al., 2020; Wang et al., 2017, 2020).

In dieser Arbeit wurde erstmalig die RBE für die Bestrahlung mit Protonen in Abhängigkeit des HPV-Status bestimmt. Dabei wurde herausgefunden, dass Protonen bei den HPV neg. Linien im Mittel eine etwas stärkere Abnahme des zellulären Überlebens bewirken als Photonen (RBE_{10}=1.14±0.01). Dies entspricht dem RBE=1.1 wie er aktuell in der klinischen Praxis verwendet wird (Vitti und Parsons, 2019).

Für HPV pos. Linien zeigte sich hingegen eine nahezu identische Wirkung einer Bestrahlung mit Protonen oder Photonen (RBE_{10}=1.01±0.01). Im Mittel konnte ein signifikanter Unterschied (P=0.016) zwischen den RBEs der beiden Entitäten dargestellt werden. Insbesondere in der RBE-Verteilung der HPV neg. Zelllinien (vgl. Abb. 6D) ließ sich dabei wieder die starke Heterogenität der HNSCC erkennen und damit auch die Notwendigkeit, an weiteren therapeutischen und prognostischen Markern zu forschen.

Interessant sind diese Ergebnisse auch im Hinblick auf das zelluläre Überleben von HNSCC nach C^{12}-Bestrahlung. Von Lerch et al. (2020) konnte gezeigt werden, dass sowohl HPV neg. (UMSCC-6) als auch HPV pos. (UPCI:SCC-154) HNSCC-Zellen deutlich sensibler auf C^{12}-Strahlung reagieren als auf Photonenstrahlung. Überraschenderweise besteht nach C^{12}-Bestrahlung für die beiden Entitäten kein signifikanter Unterschied im zellulären Überleben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei C^{12}-Bestrahlung für HPV neg. Zellen eine deutlich größere Zunahme der Strahlenempfindlichkeit (RBE_{10}=2,81) erreicht wird als für HPV pos. Zellen (RBE_{10}=2,14) (Lerch et al., 2020).

Im Vergleich zu C^{12}-Ionen zeigt sich damit, dass bei Bestrahlung mit Protonen für HPV pos. HNSCC weiterhin die erhöhte Strahlenempfindlichkeit dieser Tumore ausgenutzt werden kann. Zusammen mit der Möglichkeit, dass mit Protonen ebenfalls eine optimale Dosisverteilung erreicht werden kann, empfiehlt sich diese Strahlenart daher insbesondere für die Behandlung von HNSCC, da bei diesen Tumoren in der Regel empfindliche Normalorgane zu schützen sind.

4.2 DSB-Strangbrüche

Das zelluläre Überleben ist maßgeblich von der Art strahlungsinduzierter DNA-Doppelstrangbrüche und der DNA-Reparaturfähigkeit dieser Schäden abhängig (Dikomey et al., 2012, 2016). Um die Anzahl residualer DNA-DSB zu quantifizieren, wurde 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy Photonen bzw. 2 Gy Protonen die Zahl der residualen DSB mittels 53BP1-Focianalyse bestimmt. Da die Zahl der residualen DSB mit dem DNA-Gehalt der Zellen variiert und damit auch vom Zellzyklus abhängt (Lerch et al. 2020), wurden die Messungen nur für G1-Phase-Zellen durchgeführt. Dies konnte durch eine Co-Färbung mittels CenpF erreicht werden. G1-Phase-Zellen können auf

diese Weise aufgrund der fehlenden Färbung (CenpF-) eindeutig von S- (schwache CenpF Färbung, CenpF+) bzw. G2-Phase-Zellen (starke CenpF-Färbung, CenpF++) unterschieden werden.

Unabhängig von der Linie lag in unbestrahlten Zellen im Mittel 1 DSB vor. Nach Bestrahlung mit 2 Gy stieg dieser Wert an mit einem stärkeren Anstieg in den HPV pos. Zellen (vgl. Abb. 9). Dabei kann allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen Photonen und Protonen festgestellt werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in anderen Arbeiten gefunden (Dok et al., 2024; Vitti and Parsons 2017; Wang et al., 2017). Für die höhere Zahl an residualen DSB in den HPV pos. Zellen wird ein Defekt in der HR verantwortlich gemacht, welcher eine inadäquate und fehlerhafte Reparatur von DNA-DSB bewirkt (Ziemann et al., 2017).

Der Unterschied der HPV neg. und pos. Zellen in den residualen DSB korrelierte mit der jeweiligen Abnahme im zellulären Überleben (vgl. Abb. 5 und 6). Damit zeigt diese Arbeit, dass sowohl nach Photonen- als auch nach Protonenbestrahlung das Zellüberleben in gleicher Weise durch die Zahl der residualen DSB bestimmt wird.

Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass in dieser Untersuchung nur jeweils zwei HNSCC-Zelllinien miteinander verglichen wurden. Es ist daher erforderlich, Untersuchungen mit weiteren Linien durchzuführen, um die heterogene Gruppe der HNSCC insgesamt zu erfassen (Dok et al., 2024; Meerz et al., 2021; Wang et al., 2017, 2020).

Vergleicht man die Ergebnisse nach Protonen mit denen nach C^{12}-Bestrahlung, so lassen sich wieder wichtige Unterschiede feststellen. Anders als bei der Photonenbestrahlung zeigen die HPV neg. (UMSCC-6) und HPV pos. (UPCI:SCC-154) HNSCC nach C^{12}-Bestrahlung ähnlich viele residuale DSB (Lerch et al., 2020). Grund dafür ist möglicherweise, dass in den HPV pos. Zellen ein Shift der DNA-Doppelstrangbruchreparatur von der HR zu dem alt-EJ stattfindet, wodurch ein Teil der DSB trotz Defekt in der HR repariert werden kann (Liu et al., 2018). Zudem sind nach C^{12}-Bestrahlung weniger residuale DNA-DSB nötig, um eine Verringerung des Zellüberlebens zu bewirken, was auf die höhere Komplexität der Bestrahlungsschäden zurückgeführt wird (Asaithamby et al., 2011; Hada et al., 2006; Lerch et al., 2020).

4.3 Wirkung der PARP-Inhibition

Es sollte geklärt werden, ob durch eine additive Behandlung der HNSCC-Zellen mit Olaparib bzw. Talazoparib die Wirkung von Protonen weiter verstärkt werden kann. Dafür wurden jeweils eine HPV neg. (UMSCC-6) und eine HPV pos. (UPCI:SCC-154) Linie mit 1 µM Olaparib bzw. 1 µM Talazoparib inkubiert und dann nach einer Stunde mit

bis zu 6 Gy Protonen bestrahlt. Anschließend wurde das Zellüberleben im Koloniebildungstest untersucht oder mittels 53BP1-CenpF-Färbung die DNA-Schäden analysiert.

Nach der Behandlung mit Olaparib allein konnte im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe keine Veränderung im Wachstum der Zellen festgestellt werden. Dahingegen zeigten beide untersuchten HNSCC-Linien nach Talazoparib-Behandlung ein erniedrigtes Wachstum (vgl. Abb. 7 A,C). Für die HPV neg. Linie UMSCC-6 war diese Abnahme signifikant stärker. Ein ähnlicher Unterschied zwischen den beiden HPV-Entitäten für die Toxizität des PARP-Inhibitors wurde auch in einer Arbeit von Wang et al. (2020) für den Inhibitor Niraparib gefunden.

In der Anzahl der residualen DNA-DSB konnte nach alleiniger PARPi-Behandlung kein Unterschied zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Stattdessen wurde aber in den Zellen ein Replikationsstress (RS) beobachtet, insbesondere nach der Behandlung mit Talazoparib. Dieser RS zeigte sich als eine über den Zellkern verstreute große Anzahl an kleinen 53BP1-Foci. Bei der HPV neg. Linie UMSCC-6 fiel dieser RS deutlich stärker aus als bei der HPV pos. Linie und korrelierte zudem mit einem Zellzyklusarrest. Dieser Zellzyklusarrest ließ sich anhand der CenpF-Färbung der späten S-Phase (vgl. Abb. 8 BCD) zuordnen. Es ist jedoch einzuräumen, dass eine scharfe Trennung zwischen S- und G2-Phase mit der hier verwendeten Fluoreszenz-Färbung nicht möglich ist und die Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen einen marginal späteren Arrest in der G2-Phase festgestellt haben (Klein et al., 2021; Köcher et al., 2022).

Generell bestätigen die hier erarbeiteten Ergebnisse gut den bereits bekannten zytotoxischen Effekt von Talazoparib. Dieser wurde, neben HNSCC, auch für andere Tumorentitäten beschrieben (Jonuscheit et al., 2021; Klein et al., 2021; Shen et al., 2013; Shih et al., 2024). Zurückzuführen ist dieser Effekt z.T. auf das verstärkte PARP-Trapping und die negative Beeinflussung der DNA-Replikation (Klein et al., 2021; Köcher et al., 2022; Rudolph et al., 2022; Shen et al., 2013).

Die allgemeine Datenlage bezüglich des zellulären Überlebens nach isolierter PARPi-Behandlung in Abhängigkeit des HPV-Status der HNSCC ist jedoch inhomogen. Weaver et al. (2015) fand für Veliparib ein besseres Ansprechen der HPV pos. HNSCC-Linien und auch Zhou et al. (2022) konnte nach Olaparib ein niedrigeres Überleben der HPV pos. Zellen feststellen. Dahingegen konnte Dok et al. (2020) nach Veliparib-Behandlung generell keinen Einfluss auf das klonogene Überleben feststellen. Es wird vermutet, dass es Zelllinienspezifische bzw. Tumorgewebespezifische Eigenschaften gibt, welche die Sensibilität der HNSCC auf PARPi beeinflussen. Dazu zählen u.a. die genaue

Tumorlokalisation im Kopf-Hals-Bereich, aber auch die erhöhte oder verminderte Expression von Proteinen der DDR (Dok et al., 2020; Lindemann et al., 2021; Moeller et al., 2011; Zhou et al., 2022). Diese Annahmen sollten durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Sie liefern jedoch einen möglichen wichtigen Ansatzpunkt für die weitere Erforschung der DNA-Regulation und -Replikation in Abhängigkeit des HPV-Status, wodurch gezielter Inhibitoren gefunden und eingesetzt werden könnten.

Es war bereits für HNSCC-Zellen bekannt, dass PARPi die Wirkung von Photonen verstärkt und diese Strahlensensibilisierung besonders stark bei HPV pos. Linien ist (Dok et al., 2020; Weaver et al., 2015; Ziemann et al., 2017; Zhou et al., 2022). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch PARPi auch die Wirkung von Protonen verstärkt und dabei wiederum für HPV pos. Zellen ein deutlich stärkerer Effekt beobachtet wird. Der Unterschied zwischen den Entitäten wird darauf zurückgeführt, dass bei HPV pos. Zellen ein Defekt in der HR vorliegt und somit strahlungsinduzierte DNA-DSB insuffizient repariert werden (Ziemann et al., 2017). Für den PARPi Talazoparib konnten dabei größere Verstärkungsfaktoren festgestellt werden als für Olaparib (vgl. DEF Tab. 9). Diese größere Wirksamkeit von Talazoparib im Vergleich zu Olaparib auf HNSCC nach Protonenbestrahlung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Lee et al., 2022; Zhou et al., 2022).

Analog zu diesen Ergebnissen wurde bei Kombination von PARPi mit PBT auch für die Anzahl der residualen DSB eine Zunahme gemessen (vgl. Wang et al., 2020). Wobei auch hier die HPV pos. Linie ein stärkeres Ansprechen auf die Behandlung zeigte (vgl. Abb. 10). Durch Olaparib konnte dabei ein geringer, durch Talazoparib ein signifikanter Anstieg an DNA-DSB erzielt werden (vgl. Abb. 10). Dies stimmt mit der entsprechenden Wirkung auf das Zellüberleben überein.

4.4 Klinische Relevanz und Ausblick

Besonders im Kopf-Hals-Bereich befinden sich viele Risikoorgane, welche bei der Bestrahlung von HNSCC via IMRT belastet werden. Diese Bestrahlung führt zu teilweise gravierenden Nebenwirkungen und einer Verschlechterung der Lebensqualität der Patienten (vgl. *1.2.2 Nebenwirkungen und Prognose der Strahlentherapie*) (Cooper et al., 2004; Nguyen-Tan et al., 2014). Deshalb ist es dringend erforderlich, ein alternatives Therapieschema zu etablieren mit einer geringeren Belastung dieser Organe. Eine Möglichkeit bietet die PBT oder IMPT, da aufgrund der Tiefendosiskurve von Protonen eine gezieltere Bestrahlung des Tumorvolumens bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes erreichbar ist (Li et al., 2020; Moreno et al., 2019; Wannenmacher et al., 2013). Auch wenn die Zahl der Bestrahlungs-Anlagen mit PBT immer noch geringer ist als die für eine RT, so ist seit einigen Jahren eine deutliche Zunahme dieser Anlagen

festzustellen (https://www.ptcog.site/). Dies geht einher mit intensiver klinischer Forschung zur Protonenbestrahlung vor allem für Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (https://clinicaltrials.gov/) (Li et al., 2020).

In dieser präklinischen Arbeit konnte der große Nutzen von PBT für HNSCC-Zellen gezeigt werden. Das zelluläre Überleben der zehn HNSCC Linien konnte durch Protonenbestrahlung ebenso effektiv gesenkt werden wie durch die Photonenbestrahlung (vgl. RBE, vgl. Abb. 5). Dabei wurde, wie auch bei der Photonenbestrahlung, ein besseres Ansprechen der HPV pos. HNSCC-Linien auf die Protonenbestrahlung festgestellt.

Neben der Senkung der Strahlenbelastung des Normalgewebes war es auch Ziel, eine nebenwirkungsärmere Alternative zur Platinbasierten Chemotherapie zu finden. Dafür sollte das Prinzip der Synthetic Lethality angewandt werden, indem der vorbekannte HR-Defekt der HPV pos. HNSCC durch ein gezieltes Targeting mit PARP-Inhibitoren therapeutisch anvisiert wurde (Kanev et al., 2024; Rose et al., 2020). PARPi sind bereits seit einigen Jahren in der Klinik etabliert und für die Therapie mehrerer Tumorentitäten zugelassen (Rose et al., 2020).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PARPi bei Kombination mit PBT strahlensensibilisierend wirken. Dieser Effekt ist dabei für die HPV pos. Zellen aufgrund der defekten HR ausgeprägter als bei der HPV neg. Linie (vgl. Abb. 7 B vs. D). Dieses wichtige Ergebnis sollte durch Untersuchungen an weiteren HPV neg. und pos. HNSCC-Linien bestätigt werden, um eine allgemeinere Aussage zum Einfluss des HPV-Status machen zu können. Dies sollte durch weitere Untersuchungen an frischem Tumormaterial, wie sie mittels ex-vivo-Assay möglich sind, ergänzt werden.

Bezüglich der Auswahl der PARPi zeigte Talazoparib eine potentere Wirkung auf das zelluläre Überleben als Olaparib, jedoch auch eine höhere Zytotoxizität. Im Rahmen einer klinischen Therapie mit Talazoparib müsste daher vermutlich auch mit vermehrten Nebenwirkungen gerechnet werden. Olaparib wird hingegen schon länger klinisch eingesetzt und ist in seinen Wirkungen und Nebenwirkungen umfassender erforscht.

Die Etablierung einer Kombinationstherapie aus Protonen und Olaparib für HPV pos. HNSCC-Tumoren könnte eine große Chance bieten, gezielter das Tumorgewebe anzugreifen und gleichzeitig die notwendige Bestrahlungsdosis zu senken, um Nebenwirkungen zu reduzieren.

Leider gibt es bislang nur wenige klinische PARPi-Studien mit HNSCC-Patienten (https://clinicaltrials.gov/) mit nur einer Phase II Studie, wo sowohl PARPi als auch PBT eingesetzt werden (NCT05366166, Olaparib und Pembrolizumab mit IMRT oder PBT). Aufgrund der in dieser Arbeit gemachten Ergebnisse wäre es sinnvoll, gerade den

klinischen Nutzen einer Kombinationstherapie mit Protonen und Olaparib weiter zu untersuchen und dabei den Unterschied zwischen den beiden HPV-Entitäten zu berücksichtigen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) zählen zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. Dabei werden die beiden Entitäten HPV neg. und HPV pos. unterschieden, welche durch Alkohol- und Nikotinkonsum bzw. durch Humane Papillomviren (HPV) verursacht werden.

Die Therapie der HNSCC mit einer Cisplatin-basierten Radiochemotherapie führt für HPV pos. HNSCC mit ca. 80% zu einem deutlich besseren Gesamtüberleben als für HPV neg. HNSCC mit nur 50%. In Folge der Chemotherapie und der Strahlentherapie treten jedoch häufig schwere Nebenwirkungen auf, welche die Lebensqualität der Patienten sehr beeinträchtigen. Es besteht die Hoffnung, dass eine Verbesserung der Therapie durch den Einsatz von Photonen erreicht werden kann mit insbesondere geringerer Schädigung des Normalgewebes.

Mit dieser Studie sollte zum einen geklärt werden, ob ähnlich wie nach Photonen auch nach Bestrahlung mit Protonen HPV pos. HNSCC-Zellen eine deutlich höhere Strahlenempfindlichkeit aufweisen als HPV neg. Zellen. Außerdem sollte überprüft werden, ob auch nach Protonenbestrahlung die Strahlenempfindlichkeit durch eine Inhibition von PARP weiter gesteigert werden kann. Diese Untersuchungen wurden an fünf HPV neg. (UMSCC-3, UMSCC-6, UMSCC-11b, UTSCC-33, FaDu) sowie fünf HPV pos. (UDSCC-2, UMSCC-47, UMSCC-104, 93VU-147T, UPCI:SCC-154) Zelllinien durchgeführt. Für die Unterdrückung von PARP wurde die beiden aktuellen Inhibitoren Olaparib sowie Talazoparib verwendet. Die Strahlenempfindlichkeit wurde mittels Kolonietests bestimmt, der Replikationsstress sowie die Doppelstrangbruchreparatur mithilfe einer 53BP1/CenpF-Kofärbung.

Folgende Ergebnisse konnten erarbeitet werden:

1. Für Photonen konnte die signifikant höhere Strahlensensibilität der HPV pos. Zellen im Vergleich zu den HPV neg. Zellen bestätigt werden.

2. Auch bei Bestrahlung mit Protonen zeigen die HPV pos. Zellen eine signifikant höhere Strahlensensibilität als die HPV neg. Zellen.

3. Die Relative Biologische Wirksamkeit (RBW_{10}) ist dabei für die HPV neg. Zelllinien etwas höher (RBW_{10}=1,14±0,04) als für HPV pos. Zelllinien (RBW_{10}=1,01±0,01).

4. Während der PARP-Inhibitor Olaparib keinen Effekt auf das Zellüberleben hat, wird nach Talazoparib eine deutliche Abnahme beobachtet. Dieser Toxizität ist aber für die HPV neg. Linie UMSCC-6 mit einer PE=30% deutlich höher als für die HPV pos. Linie UPCI:SCC-154 mit einer PE=70%.

5. Talazoparib bewirkt in der HPV neg. Zelllinie ebenfalls einen ausgeprägten

Replikationsstress (RS). Dieser zeigt sich anhand von einer großen Zahl an versprenkelten 53PB1-Foci in S-Phase-Zellen, was mit einem ausgeprägten Arrest in dieser Phase einhergeht. Nach Olaparib ist dieser Effekt deutlich kleiner. Für die HPV pos. Zelllinie wird kein entsprechender RS beobachtet.

6. Beide Inhibitoren bewirken eine Strahlensensibilisierung, wobei dieser Effekt für Talazoparib größer ist und für die HPV pos. Linie stärker ausgeprägt ist als für die HPV neg. Linie.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass eine Radiotherapie mit Protonen eine gute normalgewebeschonende Alternative zur aktuell gängigen Photonenbestrahlung darstellt. Diese Therapie kann durch den strahlensensibilisierenden Effekt von PARP-Inhibitoren insbesondere bei HPV pos. Zelllinien weiter gesteigert werden. Aufgrund der hohen Toxizität von Talazoparib ist dafür der PARP-Inhibitor Olaparib besser geeignet.

6 SUMMARY

Squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) are among the ten most frequent cancer worldwide. A distinction is made between HPV neg. and pos. HNSCC, which are either associated with tobacco consumption or alcohol abuse or which are induced by human papillomavirus (HPV).

Treatment of HNSCC by Cisplatin-based radio-chemotherapy results in a rather good response for HPV pos. HNSCC with an overall survival of 80%, in contrast to only 50% for HPV neg. HNSCC. However, the therapy is often associated with severe side effects strongly reducing the quality of life. There is a chance that the therapy of these patients may be improved when using proton irradiation especially because of less side effects.

The aim of this study was to clarify, whether similar as seen for photons also for protons a higher effect is achieved for HPV pos. HNSCC cells. It was additionally tested whether the effect of protons can be enhanced by the inhibition of PARP. The experiments were performed with five HPV neg. (UMSCC-3, UMSCC-6, UMSCC-11b, UTSCC-33, FaDu) and five HPV pos. (UDSCC-2, UMSCC-47, UMSCC-104, 93VU-147T, UPCI:SCC-154) cell lines. For the inhibition of PARP the two recent drugs Olaparib and Talazoparib were used. Radiosensitivity was determined by colony forming assay, DNA replication stress and double-strand break repair by 53BP1/CenpF co-staining.

The following results were obtained:

1. For photon irradiation the significant higher radiosensitivity of HPV pos. cells was confirmed.

2. Also, for protons a significantly higher radiosensitivity was seen for HPV pos. cells.

3. The relative biological effectiveness (RBE_{10}) was slightly higher for HPV neg. cell lines with RBE_{10}=1.14±0.04 when compared to RBE_{10}=1.01±0.01 for HPV pos. cell lines.

4. Inhibition of PARP by Olaparib had no effect on cell survival, while a strong cytotoxicity was seen when using Talazoparib. Surprisingly this effect was much stronger for the HPV neg. cell line UMSCC-6 with PE=30% in contrast to PE=70% for the HPV pos. cell line UPCI:SCC-154.

5. For HPV neg. cells Talazoparib also led to a drastic DNA replication stress (RS). This was evident by the great number of S-phase cells with dispersed 53BP1 foci and which was associated with a strong block in this phase. Clearly less RS was seen for HPV neg. cells when treated by Olaparib. No such effects were detected for HPV pos. cells.

6. Both inhibitors led to an increase in radiosensitivity, whereby this effect was

higher for Talazoparib. These effects, however, were much stronger for the HPV pos. cell line when compared to the HPV neg. cell line.

Overall, these data demonstrate, that therapy by protons is an optimal alternative to the conventional photon therapy. Effect of protons can even be enhanced by PARP inhibition especially for HPV pos. HNSCC. In this respect Olaparib appears to be better candidate, because of the high cellular toxicity caused by Talazoparib.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. N Engl J Med. 363(1):24-35.

Ang KK, Zhang Q, Rosenthal DI, et al. (2014). 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. J Clin Oncol. 32(27):2940-50.

Arenz A, Ziemann F, Mayer C, et al. (2014), Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. Strahlenther Onkol. 190(9):839-46.

Argiris A, Miao J, Cristea MC, et al. (2021). A Dose-finding Study Followed by a Phase II Randomized, Placebo-controlled Trial of Chemoradiotherapy With or Without Veliparib in Stage III Non-small-cell Lung Cancer: SWOG 1206 (8811). Clin Lung Cancer. 22(4):313-323.e1.

Asaithamby A, Chen DJ (2011). Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. Mutat Res. 711(1-2):87-99.

Barcellini A, Loap P, Murata K, et al. (2021). PARP Inhibitors in Combination with Radiotherapy: To Do or Not to Do? Cancers (Basel). 13(21):5380.

Barnes CJ, Bush DA, Grove RI, et al. (2018). Fractionated Proton Beam Therapy for Acoustic Neuromas: Tumor Control and Hearing Preservation. Int J Ther. 4(4):28-36.

Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, et al. (2023). Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Med Sci (Basel). 11(2):42.

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, et al. (2004). Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. N Engl J Med. 350(19):1945-52.

Bernier J, Cooper JS, Pajk TF, et al. (2005). Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). Head Neck. 27(19):843-50.

Bi Y, Verginadis II, Dey S, et al. (2018). Radiosensitization by the PARP inhibitor olaparib in BRCA1-proficient and deficient high-grade serous ovarian carcinomas. Gynecol Oncol. 150(3):534-544.

Blanchard P, Garden AS, Gunn GB, et al. (2016). Intensity-modulated proton beam therapy (IMPT) versus intensity-modulated photon therapy (IMRT) for patients with oropharynx cancer - A case matched analysis. Radiother Oncol. 120(1):48-55.

Bonner JA, Harari PM, Azarnia N, et al. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 354(6):567-78.

Bourhis J, Sire C, Graff P, et al. (2012). Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or without concomitant chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma (GORTEC 99-02): an open-label phase 3 randomised trial. Lancet Oncol. 12(2):145-53.

BPS Bioscience: PARP/PARPTrap™ Screening & Profiling, https://bpsbioscience.com/screening-profiling-services/parp?protein_family=parps, (zuletzt aufgerufen am 23.03.2024).

Bright SJ, Flint DB, Martinus DKJ, et al. (2022). Targeted Inhibition of DNA-PKcs, ATM, ATR, PARP, and Rad51 Modulate Response to X Rays and Protons. Radiat Res. 198(4):336-346.

Caracciolo D, Riillo C, Di Martino MT, et al. (2021). Alternative Non-Homologous End-Joining: Error-Prone DNA Repair as Cancer's Achilles' Heel. Cancers (Basel). 13(6):1392.

Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. Trends Cell Biol. 26(1):52-64.

Césaire M, Ghosh U, Austry JB, et al. (2019). Sensitization of chondrosarcoma cells with PARP inhibitor and high-LET radiation. J Bone Oncol. 17:100246.

Chabot P, Hsia TC, Ryu JS, et al. (2017). Veliparib in combination with whole-brain radiation therapy for patients with brain metastases from non-small cell lung cancer: results of a randomized, global, placebo-controlled study. J Neurooncol. 131(1):105-115.

Chaudhary P, Marshall TI, Currell FJ, et al. (2016). Variations in the Processing of DNA Double-Strand Breaks Along 60-MeV Therapeutic Proton Beams. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 95(1):86-94.

Clinical Trials, National Library of Medicine, Clinicaltrials.gov, (zuletzt aufgerufen am 15.05.2025)

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al. (2004). Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 359(19)1937-44.

Cortesi L, Rugo HS, Jackisch C (2021). An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. Target Oncol. 16(3):255-282.

Coster G, Goldberg M (2010). The cellular response to DNA damage: a focus on MDC1 and its interacting proteins. Nucleus. 1(2):166-78.

Czito BG, Deming DA, Jameson GS, et al. (2017). Safety and tolerability of veliparib combined with capecitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer: a phase 1b study. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2(6):418-426.

Dikomey E, Borgmann K, Kriegs M, et al. (2012). Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen. In Allgemeine Tumortherapie, J. Zeller, and z.H. H., eds. (Heidelberg: ecomed Medizin), pp. 1-20.

Dikomey E, Borgmann K, Köcher S, et al. (2016). Radiation DNA damage and use in cancer/therapeutics-translation of radiation modifiers. In DNA Repair in Cancer Therapy (Second Edition), M.R. Kelley, and M.L. Fishel, eds. (Boston: Academic Press), pp. 329-352.

Dirix P, Nuyts S, Van den Bogaert W (2006). Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: a literature review. Cancer. 107(11):2525-34.

Dok R, Bamps M, Glorieux M, et al. (2020). Radiosensitization approaches for HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous carcinomas. Int J Cancer. 146(4):1075-1085.

Dok R, Vanderwaeren L, Verstrepen KJ, et al. (2024). Radiobiology of Proton Therapy in Human Papillomavirus-Negative and Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Cancer Cells. Cancers (Basel). 16(11):1959.

Dungey FA, Löser DA, Chalmers AJ (2008). Replication-dependent radiosensitization of human glioma cells by inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase: mechanisms and therapeutic potential. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 72(4):1188-97.

Epstein JB, Emerton S, Kolbinson DA, et al. (1999). Quality of life and oral function following radiotherapy for head and neck cancer. Head Neck. 21(1):1-11.

Falkmer S, Fors B, Larsson B, et al. (1962). Pilot study on proton irradiation of human carcinoma. Acta radiol. 58:33-51.

Fu X, Li P, Zhou Q, et al. (2023). Mechanism of PARP inhibitor resistance and potential overcoming strategies. Genes Dis. 11(1):306-320.

Gillison ML, Trotti AM, Harris J, et al. (2019). Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. Lancet. 393(10166):40-50.

Grosse N, Fontana AO, Hug EB, et al. (2014). Deficiency in homologous recombination renders Mammalian cells more sensitive to proton versus photon irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 88(1):175-81.

Gunn GB, Blanchard P, Garden AS, et al. (2016). Clinical Outcomes and Patterns of Disease Recurrence After Intensity Modulated Proton Therapy for Oropharyngeal Squamous Carcinoma. Int J Radial Oncol Biol Phys. 95(1):360-367.

de Haan R, van den Heuvel MM, van Diessen J, et al. (2021). Phase I and Pharmacologic Study of Olaparib in Combination with High-dose Radiotherapy with and without Concurrent Cisplatin for Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 27(5):1256-1266.

Hada M, Sutherland BM (2006). Spectrum of complex DNA damages depends on the incident radiation. Radiat Res. 165(2):223-30.

Hallemeier CL, Ashman JB, Haddock G (2020). A brief overview of the use of proton beam radiotherapy for gastrointestinal cancers. J Gastrointest Oncol. 11(1):139-143.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmaks of cancer: the next generation. Cell. 144(5):646-74.

Helleday T (2011). The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. Mol Oncol. 5(4):387-93.

Herrmann T, Baumann M, Dörr W (2006). Klinische Strahlenbiologie. 4. Auflage. Elsevier GmbH, München, Deutschland.

Hirai T, Saito S, Fujimori H, et al. (2016). Radiosensitization by PARP inhibition to proton beam irradiation in cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 478(1):234-240.

Hopkins TA, Ainsworth WB, Ellis PA, et al. (2019). PARP1 Trapping by PARP Inhibitors Drives Cytotoxicity in Both Cancer Cells and Healthy Bone Marrow. Mol Cancer Res. 17(2):409-419.

Jackson SP, Bartek J (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 462(7267:1071-8.

Jagsi R, Griffith KA, Bellon JR, et al. (2018). Concurrent Veliparib With Chest Wall and Nodal Radiotherapy in Patients With Inflammatory or Locoregionally Recurrent Breast Cancer: The TBCRC 024 Phase I Multicenter Study. J Clin Oncol. 36(13):1317-1322.

Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, et al. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers. 6(1):92.

Jonuscheit S, Jost T, Gajdošová F, et al. (2021). PARP Inhibitors Talazoparib and Niraparib Sensitize Melanoma Cells to Ionizing Radiation. Genes (Basel). 12(6):849.

Kageyama SI, Junyan D, Hojo H, et al. (2020). PARP inhibitor olaparib sensitizes esophageal carcinoma cells to fractionated proton irradiation. J Radiat Res. 61(2):177-186.

Kaiser A, Eley JG, Onyeuku NE, et al. (2019), Proton Therapy Delivery and Its Clinical Application in Select Solid Tumor Malignancies. J Vis Exp. 6:(144).

Kanev PB, Atemin A, Stoynov S, et al. (2024). PARP1 roles in DNA repair and DNA replication: The basi(c)s of PARP inhibitor efficacy and resistance. Semin Oncol. 51(1-2):2-18.

Karam SD, Reddy K, Blatchford PJ, et al. (2018). Final Report of a Phase I Trial of Olaparib with Cetuximab and Radiation for Heavy Smoker Patients with Locally Advanced Head and Neck Cancer. Clin Cancer Res. 24(20):4949-4959.

Kasten-Pisula U, Saker J, Eicheler W, et al. (2011). Cellular and tumor radiosensitivity is correlated to epidermal growth factor receptor protein expression level in tumors without EGFR amplification. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 80(4):1181-8.

Keta O, Petković V, Cirrone P, et al. (2021). DNA double-strand breaks in cancer cells as a function of proton linear energy transfer and its variation in time. Int J Radiat Biol. 97(9):1229-1240.

Kim DS, Challa S, Jones A, et al. (2020). PARPs and ADP-ribosylation in RNA biology: from RNA expression and processing to protein translation and proteostasis. Genes Dev. 34(5-6):302-320.

Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, et al. (2013) Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. Cancer Res. 73(15):4791-4800.

Kinner A, Wu W, Staudt C, et al. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucleic Acids Res. 36(17):5678-94.

Klein FG, Granier C, Zhao Y, et al. (2021). Combination of Talazoparib and Palbociclib as a Potent Treatment Strategy in Bladder Cancer. J Pers Med. 11(5):340.

Köcher S, Zech HB, Krug L, et al. (2022). A Lack of Effectiveness in the ATM-Orchestrated DNA Damage Response Contributes to the DNA Repair Defect of HPV-Positive Head and Neck Cancer Cells. Front Oncol. 12:765968.

Laird JH, Lok BH, Ma J, et al. (2018). Talazoparib Is a Potent Radiosensitizer in Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Xenografts. Clin Cancer Res. 24(20):5143-5152.

Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit, et al. (2009), Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol. 27(12):1992-8.

Lassen P, Lacas B, Pignon JP, et al. (2018). Prognostic impact of HPV-associated p16-expression and smoking status on outcomes following radiotherapy for oropharyngeal cancer: The MARCH-HPV project. Radiother Oncol. 126(1):107-115.

Lee DW, Kim JE, Lee GH, et al. (2022). High-Throughput 3D Tumor Spheroid Array Platform for Evaluating Sensitivity of Proton-Drug Combinations. Int J Mol Sci. 23(2):587.

Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH (2011). The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer. 11(1):9-22.

Lerch S, Berthold S, Ziemann F, et al. (2020), HPV-positive HNSCC cell lines show strongly enhances radiosensitivity after photon but not after carbon ion irradiation. Radiother Oncol. 151:134-140.

Lesueur P, Chevalier F, Austry JB, et al. (2017). Poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibitors as radiosensitizers: a systematic review of pre-clinical and clinical human studies. Oncotarget. 8(40):69105-69124.

Lewis GD, Holliday EB, Kocak-Uzel E, et al. (2016). Intensity-modulated proton therapy for nasopharyngeal carcinoma: Decreased radiation dose to normal structures and encouraging clinical outcomes. Head Neck. 38 Suppl 1:E1886-95.

Li X, Lee A, Cohen MA, et al. (2020). Past, present and future of proton therapy for head and neck cancer. Oral Oncol. 110:104879.

Li X, Kitpanit S, Lee A, et al. (2021). Toxicity Profiles and Survival Outcomes Among Patients With Nonmetastatic Nasopharyngeal Carcinoma Treated With Intensity-Modulated Proton Therapy vs Intensity-Modulated Radiation Therapy. JAMA Netw Open. 4(6):e2113205.

Li LY, Guan YD, Chen XS, et al. (2021), DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. Front Pharmacol. 8:11:629266.

Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, et al. (2007), Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. Head Neck. 29(2):163-88.

Lindemann A, Patel AA, Tang L, et al. (2021). Combined Inhibition of Rad51 and Wee1 Enhances Cell Killing in HNSCC Through Induction of Apoptosis Associated With Excessive DNA Damage and Replication Stress. Mol Cancer Ther. 20(7):1257-1269.

Linge A, Schötz U, Löck S, et al. (2018). Comparison of detection methods for HPV status as a prognostic marker for loco-regional control after radiochemotherapy in patients with HNSCC. Radiother Oncol. 127(1):27-35.

Litton JK, Rugo HS, Ettl J, et al. (2018). Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. N Engl J Med. 379(8):753-763.

Liu Q, Ma L, Jones T, et al. (2018). Subjugation of TGFβ Signaling by Human Papilloma Virus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Shifts DNA Repair from Homologous Recombination to Alternative End Joining. Clin Cancer Res. 24(23):6001-6014.

Loap P, Loirat D, Berger F, et al. (2021). Combination of Olaparib and Radiation Therapy for Triple Negative Breast Cancer: Preliminary Results of the RADIOPARP Phase 1 Trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 109(2):436-440.

Loap P, Loirat D, Berger F, et al. (2022). Concurrent Olaparib and Radiotherapy in Patients With Triple-Negative Breast Cancer: The Phase 1 Olaparib and Radiation Therapy for Triple-Negative Breast Cancer Trial. JAMA Oncol. 8(12):1802-1808.

Lohaus F, Linge A, Tinhofer I, et al. (2014). HPV16 DNA status is a strong prognosticator of loco-regional control after postoperative radiochemotherapy of locally advanced oropharyngeal carcinoma: results from a multicentre explorative study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). Radiother Oncol. 113(3):317-323.

Luo L, Keyomarsi K (2022). PARP inhibitors as single agents and in combination therapy: the most promising treatment strategies in clinical trials for BRCA-mutant ovarian and triple-negative breast cancers. Expert Opinion on Investigational Drugs. 31(6):607–631.

Mandic R, Schamberger C, Müller JF, et al. (2005), Reduced Cisplatin Sensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines Correlates with Mutations Affecting the COOH-Terminal Nuclear Localization Signal of p53. Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1):6845-52.

Mansour WY, Schuhmacher S, Rosskopf R, et al. (2008). Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. Nuceic Acids Res. 36(12):4088-98.

Martin D, Abba MC, Molinolo AA, et al. (2014), The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. Oncotarget. 5(19):8906-23.

Mazeron R, Tao Y, Lusinchi A, et al. (2009). Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer. Oral Oncol. 45(4-5):402-8.

Meerz A, Deville SS, Müller J, et al. (2021). Comparative Therapeutic Exploitability of Acute Adaptation Mechanisms to Photon and Proton Irradiation in 3D Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Cultures. Cancers. 13(6):1190.

Mehta MP, Wang D, Wang F, et al. (2015). Veliparib in combination with whole brain radiation therapy in patients with brain metastases: results of a phase 1 study. J Neurooncol. 122(2):409-17.

Mendenhall NP, Hoppe BS, Nichols RC, et al. (2014). Five-year outcomes from 3 prospective trials of image-guided proton therapy for prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 88(3):596-602.

Mesri EA, Feitelson MA, Munger K (2014). Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis. Cell Host Microbe 15, 266–282.

Moeller BJ, Yordy JS, Williams MD, et al. (2011). DNA repair biomarker profiling of head and neck cancer: Ku80 expression predicts locoregional failure and death following radiotherapy. Clin Cancer Res. 17(7):2035-43.

Mohanti BK, Nchiappan P, Pandey RM, et al. (2007). ysis of 2167 head and neck cancer patients' management, treatment compliance and outcomes from a regional cancer centre, Delhi, India. J Laryngol Otol. 121(1):49-56.

Moreno AC, Frank SJ, Garden AS, et al. (2019). Intensity modulated proton therapy (IMPT) - The future of IMRT for head and neck cancer. Oral Oncol. 88:88-74.

Münter MW, Thilmann C, Hof H, et al. (2003). Stereotactic intensity modulated radiation therapy and inverse treatment planning for tumors of the head and neck region: clinical implementation of the step and shoot approach and first clinical results. Radiother Oncol. 66(3):313-21.

Nguyen NP, North D, Smith HJ, et al. (2006). Safety and effectiveness of prophylactic gastrostomy tubes for head and neck cancer patients undergoing chemoradiation. Surg Oncol. 15(4):199-203.

Nguyen-Tan PF, Zhang Q, Ang KK, et al. (2014). Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. J Clin Oncol. 32(34):3858-3866.

Noel G, Godon C, Fernet M, et al. (2006). Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. Mol Cancer Ther. 5:564–74.

Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, et al. (2011). Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. Lancet Oncol. 12(2):127-36.

Paganetti H, Beltran C, Both S, et al. (2021). Roadmap: proton therapy physics and biology. Phys Med Biol. 66(5):10.

Park S, Choi C, Kim H, et al. (2024). Olaparib enhances sensitization of BRCA-proficient breast cancer cells to x-rays and protons. Breast Cancer Res Treat. 203(3):449-461.

Particle Therapy Co-Operative Group, Particle Therapy Centers, https://www.ptcog.site/ (zuletzt aufgerufen 15.05.2025)

Patel SH, Wang Z, Wong WW, et al. (2014). Charged particle therapy versus photon therapy for paranasal sinus and nasal cavity malignant diseases: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol. 15(9):1027-38.

Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, et al. (2020). Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. 18(7):873-898.

Pignon JP, le Maître A, Maillard E, et al. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. Radiother Oncol. 92(1):4-14.

Powell C, Mikropoulos C, Kaye SB, et al. (2010). Pre-clinical and clinical evaluation of PARP inhibitors as tumour-specific radiosensitisers. Cancer Treat Rev. 36: 566–575

Puck TT, Marcus PI (1956), Action of x-rays on mammalian cells. J exp Med. 103(5):653-66.

Rehman Ju, Zahra, Ahmad N, et al. (2018). Intensity modulated radiation therapy: A review of current practice and future outlooks. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 11(4):361-367.

Reiss KA, Herman JM, Armstrong D, et al. (2017). A final report of a phase I study of veliparib (ABT-888) in combination with low-dose fractionated whole abdominal radiation therapy (LDFWAR) in patients with advanced solid malignancies and peritoneal carcinomatosis with a dose escalation in ovarian and fallopian tube cancers. Gynecol Oncol. 144(3):486-490.

Reuschenbach M, Tinhofer I, Wittekindt C, et al. (2019). A systematic review of the HPV-attributable fraction of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Germany. Cancer Med. 8(4):1908-1918.

Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, et al. (2013), HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. Radiother Oncol. 107(2):242-6.

Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2023). Krebs in Deutschland für 2019/2020. 14. Ausgabe. Berlin, Deutschland.

Rose M, Burgess JT, O'Byrne K, et al. (2020). PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. Front Cell Dev Biol. 8:564601.

Rudolph J, Jung K, Luger K (2022). Inhibitors of PARP: Number crunching and structure gazing. Proc Natl Acad Sci U S A. 119(11):e2121979119.

Sano D, Oridate N (2016). The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Clin Oncol. 21(5):819-826.

Shen Y, Rehman FL, Feng Y, et al. (2013). BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. Clin Cancer Res. 19(18):5003-15.

Sheu JJC, Hua CH, Wan L, et al. (2009). Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma. Cancer Res. 69(6):2568-76.

Shih CT, Huang TT, Nair JR, et al. (2024). Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib-Resistant BRCA1-Mutant Ovarian Cancer Cells Demonstrate Differential Sensitivity to PARP Inhibitor Rechallenge. Cells. 13(22):1847.

Shin KH, Ahn JH, Kang MK, et al. (2006). HPV-16 E6 oncoprotein impairs the fidelity of DNA end-joining via p53-dependent and -independent pathways. Int J Oncol. 28(1):209-15.

Sim HW, McDonald KL, Lwin Z, et al. (2021). A randomized phase II trial of veliparib, radiotherapy, and temozolomide in patients with unmethylated MGMT glioblastoma: the VERTU study. Neuro Oncol. 23(10):1736-1749.

Slater JD, Yonemoto LT, Mantik DW, et al. (2005). Proton radiation for treatment of cancer of the oropharynx: early experience at Loma Linda University Medical Center using a concomitant boost technique. Int J Radial Oncol Biol Phys. 62(2):494-500.

Slater JD, Loredo LN, Chung A, et al. (2012). Fractionated proton radiotherapy for benign cavernous sinus meningiomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 83(5):e633-7.

Spiegel JO, Van Houten B, Durrant JD (2021). PARP1: Structural insights and pharmacological targets for inhibition. DNA Repair (Amst). 103:103125.

Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. (2011). The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. Sience. 333(6046):1157-60.

Subtil FSB, Gröbner C, Recknagel N, et al. (2022). Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Leads to a Synergistic Enhancement of Cisplatin and Radiation in Both HPV-Negative and -Positive HNSCC Cell Lines. Cancers (Basel). 14(13):3160.

Sun C, Chu A, Song R, et al. (2023). PARP inhibitors combined with radiotherapy: are we ready? Front Pharmacol. 14:1234973.

Sung H, Ferlay J, Siegel EL, et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 71(3):209-249.

Tinhofer I, Jöhrens K, Keilholz U, et al. (2015). Contribution of human papilloma virus to the incidence of squamous cell carcinoma of the head and neck in a European population with high smoking prevalence. Eur J Cancer. 51(4):514-521.

Tsang DS, Patel S (2019). Proton beam therapy for cancer. CMAJ. 191(24):E664-E666.

Tuli R, Shiao SL, Nissen N, et al. (2019). A phase 1 study of veliparib, a PARP-1/2 inhibitor, with gemcitabine and radiotherapy in locally advanced pancreatic cancer. EBioMedicine. 40:375-381.

Vigneswaran N, Williams MD (2014). Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. 26(2):123-41.

Vitti ET, Parsons JL (2019). The Radiobiological Effects of Proton Beam Therapy: Impact on DNA Damage and Repair. Cancers (Basel). 11(7):946.

Vitti ET, Kacperek A, Parsons JL (2020). Targeting DNA Double-Strand Break Repair Enhances Radiosensitivity of HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Photons and Protons. Cancers (Basel). 12(6):1490.

Waissi W, Nicol A, Jung M, et al. (2021). Radiosensitizing Pancreatic Cancer with PARP Inhibitor and Gemcitabine: An In Vivo and a Whole-Transcriptome Analysis after Proton or Photon Irradiation. Cancers (Basel). 13(3):527.

Wang L, Wang X, Li Y, et al. (2017). Human papillomavirus status and the relative biological effectiveness of proton radiotherapy in head and neck cancer cells. Head Neck. 39(4):708-715.

Wang L, Cao J, Wang X, et al. (2020). Proton and photon radiosensitization effects of niraparib, a PARP-1/-2 inhibitor, on human head and neck cancer cells. Head Neck. 42(9):2244-2256.

Wannenmacher M, Wenz F, Debus J (2013). Strahlentherapie. 2. Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, Deutschland.

Weaver AN, Cooper TS, Rodriguez M, et al. (2015). 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. Oncotarget. 6(29):26995-7007.

Weterings E, Chen DJ (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. Cell Re. 18(1):114-24.

White JS, Weissfeld JL, Ragin CCR, et al. (2007). The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Oral Oncol. 43(7):701-12.

Youssef I, Yoon J, Mohamed N, et al. (2022). Toxicity Profiles and Survival Outcomes Among Patients With Nonmetastatic Oropharyngeal Carcinoma Treated With Intensity-Modulated Proton Therapy vs Intensity-Modulated Radiation Therapy. JAMA Netw Open. 5(11):e2241538.

Zhao W, Hu H, Mo Q, et al. (2019). Function and mechanism of combined PARP-1 and BRCA genes in regulating the radiosensitivity of breast cancer cells. Int J Clin Exp Pathol. 12(10):3915-3920.

Zhou C, Fabbrizi MR, Hughes JR, et al. (2022). Effectiveness of PARP inhibition in enhancing the radiosensitivity of 3D spheroids of head and neck squamous cell carcinoma. Front Oncol. 12:940377.

Ziemann F, Seltzsam S, Dreffke K, et al. (2017), Roscovitine strongly enhances the effect of olaparib on radiosensitivity for HPV neg. but not for HPV pos. HNSCC cell lines. Oncotarget. 8(62):105170-105183.

8 ANHANG

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrenden

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt

Aumüller, Prof. Dr. Gerhard
Bauer, Prof. Dr. Uta-Maria
Becker, Prof. Dr. Anette
Bertoune, Dr. Mirjam
Bette, PD Dr. Michael
Bogdan, Prof. Dr. Sven
Bonaterra, Dr. Gabriel
Brehm, Prof. Dr. Alexander
Cetin, Prof. Dr. Yalcin
de Cruppé, Prof. Dr. Werner
Decher, Prof. Dr. Niels
Donner-Banzhof, Prof. Dr. Norbert
Feuser, Dr. Beate
Geraedts, Prof. Dr. Max
Halaszovich, Dr. Christian
Hantschel, Oliver, Prof. Dr.
Hildebrandt, Prof. Dr. Wulf
Homberg, Prof. Dr. Uwe
Kinscherf, Prof. Dr. Ralf
Lill, Prof. Dr. Roland
Mathys, Marc G.
Mey, Dr. Lilli
Milani, Dr. Wiebke
Neumüller, Prof. Dr. Bernhard
Oberwinkler, Prof. Dr. Johannes
Oliver, Prof. Dr. Dominik
Preisig-Müller, Dr. Regina
Renigunta, Dr. Vijay
Rost, Dr. Birgit
Rust, Prof. Dr. Marco
Sahmland, Prof. Dr. Irmtraut
Schäfer, Dr. Martin
Schütz, Prof. Dr. Burkhard
Stahl, Dr. Bernd
Steiniger, Prof. Dr. Birte
Stiewe, Prof. Dr. Thorsten
Thieme, Prof. Dr. Kati
Ulrich, Dr. Nina
Viniol, Prof. Dr. Annika
Weihe, Prof. Dr. Eberhard
Westermann, PD Dr. Rainer
Wilhelm, Prof. Dr. Beate
Wrocklage, Dr. Christian

Klinischer Studienabschnitt:

Adeberg, Prof. Dr. Sebastian
Aeschimann-Huhn, Dr. Rahel
Aigner, Prof. Dr. Rene
Bartsch, Prof. Dr. Detlef K.
Bauer, Prof. Dr. Stefan
Becker, Prof. Dr. Annette
Becker, Prof. Dr. Katja
Becker, Prof. Dr. Stephan
Beeres, Prof. Dr. Dr. Martin
Besgen, Dr. Volker
Birk, Prof. Dr. Richard
Bösner, Prof. Dr. Stefan
Brandt, Dr. Dominique
Burchert, Prof. Dr. Andreas
Cabanel, Dr. Nicole
Chatzis, PD Dr. Georgios
Chung, Prof. Dr. Ho Ryun
de Cruppé, Prof. Dr. Werner
Derigs, Dr. Marcus
Divchev, Dr. Dimitar
Donner-Banzhof, Prof. Dr. Norbert
Duda, Dr. Volker
Eberle, PD Dr. Fabian
Engenhart-Cabillic, Prof. Dr. Rita
Falkenberg, PD Dr. Irina
Figiel, Dr. Jens
Fuchs-Winkelmann, Prof. Dr. Susanne
Ghazy, PD Dr. Tamer
Geisel, Dr. Tobias
Geisthoff, Prof. Dr. Urban
Gemsa, Prof. Dr. Diethard
Geraedts, Prof. Dr. Max
Geßner, PD Dr. Reinhard
Gress, Prof. Dr. Thomas
Greulich, Prof. Dr. Timm
Grgic, Prof. Dr. Ivica

Czubayko, Prof. Dr. Thomas
Denkert, Prof. Dr. Carsten
Helmprobst, Prof. Dr. Frederik
Hertl, Prof. Dr. Michael
Hey, Prof. Dr. Dr. Christiane
Hoch, PD Dr. Stephan
Hofmann, Prof. Dr. Rainer
Holzer, Prof. Dr. Katharina
Homm, Dr. Ulrike
Hoyer, Prof. Dr. Joachim
Huber, Prof. Dr. Dr. Johannes
Jacobssohn, Dr. Petra
Jansen, Prof. Dr. Andreas
Jansen, Dr. Malin
Jerrentrup, Dr. Andreas
Josephs, Dr. Dennis
Kalder, Prof. Dr. Matthias
Kalmus, Dr. Gerald
Kann, Prof. Dr. Dr. Peter
Kanngießer, Dr. Veit
Keber, Dr. Corinna
Kemmling, Prof. Dr. André
Kircher, Prof. Dr. Tilo
Kirschbaum, Prof. Dr. Andreas
Klemmer, Dr. Andreas
Kluge, Dr. Ina
Knake, Prof. Dr. Susanne
Köhler, Dr. Siegmund
Kömhoff, Prof. Dr Martin
Kruse, Prof. Dr. Johannes
Kühnert, Prof. Dr. Maritta
Leinweber, Dr. Barbara
Lohoff, Prof Dr. Michael
Loukas, Dr Orestis
Lüsebrink, PD Dr. Ulrich
Luster, Prof. Dr. Martin
Mahnken, Prof Dr. Andreas
Maisner, Prof Dr. Andrea
Mand, Dr. Nadine
Mandic, Prof Dr. Robert
Maurer, PD Dr. Elisabeth
Mayr, Prof. Dr. Andreas
Naumann, Marc
Neff, Prof. Dr. Dr. Andreas
Nenadić, Prof. Dr. Igor
Neubauer, Prof. Dr. Andreas
Nimsky, Prof. Dr. Christopher
Opitz, Dr. Egbert
Pagenstecher, Prof. Dr. Axel
Günther, Prof. Dr. Frank
Haberhausen, Dr. Michael
Pankuweit, Prof. Dr. Sabine
Paul, PD Dr. Christoph
Pedrosa, Prof. Dr. David
Pfützner, Prof. Dr. Wolfgang
Plant, Prof. Dr. Timothy David
Pöttgen, Dr. Steffen Tonio
Rastan, Prof. Dr. Ardawan J.
Renz, Prof. Dr. Harald
Ruchholtz, Prof. Dr. Steffen
Riera-Knorrenschild, Dr. Jorge
Roelcke, Prof. Dr. Volker
Saß, PD Dr. Benjamin
Schäfer, Prof. Dr. Jürgen
Schieffer, Prof. Dr. Bernhard
Schneider, Dr. Timo
Schu, Dr. Ulrich
Schulze, Prof. Dr. Stephan
Schumacher, Prof. Dr. Johannes
Seifart, PD. Dr. Carola
Seitz, Prof. Dr. Guido
Sekundo, Prof. Dr. Walter
Sevinc, Dr. Selim
Sommer, PD Dr. Frank
Stuck, Prof. Dr. Boris
Subtil, PD Dr. Florentine S. B.
Swaid, Dr. Zaher
Theiß, PD Dr. Ulrike
Thum, Dr. Andreas
Timmermann, Prof. Dr. Lars
Vahdad, PD Dr. Reza
Viniol, Prof. Dr. Annika
Vogelmeier, Prof. Dr. Claus
Vogt, Prof. Dr. Sebastian
Vojnar, Dr. Benjamin
Vorwerk, Prof. Dr. Hilke
Wack, Dr. Christina
Wagner, Prof. Dr. Uwe
Weber, Prof. Dr. Stephanie
Weske, Dr. Maria - Reha
Wiese, Dominik, Dr.
Wollenberg, Dr. Birgit
Worzfeld, Prof. Dr. Thomas
Wulf, Prof. Dr. Hinnerk
Wündisch, Prof. Dr. Thomas
Zentgraf, Dr. Michael
Ziller, Prof. Dr. Volker

8.2 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Engenhart-Cabillic, für die Möglichkeit, meine wissenschaftliche Arbeit in ihrer Klinik durchführen zu dürfen und die stets offene Unterstützung. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Adeberg für die fortwährende Förderung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen danken, die die Realisierung dieser Arbeit maßgeblich ermöglicht haben.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Labor der Strahlentherapie für die freundliche Aufnahme, die kollegiale Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft in allen Phasen dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich meine Doktormutter, Frau PD Dr. Ulrike Theiß, und auch Frau PD Dr. Florentine Subtil hervorheben, deren Engagement, Fachkenntnis und stetige Unterstützung einen entscheidenden Beitrag zum Gelingen dieser Dissertation geleistet haben. Zudem möchte ich Frau Leonie Piepke und Frau Stefanie Preising danken, die mir nicht nur tatkräftig, sondern auch menschlich stets zur Seite standen. Ihre Ermutigungen, ihr Humor und ihre Freundschaft haben mir in vielen Momenten Kraft gegeben.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Für sein großes Engagement bei der Ermöglichung dieser Dissertation, seine stets zeitnahen und hilfreichen Antworten auf meine Fragen, die beträchtliche Menge an Zeit, die er in meine Betreuung investiert hat, sowie den fachlichen wie auch persönlichen Austausch bin ich ihm sehr dankbar.

Zu guter Letzt danke ich von Herzen meiner Familie, insbesondere meinem Verlobten, Elias Edrich. Ohne ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihren Rückhalt und ihre Geduld wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.