Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Sebastian Adeberg

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Bedeutung der Homologen Rekombination für die Wirkung des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 auf eine kombinierte Behandlung von Kopf-Hals-Tumorzellen mit Cisplatin und Bestrahlung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Niklas Recknagel
aus Datteln

Marburg, 2024

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
13.03.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin:	Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner
Referentin:	Prof. Dr. Rita Engenhart-Cabillic
Korreferent:	Prof. Dr. Urban W. Geisthoff

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 7

Abbildungsverzeichnis 12

Tabellenverzeichnis 14

1. Einleitung 15

1.1 Kopf-Hals-Tumoren 15

1.1.1 Epidemiologie 15

1.1.2 Ätiologie und Karzinogenese 15

1.2 Therapie 17

1.2.1 Strahlentherapie 17

1.2.2 Radiochemotherapie 18

1.2.3 Prognose und Nebenwirkungen der Therapie 20

1.3 Strahlenbiologische Grundlagen 22

1.3.1 DNA-Schädigung 22

1.3.2 DNA-Reparatur 22

1.3.2.1 NHEJ 23

1.3.2.2 Homologe Rekombination 23

1.4 Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg 24

1.4.1 Der duale PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 25

1.5 Fragestellungen und Zielsetzung 28

2. Material und Methoden 29

2.1 Material 29

2.1.1 Geräte 29

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien 31

2.1.3 Standardlösungen, Medien und Puffer 34

2.1.4 Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot 37

2.1.5 siRNA 38

2.1.6 HNSCC-Zelllinien 38

2.1.7 Software 39

2.1.8 Verbrauchsmaterialien 40

2.2 Methoden 41

2.2.1 Versuchsablauf 41
2.2.2 Zellkultur 42
2.2.3 siRNA-Transfektion 43
2.2.4 Koloniebildungstest 45
2.2.5 Behandlung 47
2.2.5.1 Cisplatin 47
2.2.5.2 NVP-BEZ235 47
2.2.5.3 Bestrahlung 48
2.2.6 Western Blot 48
2.2.6.1 Herstellung der Proteinlysate 48
2.2.6.2 Gießen der Gele 49
2.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 49
2.2.6.4 Blot 50
2.2.6.5 Proteindetektion 51
2.2.7 Statistik und Datenanalyse 52
3. Ergebnisse 53
3.1 Heterogenität von HNSCC-Zelllinien 53
3.2 Etablierung der siRNA 54
3.3 Plattierungseffizienz unter Hemmung von Rad51 57
3.4 IC50-Bestimmung 59
3.5 Wirkung von BEZ235 62
3.6 Vorbehandlung mit BEZ235 führt zur Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit 63
3.7 Kombination von BEZ235, Cisplatin und Bestrahlung 66
4. Diskussion 71
4.1 HNSCC-Zelllinien zeigen heterogenes Wachstum 71
4.2 Hemmung von Rad51 mittels siRNA-Transfektion 71
4.3 Cisplatinempfindlichkeit der HVP-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien 74
4.4 Einfluss von BEZ235 auf die Cisplatinempfindlichkeit 75
4.5 Wirkung von BEZ235 in Kombination mit Cisplatin und Bestrahlung 77
4.6 Bedeutung des HPV-Status für die Homologe Rekombination 81
4.7 Klinische Relevanz und Ausblick 82
5. Zusammenfassung 84

6. Summary 86

7. Literaturverzeichnis 88

8. Anhang I

8.1 Curriculum Vitae I

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer/innen II

8.3 Danksagung III

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung IV

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	**ausgeschriebene Form**
°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
Akt	entspricht Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAL	Centre Antoine Lacassagne
CDDP	cis-Diammindichloridoplatin, Cisplatin
CDK	cyclin-dependent kinases, zyklinabhängige Kinasen
Ch	Chemotherapie
CHK1/2	checkpoint kinase proteins 1 and 2
cm	Centimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DDR	DNA damage response
DFS	disease free survival
dH_2O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, DNA-abhängige Proteinkinase
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
DSB	double-strand breaks, Doppelstrangbrüche
E6-AP	E6-associating protein
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGFR	epidermal growth factor receptor, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ERCC1	Excision Repair Cross Complementing Polypeptide-1
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	Grading, Differenzierung des Tumors
g	Gramm
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
Gy	Gray
h	Stunde
H2AX	Histonvariante des Histons H2A
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDC	high-dose Cisplatin
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks Zellen, aus einem Zervixkarzinom gewonnen
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humaner Papillomavirus
HR	Homologe Rekombination
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ICL	Intercrosslinks, Interstrang-Quervernetzungen
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IMRT	intensitätsmodulierte Radiotherapie
IR	irradiation, Bestrahlung
IRS-1	insulin receptor substrate 1
J	Joule
k	Kilo
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KOF	Körperoberfläche
L	Liter
LigIV	DNA-Ligase IV
Lipo	Lipofectamin 2000
M	molare Masse
m	männlich
mA	Milliampere

MEK	Methylethylketon
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
Mre11	meiotic recombination 11
mRNA	messenger RNA
MTD	maximum tolerated dose, maximal tolerierte Dosis
mTOR	mammalian target of rapamycin
MW	molecular weight, Molekulargewicht
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
neg.	negativ
NER	Nukleotid-Exizionsreparatur
NHEJ	nonhomologous end-joining, nicht-homologe Endverknüpfung, nicht-homologes Endjoining
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NSCLC	non-small-cellular lung cancer
NT	Non-Target
o.D.	ohne Datum
OPSCC	oropharyngeal squamous cell carcinoma
p53	Protein p-53
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDK1	phosphoinositide-dependent Kinase-1, Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PE	Plattierungseffizienz
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIC	Proteaseinhibitoren Cocktail 5
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pos.	positiv

PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
Rad51	DNA repair protein Rad51 homolog 1
Rb	Retinoblastom-Protein
RCT	Radiochemotherapie
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RIPA	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell-Park Memorial Institute
RT	Radiotherapie
SDS	sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
SF	survival fraction
si	small interfering
sog.	sogenannt
SSB	single-strand breaks, Einzelstrangbüche
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNM	Primärtumor Lymphknoten Metastasen
Tr.	Tropfen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tsc2	Tuberosis sclerosis Protein 2
u.b.	unbekannt
UD	Heinrich Heine University Düsseldorf
UM	University of Michigan
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VM	Vollmedium
vs.	versus
w	weiblich
Wip1	wild-type p53-induced phosphatase 1
wt%	weight percent

XLF	XRCC4-like factor
XPF	xeroderma protein F
XRCC4	X-Ray Repair Cross Complementing 4
z.B.	zum Beispiel
µ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellzyklusderegulierung über die Proteine E6 und E7 bei Infektion mit HPV, Abb. modifiziert nach Leemans (Leemans et al., 2011) 16
Abbildung 2: Aktivierung (A) und Wirkmechanismus (B) des Cisplatins, Abb. modifiziert nach Rocha (Rocha et al., 2018) 20
Abbildung 3: Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und dessen Inhibition durch BEZ235, Abb. modifiziert nach Waßmuth (Waßmuth, 2020) 26
Abbildung 4: Effekt von Cisplatin nach Vorbehandlung mit und ohne BEZ235 bei HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien (Subtil et al., 2022) 27
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Koloniebildungstests 41
Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahmen von HPV-negativen (Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3) und HPV-positiven (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien im Koloniebildungstest 54
Abbildung 7: Basale Proteinexpression von Rad51 an nativen HNSCC-Zelllinien 54
Abbildung 8: Western Blot für die Konzentrationsbestimmung und Wirkdauer der Rad51-siRNA und NT-siRNA an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie Cal-33 55
Abbildung 9: Western Blot für die Konzentrationsbestimmung und Wirkdauer der Rad51-siRNA und NT-siRNA an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie UM-SCC-11b 56
Abbildung 10: Western Blot für die Konzentrationsbestimmung der Rad51-siRNA und NT-siRNA an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie UM-SCC-3 sowie an den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2 57
Abbildung 11: Plattierungseffizienz von HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien 58
Abbildung 12: Cisplatinempfindlichkeit von HPV-negativen HNSCC-Zelllinien (Cal-33, UM-SCC-3, UM-SCC-11b) 60
Abbildung 13: Cisplatinempfindlichkeit von HPV-positiven HNSCC-Zelllinien (UM-SCC-47, UD-SCC-2) sowie die IC50-Werte von Cisplatin der HPV-negativen (Cal-33, UM-SCC-3, UM-SCC-11b) und der HPV-positiven (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien 61
Abbildung 14: Wirkung von BEZ235 auf native HNSCC-Zelllinien 62
Abbildung 15: Wirkung von BEZ235 in Kombination mit Cisplatin auf HPV-negative und HPV-positive HNSCC-Zelllinien 64

Abbildung 16: Wirkung von BEZ235 in Kombination mit Cisplatin auf HPV-negative HNSCC-Zelllinien (Cal-33, UM-SCC-3, UM-SCC-11b) bei einer Hemmung von Rad51 ... 65
Abbildung 17: Wirkung von Cisplatin auf das zelluläre Überleben mit 2 Gy Photonenstrahlen mit und ohne Vorbehandlung durch BEZ235 bei HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien 67
Abbildung 18: Wirkung von Cisplatin auf das zelluläre Überleben mit 2 Gy Photonenstrahlen mit und ohne Vorbehandlung durch BEZ235 bei HPV-negativen HNSCC-Zelllinien bei Transfektion mit NT- oder Rad51-siRNA 69
Abbildung 19: Relative Rad51-Expression in nativen HNSCC-Zelllinien 73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte 29
Tabelle 2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien .. 31
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Standardlösungen, Medien und Puffer 34
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper..... 37
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten siRNA..... 38
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten HNSCC-Zelllinien 39
Tabelle 7: Alphabetische Auflistung der verwendeten Software..... 39
Tabelle 8: Alphabetische Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialen 40
Tabelle 9: Anzahl der ausgesäten Zellen pro 9,6 cm^2 für die Transfektion..... 44

1. Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Tumoren

1.1.1 Epidemiologie

Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches verzeichnen mit einer Inzidenz von 890.000 Fällen pro Jahr weltweit die sechsthäufigste maligne Krebserkrankung des Menschen, welche jährlich zu über 450.000 Todesfällen führt (Johnson et al., 2020). Die Inzidenz in Europa beträgt 36 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner bei Männern, bei Frauen 7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Keilholz, 2012). Diese Tumoren sind mit über 90% histopathologisch den Plattenepithelkarzinomen (head and neck squamous cell carcinoma - HNSCC) zuzuordnen und entstehen aus dem mukosalen Epithel der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx (Johnson et al., 2020; Vigneswaran & Williams, 2014). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei den nicht-Virus assoziierten Tumoren bei 66 Jahren, während Patienten mit einer oralen Infektion durch das humane Papillomavirus (HPV) im Alter von ca. 53 Jahren erkranken (Johnson et al., 2020).

1.1.2 Ätiologie und Karzinogenese

Bei den HNSCC werden ätiologisch zwei Entitäten unterschieden. Zum einen die sogenannten HPV-negativen HNSCC, welche im späteren Lebensalter auftreten und als Ursache Risikofaktoren wie z.B. den Konsum von Alkohol und Tabak haben, und zum anderen die HPV-positiven HNSCC (Gillison et al., 2012). Bei diesen HPV-positiven HNSCC liegt eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus vor, meist vom Typ 16, welcher bei über 90% der HPV-assoziierten OPSCC (oropharyngeal squamous cell carcinoma) nachweisbar ist (Wittekindt et al., 2012).

Bei den HPV-positiven HNSCC kommt es nach Integration der doppelsträngigen DNA des humanen Papillomavirus in die Wirtszellen zu der Expression der Virusonkogene (Proteine des HPV) E6 und E7. Dabei inaktiviert das Protein E6 p53, indem Protein E6 einen Komplex mit E6-AP sowie p53 bildet, was zur Ubiquitin-vermittelten Degradation des p53 im Proteasom führt (Johnson et al., 2020). Über das Protein E7 wird das Retinoblastom-Protein (Rb) gebunden, wodurch dessen Funktion als Zellzyklusregulator

entfällt und der Transkriptionsfaktor E2F gefördert wird (Johnson et al., 2020; Mesri et al., 2014). Dieses E2F wiederum lässt die Zelle im Rahmen des Zellzyklus den G1-S-Checkpoint überschreiten, sodass diese unkontrolliert in die S-Phase des Zellzyklus fortschreiten kann (Johnson et al., 2020). Das Protein p16 wird zudem überexprimiert, da das durch E7 gebundene Rb seine physiologische Funktion im Sinne einer negativen Rückkopplung nicht mehr erfüllen kann (Grønhøj Larsen et al., 2014; Stephen et al., 2013). Damit hat sich p16 als zuverlässiger Marker für die Diagnosestellung HPV-positiver HNSCC im Oropharynx herausgestellt und gilt als Surrogatmarker für HPV-assoziierte OPSCC (Mylly et al., 2022).

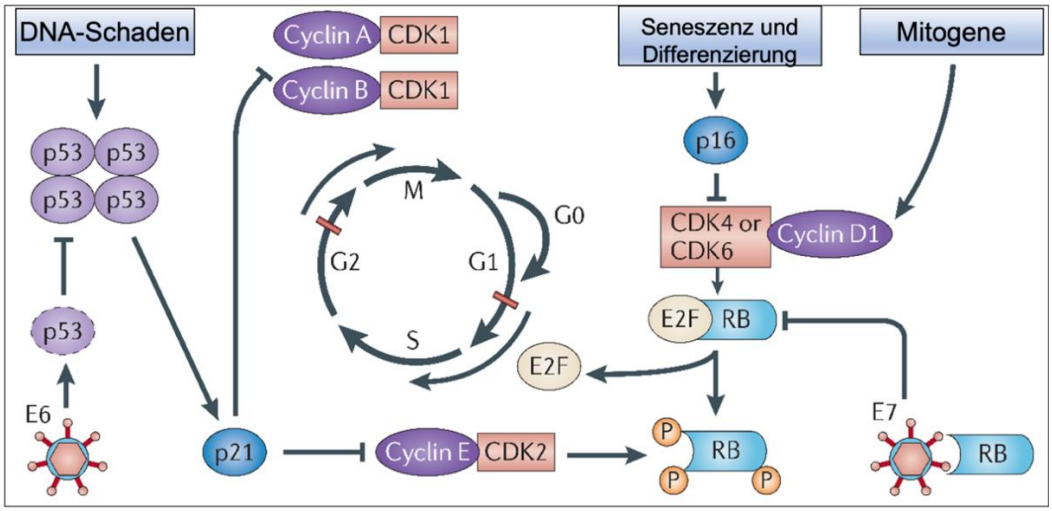

Abbildung 1: Zellzyklusderegulierung über die Proteine E6 und E7 bei Infektion mit HPV, Abb. modifiziert nach Leemans (Leemans et al., 2011)

Bei den HPV-negativen HNSCC sind die dominierenden Risikofaktoren der Konsum von Alkohol sowie Tabak (Wittekindt et al., 2012) und haben bei 75% der Patienten mit einem HNSCC eine tragende Rolle als Risikofaktor (Blot et al., 1988). Die Karzinogenese der HPV-negativen HNSCC folgt dem mehrstufigen Prozess der Tumorentstehung durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen (Hanahan & Weinberg, 2011). Es kommt dabei zur Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen (Wittekindt et al., 2012).

Weiterhin haben bei der Tumorinduktion der HNSCC auch verschiedene Signalwege eine Bedeutung. So kann bei mehr als 80% der HNSCC nachgewiesen werden, dass der sog. EGFR-Signalweg aufgrund von Mutationen hochreguliert ist (Leemans et al., 2011). Der

EGFR (epidermal growth factor receptor) gehört zur Familie der Tyrosinkinaserezeptoren und wird mit Zellproliferation sowie Inhibition der Apoptose assoziiert (Zimmermann et al., 2006). Als weiterer wichtiger Signalweg für die Karzinogenese von HNSCC fungiert der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg (Kapitel 1.4).

1.2 Therapie

Die leitliniengerechte Behandlung des HNSCC ist in der Regel eine multimodale Therapie (Stöver & Feyer, 2018). Zu den wichtigsten Komponenten gehören die Resektion, die Radiotherapie (RT), die Chemotherapie sowie die Antikörpertherapie. In frühen Stadien (I/II) werden die HNSCC meistens operativ entfernt oder definitiv radiotherapiert. In fortgeschrittenen Stadien erfolgt in der Regel eine primäre Radiochemotherapie (RCT) oder adjuvante Radio(chemo)therapie. Im fernmetastasierten Stadium wird ein individuelles Konzept für den Patienten angewendet (Stöver & Feyer, 2018).

1.2.1 Strahlentherapie

Die Radiotherapie ist ein wichtiger Baustein in der Therapie von malignen Tumoren. Bei ca. 50% der Patienten mit einer malignen Tumorerkrankung kommt sie in kurativer Intention zum Einsatz, wobei Heilungsraten von bis zu 40% erreicht werden können (Maier et al., 2016). Das Ziel der Radiotherapie ist es, eine lokale Tumorkontrolle bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes zu erreichen, sodass kein Rezidiv entstehen kann (Dikomey et al., 2012). Physikalisch handelt es sich hierbei um Photonenstrahlung und wird in der Einheit Gray (Gy) angegeben (Wang et al., 2019). Diese kann die DNA sowohl über direkte als auch indirekte Ionisation schädigen. Bei der direkten Ionisation werden Elektronen in den Atomen der DNA angeregt und emittiert, sodass kovalente Bindungen aufbrechen (Borrego-Soto et al., 2015; Dikomey et al., 2012). Im Rahmen der indirekten Ionisation wird die Bildung von reactive oxygen species (ROS) und anderen freien Radikalen wie H_2O_2 oder Hydroxyl-Radikalen (OH-Radikale) zur DNA-Schädigung begünstigt (Borrego-Soto et al., 2015). Als Folge entstehen an der DNA neben Basenschäden sowohl Einzelstrang- (SSB) als auch Doppelstrangbrüche (DSB). Dabei ist statistisch 1 Gy in der Lage, 10^5 Ionisationen anzuregen und damit 2000 Basenschäden, 1000 SSB sowie 20-40 DSB zu induzieren (Dikomey et al., 2012).

Risikoadaptiert werden bei den HNSCC Bestrahlungsdosen zwischen 50-70 Gy angewendet, die in der Regel konventionell fraktioniert werden (5 Fraktionen/Woche, 2 Gy/Fraktion) (Giordano, 2019). Um die Nebenwirkungen zu reduzieren, wird die sog. intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) verwendet. Durch diese Technik kann die Strahlung optimal im Tumor appliziert werden und gleichzeitig das gesunde Gewebe maximal geschont werden (Rathod et al., 2013; Tribius & Bergelt, 2011). So konnte die SEER-Medicare-Analyse zeigen, dass die Gesamtmortalität signifikant reduziert wird, wenn statt der 3D-konformalen Bestrahlungstechnik die IMRT angewandt wird (Giordano, 2019).

1.2.2 Radiochemotherapie

Die Kombination der Radiotherapie mit einem Chemotherapeutikum ist bei der Behandlung von HNSCC in fortgeschrittenen Stadien gängig (Stöver & Feyer, 2018) und führt bei simultaner Gabe nach Daten einer Metaanalyse zu einem signifikant höheren Gesamtüberleben (Lacas et al., 2021). Es wird hierbei zwischen der primären Radiochemotherapie sowie der adjuvanten Radiochemotherapie nach Operation unterschieden (Stöver & Feyer, 2018). Die adjuvante RCT wird verwendet, wenn HNSCC in den Stadien I/II nach der Operation Risikofaktoren wie eine Non-in-sano-Resektion, kapselüberschreitenden Lymphknotenbefall, perineurales Tumorwachstum oder Lymphgefäßinvasion aufweisen (Giordano, 2019; Stöver & Feyer, 2018). In den Stadien III/IV ist die postoperative RCT stets indiziert. Die primäre RCT hingegen wird bei den HNSCC angewendet, wenn sie in einem fortgeschrittenen Stadium (T3/T4, N2/N3) diagnostiziert werden und funktionell nicht operabel sind (Stöver & Feyer, 2018).

Als Standardchemotherapie hat sich Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin, CDDP) in unterschiedlichen Verabreichungsschemata bewährt. Das sog. high-dose Cisplatin (HDC) wird mit einer kumulativen Dosis von 100 mg/m^2 Körperoberfläche (KOF) alle drei Wochen angewendet (Johnson et al., 2020; Szturz et al., 2017). Dieses verbessert in Kombination mit der RT die lokoregionäre Kontrolle des Tumors sowie das Überleben der Patienten (Bauml et al., 2019). Auch das weekly-Konzept mit einer Cisplatin-Dosis von 40 mg/m^2 KOF ist ein etabliertes Schema bei der Behandlung fortgeschrittener HNSCC und ist der HDC bezüglich des Gesamtüberlebens gleichwertig (Bauml et al.,

2019). Weitere Substanzen wie Carboplatin, 5-Fluoruracil (5-FU), Mitomycin C, Docetaxel und Paclitaxel sind ebenfalls für fortgeschrittene HNSCC im Rahmen der RCT zugelassen und zeigen gegenüber der alleinigen Radiotherapie einen Vorteil für das Gesamtüberleben (Budach et al., 2006; Stöver & Feyer, 2018).
Bei Kontraindikationen gegen platinbasierte Chemotherapeutika wird der EGFR-Inhibitor Cetuximab angewendet. Im Vergleich zu der Cisplatin-basierten RCT ist die Radiotherapie mit Cetuximab bezüglich des Gesamtüberlebens unterlegen, zeigte jedoch gegenüber der alleinigen Radiotherapie einen Benefit für das mediane Gesamtüberleben (Giordano, 2019; Li et al., 2023).

Das Cisplatin wird entweder über passive Diffusion oder über Influx-Pumpen in die Zellen geschleust (Florea & Büsselberg, 2011). In der Zelle angekommen, wird Cisplatin zunächst durch Hydrolyse der Chloridatome aktiviert (Abb. 2) (Dasari & Tchounwou, 2014). In dem nun elektrophilen Zustand agiert es mit zellulären Komponenten wie DNA, RNA, Proteinen und Membranlipiden (Dasari & Tchounwou, 2014). Dabei interagiert es vor allem mit der DNA. Cisplatin bindet bevorzugt über das Stickstoffatom in Position 7 von Guanin und Adenosin, wodurch Intrastrang- sowie Interstrang-Quervernetzungen (ICL) entstehen (Chen et al., 2016; Jamieson & Lippard, 1999; Seifert, 2018). Den so entstandenen DNA-Addukten ist es damit nicht möglich, in der S-Phase repliziert zu werden, da eine sterische Behinderung vorliegt (Deans & West, 2011). Als Konsequenz wird der Zellzyklus gestoppt und die Apoptose ausgelöst (Dasari & Tchounwou, 2014).

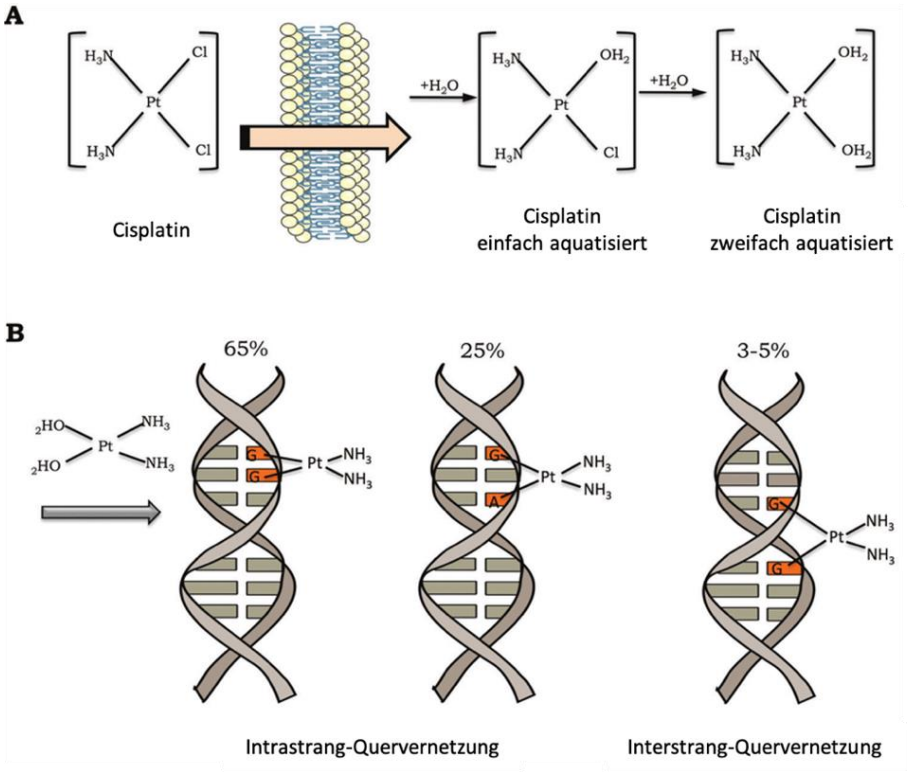

Abbildung 2: Aktivierung (A) und Wirkmechanismus (B) des Cisplatins, Abb. modifiziert nach Rocha (Rocha et al., 2018)

1.2.3 Prognose und Nebenwirkungen der Therapie

Obwohl die HPV-positiven HNSCC eine bessere Prognose aufzeigen als die HPV-negativen HNSCC (Linge et al., 2018; Lohaus et al., 2014), werden beide Entitäten noch immer gleich behandelt (Rühle et al., 2021). Die 5-Jahres-Überlebensrate für die HPV-positiven HNSCC liegt bei circa 85%, während sie bei den HPV-negativen HNSCC ungefähr 50% beträgt (Linge et al., 2018; Lohaus et al., 2014). In einer Studie von Lassen et al. konnte zudem gezeigt werden, dass die HPV-positiven HNSCC ein besseres Ansprechen nach RT als die HPV-negativen HNSCC aufweisen (Lassen et al., 2009). Der Surrogatmarker p16 dient somit auch als prognostischer Marker (Gillison et al., 2000; Klussmann et al., 2009). Strahlenbiologische Untersuchungen zeigten, dass sich die klinisch beobachtete gesteigerte Strahlenempfindlichkeit auch in Zellkulturuntersuchungen nachweisen lässt (Arenz et al., 2014; Rieckmann et al., 2013). So konnte eine deutlich erhöhte zelluläre Strahlempfindlichkeit der HPV-positiven Zelllinien im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien beobachtet werden. Ursächlich hierfür ist eine verminderte DSB-Reparatur. Es zeigten sich mehr residuale DSB 24 h nach Bestrahlung in HPV-positiven Zelllinien als in HPV-negativen Zelllinien (Arenz et al., 2014;

Rieckmann et al., 2013). Die verminderte DSB-Reparatur liegt wohl an einem Defekt in der homologen Rekombination, einem wichtigen Reparaturweg für DSB (Ziemann et al., 2017). So ließen sich in den HPV-positiven Zelllinien nach Bestrahlung nahezu keine Rad51-Foci im Gegensatz zu HPV-negativen Zelllinien nachweisen, welche ihren typischen Peak nach etwa 6 h nach Bestrahlung zeigen (Ziemann et al., 2017). Rad51 ist ein wichtiges Protein der homologen Rekombination (Kapitel 1.3.2.2).

Trotz besserer Prognose für die HPV-positiven HNSCC im Vergleich zu den HPV-negativen HNSCC ist aufgrund der fehlenden Differenzierung in der Therapie mit ähnlichen Nebenwirkungen zu rechnen.

Bei der Radiotherapie wird zwischen den sog. Akuttoxizitäten und Langzeittoxizitäten unterschieden. Die Akuttoxizitäten treten bereits unter der Therapie auf und lassen in der Regel innerhalb von Wochen bis Monaten nach (Strojan et al., 2017). Dazu gehören beispielsweise Abgeschlagenheit, eine orale Mukositis, Dysphagie, Geschmacksstörungen sowie eine Dermatitis (Stöver & Feyer, 2018; Zecha et al., 2016). Zu den häufigsten Langzeittoxizitäten zählen unter anderem Xerostomie, Hyposalivation, Trismus, Neuropathien, Knochennekrosen, mukosale Infektionen, Dysphagie, Fibrose der Muskulatur sowie Lymphödeme (Brook, 2020).

Das Cisplatin ist unter anderem nephrotoxisch, ototoxisch sowie myelosuppressiv und versursacht neben Haarausfall auch Übelkeit und Erbrechen (Dasari & Tchounwou, 2014; Dille et al., 2012; Oun et al., 2018). Es konnte zudem beobachtet werden, dass das Cisplatin in Kombination mit der Radiotherapie vermehrt zu Leukopenie, Neutropenie sowie akutem Nierenversagen führt (Huang et al., 2016). Diese Nebenwirkungen haben einen starken Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten, sodass die Notwendigkeit einer Optimierung der Therapie besteht (Porceddu et al., 2019; Subtil et al., 2022).

1.3 Strahlenbiologische Grundlagen

1.3.1 DNA-Schädigung

Die DNA kann durch verschiedene Noxen wie zum Beispiel einer Bestrahlung geschädigt werden. Im Zuge dieser Schädigung entstehen, wie bereits beschrieben, an der DNA Einzelstrang- (SSB) und Doppelstrangbrüche (DSB). Zu 95% sind dies SSB, welche durch eine Bestrahlung induziert werden (Zhou & Parsons, 2020). Diese sind für die Zelle leichter zu reparieren, da im Gegensatz zu den DSB eine intakte Matrize vorhanden ist (Dikomey et al., 2012). Deutlich komplizierter ist für die Zelle die Reparatur der DSB. Nicht- oder falschreparierte DSB können zu chromosomalen Translokationen und zum Zelltod durch die Bestrahlung führen (Dikomey et al., 2012; Mahaney et al., 2009). Dies stellt den wichtigsten Mechanismus des Zelltods für Tumorzellen dar, weil durch häufige Mutationen von p53 in Tumorzellen sowohl die strahleninduzierte Apoptose als auch der G1-Arrest nicht funktionieren (Dikomey et al., 2012; Hu et al., 2021).

1.3.2 DNA-Reparatur

Beim Auftreten eines DNA-Schadens wird eine Enzymkaskade, die sog. DNA damage response (DDR), aktiviert, an dessen Ende die Reparatur der SSB und DSB steht (Chatterjee & Walker, 2017; Dikomey et al., 2012). Zur Reparatur der DSB stehen der Zelle zwei wichtige Reparaturwege, nämlich das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR), zur Verfügung (Dikomey et al., 2012). Als Alternativen zum NHEJ und zur HR existieren das Single-Strand-Annealing (SSA) sowie das alternative NHEJ.

Das System der Reparatur der DSB folgt einem streng hierarchischen System mit dem Ziel, die DSB fehlerfrei zu reparieren. In Tumoren ist diese Hierarchie oft gestört. So konnten unter anderem Defekte im DDR oder auch eine Überexpression von Onkogenen beobachtet werden (Dikomey et al., 2012).

1.3.2.1 NHEJ

Das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) stellt einen der zentralen Reparaturwege für DSB dar und verbindet zusammengefasst die entstandenen DNA-Enden des DSB miteinander (Dikomey et al., 2012; Schwarz, 2021). Es benötigt im Gegensatz zur HR keine Sequenzhomologie und kann deswegen in jeder Zellzyklusphase Schäden an der DNA mit einer schnellen Kinetik beheben. Über das NHEJ ist es möglich, 80% der durch Strahlen erzeugten DSB zu reparieren (Dikomey et al., 2012). Dieses findet vor allem in der G0- und G1-Phase des Zellzyklus statt, ist prinzipiell aber im gesamten Zellzyklus vorhanden (Arnoult et al., 2017). Allerdings ist dieser Reparaturweg auch für Fehler anfällig, da im Zuge der Reparatur aufgrund der fehlenden homologen Sequenz Nukleotide hinzugefügt oder verloren gehen können. Inhibiert man das NHEJ, wird beobachtet, dass die Reparaturkapazität abnimmt und damit die Strahlensensibilität erhöht wird (Dikomey 2012).

1.3.2.2 Homologe Rekombination

Ein wichtiger Reparaturweg neben dem NHEJ für die DSB-Reparatur ist die homologe Rekombination (Wright et al., 2018). Diese kann nur in der späten S- und frühen G2-Phase stattfinden und macht 20% der DSB-Reparaturwege in Zellen aus, da bei der HR das intakte Schwesterchromatid benötigt wird. Im Gegensatz zum NHEJ verläuft die HR fehlerfrei (Dikomey et al., 2012; Sanford-Crane et al., 2018).

Nennenswerte Proteine der HR sind unter anderem die Tumorsuppressoren BRCA1 und BRCA2 sowie Rad51. Unter Mitwirkung und Förderung von BRCA1 und BRCA2 bindet Rad51 die einzelsträngige DNA und sucht das Schwesterchromatid nach homologen Sequenzen ab (Dikomey et al., 2012; Liu & Lu, 2020; Prakash et al., 2015; Zhou & Parsons, 2020). Hat Rad51 die homologe Sequenz gefunden, wird die fehlende DNA mittels DNA-Polymerasen vom 3‘-Ende aus synthetisiert und über die DNA-Ligase I verknüpft. Der neue Strang trennt sich von der Donor-Matrize und bindet anschließend an seinen ursprünglichen Strang (Dikomey et al., 2016).

1.4 Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR)-Signalweg ist physiologisch in allen Wirbeltieren vorhanden und fördert das Wachstum sowie das Überleben von Zellen (Johnson et al., 2017). Er stellt bezüglich der Karzinogenese einen entscheidenden Signalweg bei verschiedenen Tumorentitäten dar (Hsu et al., 2018) und ist bei ca. 62% der HNSCC aktiviert (Iglesias-Bartolome et al., 2013; Lui et al., 2013).

Die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges kann über verschiedene Stimuli wie zum Beispiel den EGFR-Rezeptor erfolgen (Ojeda et al., 2011). Aktivierte Rezeptoren rekrutieren die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) über das Adapterprotein IRS-1 (insulin receptor substrate 1) oder über regulatorische Untereinheiten (Hemmings & Restuccia, 2012). Die PI3K katalysiert im Folgenden die Reaktion von Phosphatidylinositol-4,4-bisphosphat (PIP_2), einem Protein der Zellmembran, zum second messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3) (Porta et al., 2014). PIP3 bindet die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1, phosphoinositide-dependent Kinase-1) sowie die Proteinkinase B (PKB, Akt) an der Zellmembran (Hemmings & Restuccia, 2012). Die PDK1 phosphoryliert Akt am Threonin 308, woraufhin Akt partiell aktiviert ist. Durch eine weitere Phosphorylierung am Serin473 durch mTOR2 im Komplex mit dem Enzym Rictor (mTORC2) wird Akt vollständig aktiviert (Hemmings & Restuccia, 2012; Schötz et al., 2020). Als Antagonist fungiert das Enzym PTEN (phosphtase and tensin homolog), indem es PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert, wodurch die Aktivierung von PDK1 und Akt unterdrückt wird (Paplomata & O'Regan, 2014).

Akt phosphoryliert im weiteren Signalweg das Tuberosis sclerosis Protein 2 (Tsc2), das damit seinen inhibitorischen Effekt auf Rheb verliert (Inoki et al., 2003). Rheb kann nun mTOR mit Raptor im Komplex 1 (mTORC1) aktivieren (Johnson et al., 2017). Der mTORC1 stimuliert das Zellwachstum durch Förderung der Ribosomenbildung sowie der Proteinsynthese. Er hemmt gleichzeitig auch den Proteinabbau (Johnson et al., 2017).

Akt interagiert weiterhin auch mit verschiedenen Proteinkinasen (DNA-PKcs) und fördert so deren Phosphorylierung am Serin2056, wodurch vermehrt das NHEJ zur DSB-Reparatur stattfindet (Toulany et al., 2012).

1.4.1 Der duale PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235

Als medikamentöser Ansatz in Forschung und klinischen Studien wird NVP-BEZ235 (BEZ235, Dactolisib) angewendet. Dieses ist ein Imidazochinolinderivat, welches den oben beschriebenen PI3K/Akt/mTOR-Signalweg hemmt, indem es als dualer Inhibitor die Enzyme PI3K und mTOR blockiert (Luo et al., 2019). Dazu bindet BEZ235 an die Adenosin-Triphosphat-Bindungsstelle im katalytischen Zentrum der Enzyme (Hsu et al., 2018).

Für BEZ235 konnte bereits in vitro gezeigt werden, dass es das Wachstum von soliden Tumoren wie zum Beispiel Glioblastomen oder Lungentumoren hemmt (Wang et al., 2013; Xu et al., 2011). In einer Phase-I/Ib-Studie bei Patienten mit soliden Tumoren oder fortgeschrittenen Mammakarzinomen wurde BEZ235 gegeben, um die maximal tolerierte Dosis (MTD) zu ermitteln (Rodon et al., 2018). In dieser Studie wurde eine MTD von 1200 mg pro Tag angegeben. In höheren Dosisbereichen (> 400 mg) traten gehäuft Diarrhöen, Übelkeit sowie Erbrechen auf (Rodon et al., 2018). Auch Toyoda et al. konnten in einer Phase-I-Studie bei japanischen Patienten mit soliden Tumoren zeigen, dass BEZ235 in einer Dosierung von 1400 mg zu Thrombozytopenien Grad 3/4 führte, weswegen die Dosis nicht weiter gesteigert wurde (Toyoda et al., 2019) (NCT01195376).

In einer randomisierten Phase-II-Studie wurde BEZ235 gegen den mTOR-Inhibitor Everolimus bei fortgeschrittenen neuroendokrinen Tumoren des Pankreas angewendet (Salazar et al., 2018) (NCT01628913). Dabei zeigte BEZ235 im Vergleich zu Everolimus klinisch keine gesteigerte Wirksamkeit. Zu den häufigen Nebenwirkungen unter der Therapie mit BEZ235 zählten beispielsweise Diarrhö (90,3%), Stomatitis (74,2%) und Übelkeit (54,8%) (Salazar et al., 2018).

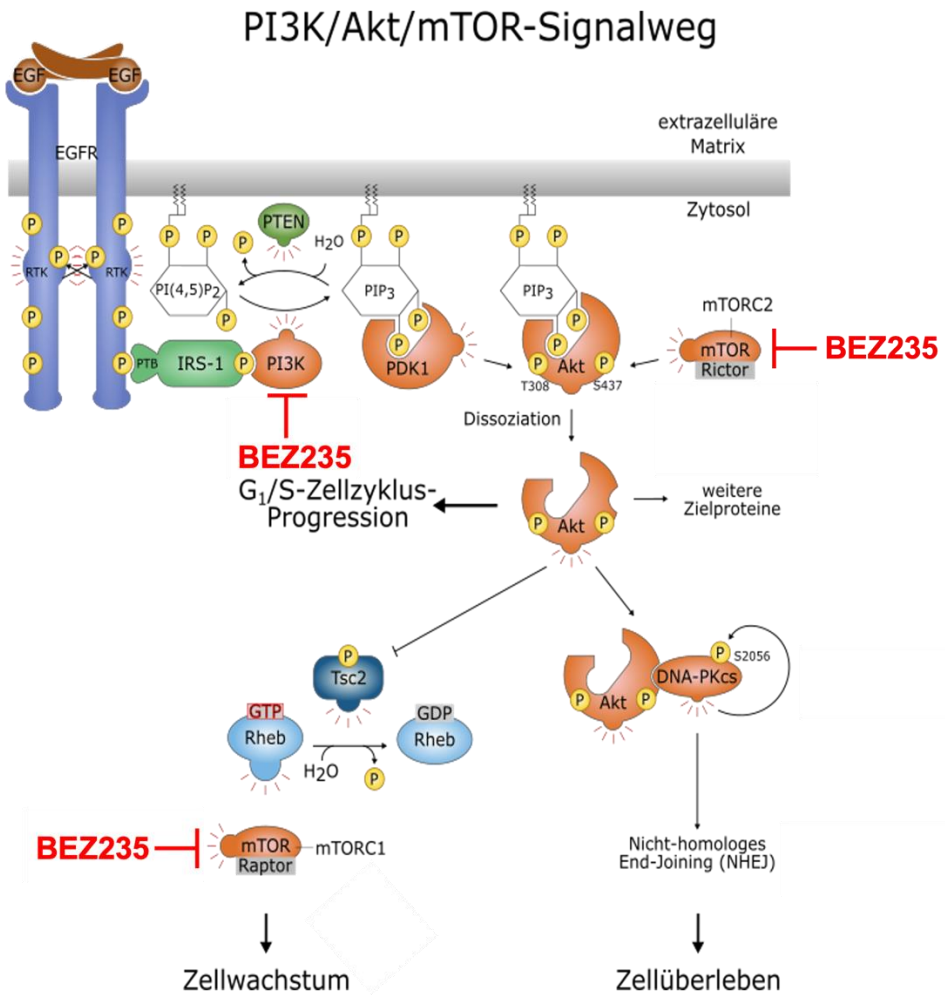

Abbildung 3: Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und dessen Inhibition durch BEZ235, Abb. modifiziert nach Waßmuth (Waßmuth, 2020)

Wie Schötz et al. aus der Arbeitsgruppe erstmalig zeigen konnten, führt die Vorbehandlung mit BEZ235 bei HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien zu einer gesteigerten Strahlensensibilisierung (Schötz et al., 2020). Diese Sensibilisierung lässt sich auf eine Inhibition des NHEJ und damit der DSB-Reparatur zurückführen. Sie konnten mittels Immunfluoreszenz zeigen, dass nach Vorbehandlung mit BEZ235 und anschließender RT mehr residuale DSB in der G1-Phase vorhanden waren. So fand sich in der G1-Phase auch die stärkste Strahlensensibilisierung, da in dieser Phase die meisten DSB-Reparaturen durch das NHEJ bewerkstelligt werden (Schötz et al., 2020). Die radiosensibilisierende Wirkung von BEZ235 konnte auch an anderen Tumorentitäten beobachtet werden, darunter Glioblastome, Lungen- sowie Mammakarzinome (Kuger et al., 2014; Wang et al., 2013; Xu et al., 2011).

In unserer Publikation haben wir für verschiedene HNSCC-Zelllinien die IC50-Konzentrationen (mittlere inhibitorische Konzentration) von Cisplatin bestimmt. Bei bekannter IC50 wurde jede Zelllinie mit BEZ235 50 nM vorbehandelt. Wir konnten zeigen, dass die Cisplatinempfindlichkeit der HPV-positiven HNSCC-Zelllinien bei Vorbehandlung mit BEZ235 gesteigert werden kann (Abb. 4) (Subtil et al., 2022). Dies ließ sich bei den HPV-negativen Zelllinien hingegen nicht beobachten. Sie zeigten ein unverändertes zelluläres Überleben im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit der jeweiligen IC50 von Cisplatin. Eine Ausnahme bildet die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-11b, welche sensibel auf die Kombination aus BEZ235 und Cisplatin reagiert (Subtil et al., 2022). Ein möglicher Ansatzpunkt für eine Therapiedeeskalation wäre demnach, die HPV-negativen HNSCC-Zelllinien für die Kombination aus BEZ235 und Cisplatin zu sensibilisieren, um so das nebenwirkungsreiche Cisplatin einzusparen.

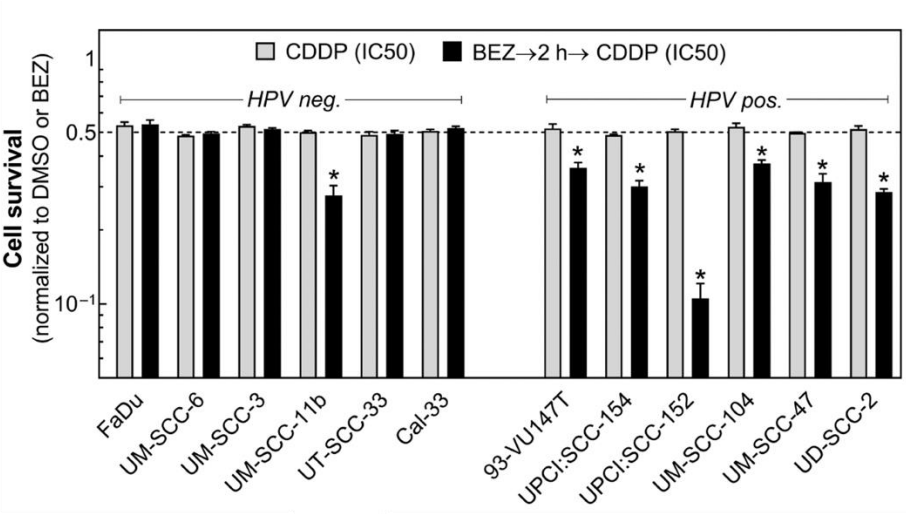

Abbildung 4: Effekt von Cisplatin nach Vorbehandlung mit und ohne BEZ235 bei HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien (Subtil et al., 2022)

Dargestellt sind die Überlebensfraktion (Cell survival) von HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien im Koloniebildungstest nach Behandlung mit Cisplatin (CDDP) oder der Kombination aus BEZ235 (BEZ) und Cisplatin. Als Konzentration des Cisplatins wurden die von Subtil et. al ermittelten IC50-Werte verwendet. Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardabweichung, n > 3, * P = 0,05.

1.5 Fragestellungen und Zielsetzung

Die starken Nebenwirkungen unter der Therapie sowie die unterschiedliche Prognose der HPV-negativen HNSCC im Vergleich zu den HPV-positiven HNSCC machen eine Optimierung der Therapie notwendig. Wegweisend könnte die Hemmung der homologen Rekombination bei den HPV-negativen HNSCC sein, um so einen wichtigen Reparaturweg für DSB auszuschalten. Sollte sich weiterhin zeigen, dass der Einsatz von BEZ235 in Kombination mit Cisplatin und einer Photonenstrahlung zu einer signifikanten Hemmung des zellulären Überlebens führt, könnte dies eine Deeskalation der Therapie von HNSCC-Tumoren hinsichtlich einer geringeren Dosis an Cisplatin ermöglichen und damit zu einer Reduktion der Nebenwirkungen führen.

Folgende Fragestellungen sollten im Einzelnen beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede bezüglich der Cisplatinempfindlichkeit im zellulären Überleben von verschiedenen HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zelllinien?
2. Lässt sich mittels siRNA-Technik Rad51 (ein wichtiges Reparaturprotein der homologen Rekombination) in verschiedenen HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zelllinien zuverlässig herabregulieren?
3. Beeinflusst die Hemmung von Rad51 die Cisplatinempfindlichkeit im zellulären Überleben von verschiedenen HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zelllinien?
4. Wie beeinflusst die Vorbehandlung mit BEZ235 das zelluläre Überleben mit/ohne Rad51-Hemmung in verschiedenen HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zelllinien?
5. Wie beeinflusst die Vorbehandlung mit BEZ235 mit/ohne Rad51-Hemmung in Kombination mit Cisplatin und/oder einer Photonenbestrahlung das zelluläre Überleben in verschiedenen HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zelllinien?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	**Modell**	**Hersteller**
Blotkammer	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BD Bioscience, Erembodegem, Belgien
Chemiluminescence-Imager	ChemiDoc™ Imaging-System	Bio-Rad, Kalifornien, USA
CO_2-Inkubator	HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CO_2-Inkubator	INC 153	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Feinwaage	Summit SI-64	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Gelkammer für Western Blot	Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad, Kalifornien, USA
Heizblock	ThermoCell CHB-202	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China
Kippschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kolbenhubpipette blau	Reference 100-1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette gelb	Reference 10-100 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette grau	Research 0.1-2.5 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette weiß	Reference 0.5-10 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kombi-Kühlschrank (4 °C/-20 °C)	Liebherr Comfort	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Liebherr Mediline	Liebherr AG, Bulle, Schweiz

Kurzzeitmesser	TR118	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Leuchtpult	6E	Rex Leuchtplatten, Blaustein, Deutschland
Magnetrührer	MIX 1 eco	2mag AG, München, Deutschland
Magnetrührstäbchen	D-6010	OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Mikroskop I	Routine Zellkulturmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop II	EVOS XL Core Bildgebungssystem	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikroskop III	Routine Zellkulturmikroskop ICM 405	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
pH-Meter	LE409	Mettler Toledo, CO, USA
Pipettierhilfe	PIPETBOY	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe	pipetus® 100-240	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Rollenmischer	RS-TR05	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Röntgenbestrahlungsanlage	X-Rad 320 iX	Precision X-Ray Inc., North Branford, CT, USA
Spritzflasche	Weith.-Spritzflasche 500ml LDPE	Th. Geyer
Sterilbank	HERASAFE KS 12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Tiefkühlschrank -20 °C	MediLine LKPv 6520, Liebherr Premium	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Tiefkühlschrank -80 °C	HERAFreeze Typ HFU 586 Basic	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Universalzentrifuge	Heraeus MEGAFUGE 16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vakuumpumpe		neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vertikaler Standautoklav	V-65	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wärmebad		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, Reagenz	**Hersteller**
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
cis-Diammindichloridoplatin (CDDP/Cisplatin)	Zytostatikaabteilung, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (1x) + GlutaMax™-I	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (reinst)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (vergällt mit MEK)	Otto Fischar GmbH und Co. KG, Saarbrücken, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol/2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kit Trans Blot Turbo: 5x Transfer Buffer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumorthovanadat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Nicht-essentielle Aminosäuren, MEM NEAA (100x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NVP-BEZ235 (BEZ235, Dactolisib)	Selleckchem, München, Deutschland
Opti-MEM (1X) + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
para-Hydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 Medium (1X)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure rauchend (HCl) 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stable Glutamin (200mM)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstadt, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-)-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Wasser Ampuwa (ddH_2O)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Wasser destilliert klein (dH_2O)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Wasserstoffperoxid H_2O_2 (35 wt% Lösung in Wasser)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.1.3 Standardlösungen, Medien und Puffer

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Standardlösungen, Medien und Puffer

Puffer	
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_4PO_4; pH 7,4
RIPA-Lysepuffer (Radioimmunpräzipitationspuffer)	790 mg Tris-base 900 mg NaCl in 75 mL ddH_2O lösen und pH auf 7,4 einstellen 10 mL 10% Igepal 2,5 mL 10% Natrium-Deoxycholat (1 g auf 10 mL ddH_2O) 1 mL 100 mM EDTA auf 100 mL ddH_2O auffüllen
Zellkulturmedium	
DMEM	Medium + 50 mL 10% FCS + 5 mL 1% P/S
FCS	10%
RPMI	Medium 50 mL 10% FCS

	5 mL 1% P/S 5 mL 1% NEAA 5 mL 1% S-Glu
Trypin-EDTA-Solution	
Opti-MEM (1x) GlutaMAX	
Western Blot	
0,1% Tween	DPBS mit 0,1% Tween 20
10% Ammoniumpersulfat	100 mg APS in 1 mL ddH_2O lösen bei -20 °C als Aliquots (200 µL) lagern
10x Laufpuffer	30,3 g Tris-base 144 g Glycin 10 g SDS auf 1 L mit ddH_2O auffüllen
10x Tris-gepufferte Salz-Lösung (TBS)	24,2 g Tris-base 87,6 g NaCl 900 mL ddH_2O mit 15 mL 37% HCl, pH 7,2-7,4 auf 1 L mit ddH_2O auffüllen
1x Laufpuffer	100 mL 10x Laufpuffer mit 900 mL VE-Wasser
3% BSA	3% BSA in DPBS
4x Laemmli (Probenpuffer)	2,4 mL Tris-HCl (pH 6,8) 4 mL 10% Gylcerol 0,8 g SDS (8%) 1,0 mL β-Mercaptoethanol 2,8 mL ddH_2O 1 Tr. gesättigte 0,03% Bromphenolblau-Lösung hinzugeben
5% Milch	5% Milchpulver in TBS-T lösen
Blockingpuffer	3% BSA in TBS-T lösen
ECL Solution A	200 mL 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) + 50 mg Luminol bei 4 °C lagern
ECL Solution B	11 mg para-Hydroxycumarinsäure

	in 10 mL DMSO lösen
ECL-Reagenz	8 mL Solution A + 4 µL H_2O_2 + 800 µL Solution B
Sammelgel (10%) für 2 Gele	3,05 mL ddH_2O 0,65 mL Rotiphorese 30 1,25 mL Sammelgelpuffer 0,05 mL 10% SDS 25 µL 10% APS 5 µL TEMED
Sammelgelpuffer (Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8)	6,1 g Tris-base in 80 mL ddH_2O auflösen mit 5 mL 37% HCl pH auf 6,8 einstellen auf 100 mL mit dH_2O auffüllen bei 4 °C lagern
SDS	10% in ddH_2O
TBS-T	100 mL 10x TBS 900 mL ddH_2O 1 mL Tween 20
1x Transferpuffer für Trans-Blot® Turbo Transfer System	200 mL 5x Turbo-Transfer Puffer 600 mL ddH_2O 200 mL Ethanol (reinst)
Trenngel (10%) für 2 Gele	4,1 mL ddH_2O 3,3 mL Rotiphorese 30 2,5 mL Trenngelpuffer 0,1 mL 10% SDS 75 µL 10% APS 7,5 µL TEMED
Trenngelpuffer (Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8)	90,89 g Tris-base in 450 mL ddH_2O lösen mit 4,5 mL 37% HCL pH auf 8,8 einstellen auf 500 mL mit ddH2O auffüllen bei 4 °C lagern
Koloniebildungstest	
Färbelösung Kristallviolett/Formaldehyd	0,1% Kristallviolett

	10% Formalaldehyd 37% in 270 mL ddH_2O auf 1 L mit VE-Wasser auffüllen

2.1.4 Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Name	**Spezies**	**Bestellnummer**	**Verdünnung**	**Hersteller**
Primärantikörper				
Rad51	Kaninchen	ab133534	1:10.000	Abcam plc, Cambridge, UK
β-Aktin	Maus	A2228	1:4000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
α-Tubulin	Kaninchen	sc-32293	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Germany
Sekundärantikörper				
Goat anti rabbit-HRP	Ziege	AP308P	1:5000	Millipore Corporation, Temecula, CA, USA
Goat anti mouse-HRP	Ziege	AP132P	1:5000	Millipore Corporation, Temecula, CA, USA

2.1.5 siRNA

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten siRNA

siRNA	Sequenz (5‘-3‘)	Konzentration	Hersteller
Rad51			
ON-TARGETplus Human Rad51 siRNA - SMARTpool	J-003530-09: UAUCAUCGCCCAUGCAUCA J-003530-10: CUAAUCAGGUGGUAGCUCA J-003530-11: GCAGUGAUGUCCUGGAUAA J-003530-12: CCAACGAUGUGAAGAAAUU	20 nmol	Horizon Discovery Group, Cambridge, UK
Non-Target			
ON-TARGETplus Non-targeting Pool	D-001810-01: UGGUUUACAUGUCGACUAA D-001810-02: UGGUUUACAUGUUUUCUGA D-001810-03: UGGUUUACAUGUUGUGUGA D-001810-04: UGGUUUACAUGUUUUCCUA	20 nmol	Horizon Discovery Group, Cambridge, UK

2.1.6 HNSCC-Zelllinien

Sämtliche Zelllinien wurden am Helmholz-Zentrum in München mittels short tandem analysis unter Verwendung des GenePrint 10 kits (Promega, Mannheim, Deutschland) und der GeneMapper 5.0 Software authentifiziert und überprüft. Die daraus resultierenden Daten wurden mit den Expasy- und DMSZ-Datenbanken verglichen (Dirks et al., 2010). Auch wurden sie regelmäßig im Labor auf eine mögliche Kontamination mit Mycoplasmen untersucht.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten HNSCC-Zelllinien

HPV-negativ							
Zelllinie	Loka-lisation	Alter/ Geschlecht	p53-Status	TNM	Grading	Therapie	Labor
Cal-33	Zunge	69/m	mut (R175H)	u.b.	u.b.	Ø	CAL
UM-SCC-11b	Larynx	65/m	mut (C242S)	$T_2N_{2a}M_0$	u.b.	Ch	UM
UM-SCC-3	Nase	73/w	mut (R248Q)	$T_1N_1M_0$	G3	Ø	UM
HPV-positiv							
UM-SCC-47	Zunge	53/m	wt	$T_3N_1M_0$	G1-G2	u.b.	UM
UD-SCC-2	Hypo-pharynx	58/m	wt	$T_1N_3M_0$	G3	u.b.	UD

m: männlich; w: weiblich; u.b.: unbekannt; Ø: keine Therapie; wt: p53-Wildtyp; mut: p53 mutiert; Ch: Chemotherapie; CAL: Centre Antoine Lacassagne, Frankreich; UM: Dr. Thomas E. Carey, University of Michigan, USA; UD: Dr. Thomas Hoffmann, Universität Düsseldorf, Deutschland

2.1.7 Software

Tabelle 7: Alphabetische Auflistung der verwendeten Software

Software	**Firma**
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Inc., San José, CA, USA
EndNote 20	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
GraphPad Prism 9.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Image Lab	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Intas Imaging	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
pubmed	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Alphabetische Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialen

Material	**Hersteller**
6 cm Petrischalen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
6-well Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen 15 mm Durchmesser	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Gelloader Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reagiergefäße 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Zellkulturflaschen T25 (25 cm^2), T75 (75 cm^2), T175 (175 cm^2)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsablauf

Gemäß Abbildung 5 wurden die Zellen zunächst auf 6-well Platten ausgesät (D-1), um sie am nächsten Tag zu transfizieren (D0). Es erfolgte nach 24 h die Aussaat für den Koloniebildungstest, welcher wiederum 24 h im Inkubator gelagert wurde, um alle Zellen adhärent werden zu lassen (D1). An Tag 2 (D2) wurden die Zellen in unterschiedlichen Kombinationen mit Cisplatin, BEZ235 und einer Bestrahlung im Dosisbereich von 2 Gy behandelt.

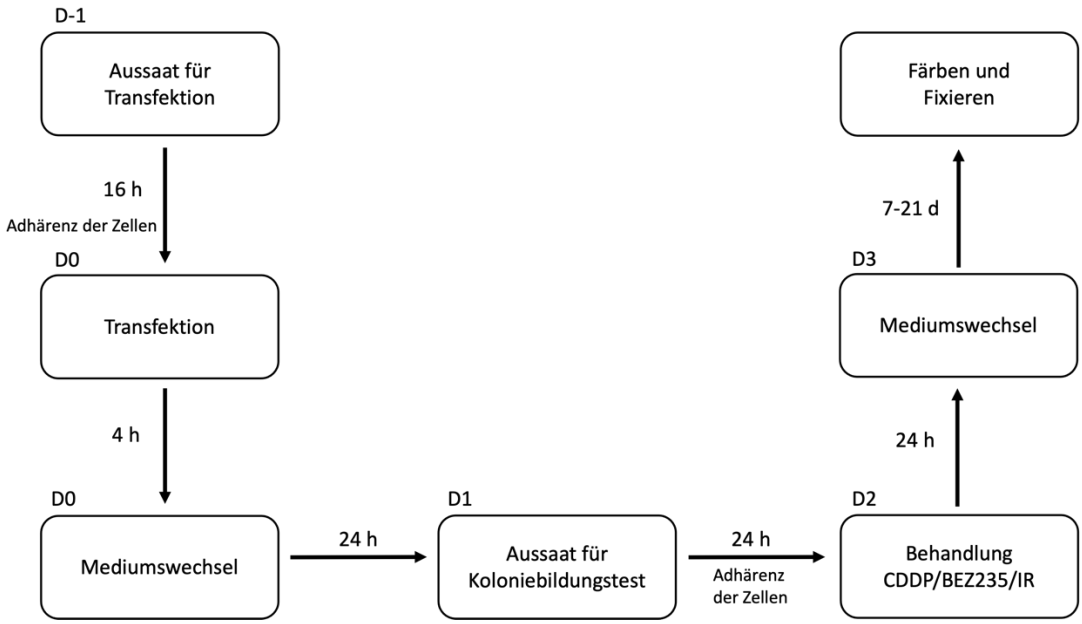

Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Koloniebildungstests

CDDP: cis-Diammindichloridoplatin/Cisplatin; IR: irradiation, Bestrahlung

2.2.2 Zellkultur

Sämtliche Zelllinien wurden entweder in DMEM (Cal-33) oder RPMI-Medium (UM-SCC-3, UM-SCC-11b, UM-SCC-47, UD-SCC-2) kultiviert. Als Zusatz gibt man zu dem DMEM 1% Penicillin/Streptomycin sowie 10% FCS. Bei dem RPMI-Medium sind folgende Zusätze notwendig: 1% Penicillin/Streptomycin, 1% stabiles Glutamin, 10% FCS und 1% NEAA (DMEM und RPMI-Medium werden im Folgenden als Vollmedium bezeichnet). Dabei befanden sich die Zelllinien in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm^2 (T75) oder 175 cm^2 (T175). Sie wurden bei einem Partialdruck von 5% (RPMI) bzw. 7,5% (DMEM) CO_2 sowie einer Temperatur von 37 °C im Inkubator unter lichtarmen Bedingungen gelagert.

Mit jeder Zelllinie wurde steril unter der Sterilwerkbank gearbeitet, welche vor jeder Benutzung gründlich mit 70% Ethanol und Terralin liquid gereinigt wurde. Auch wurde jede Zelllinie einzeln unter der Sterilwerkbank behandelt, um so etwaige Kontaminationen mit anderen Zelllinien zu verhindern. Nach dem Arbeiten mit einer Zelllinie wurde die Sterilwerkbank stets mit 70% Ethanol gereinigt, bevor mit der nächsten Zelllinie gearbeitet wurde.

In regelmäßigen Abständen wurde das verbrauchte Vollmedium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Vollmedium hinzugegeben, um ein optimales Angebot an Nährstoffen zu gewährleisten.

Erreichten die Zelllinien in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von 80-90%, wurden sie in einem angemessenen Verhältnis gesplittet. Dafür saugte man das verbrauchte Vollmedium ab und wusch Reste des Vollmediums zunächst mit PBS ab, da diese die Wirkung des nachfolgenden Trypsins hemmten. Das PBS wurde ebenfalls abgesaugt und das Trypsin wurde zum Ablösen der adhärenten Zellen hinzugegeben. Die Zellkulturflaschen wurden samt dem Trypsin für 5-10 Minuten (min) je nach Zelllinie zurück in den Inkubator gestellt. Unter vorsichtigem Klopfen und Betrachtung unter dem Mikroskop wurde sichergestellt, dass sich alle Zellen vom Boden der Zellkulturflasche nach dem Einwirken des Trypsins gelöst haben. Zu dem Trypsin gab man im Folgenden mindestens die gleiche Menge an Vollmedium, um die Wirkung des Trypsins zu hemmen. Je nach Zelllinie, deren Wachstumsverhalten sowie Zellgröße splittete man sie dann in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10. Die Zelllinien hatten dann eine Konfluenz von

circa 10-20% und konnten sich erneut teilen, bis sie wieder gesplittet wurden. Dies geschah bis Passage zehn, danach wurden die Zelllinien verworfen.

Für die Versuche wurden nur Zelllinien verwendet, die eine Konfluenz von 60-80% hatten, morphologisch gut aussahen und deren Passage unter zehn lag. Die Zellen wurden für die Versuche nach dem oben beschriebenen Verfahren abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wurde dann in der Universalzentrifuge bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Am Boden des Zentrifugenröhrchens bildete sich ein Zellpellet, der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 10 mL Vollmedium resuspendiert. Von dieser Resuspension wurden 10 µL in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, über welcher ein Deckgläschen positioniert wurde. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter entsprechend der Formel 1 ermittelt.

$$Zellen/ml = \frac{Anzahl\ der\ Zellen\ in\ den\ 4\ Zählquadraten}{4} \times 10^4$$

Formel 1

2.2.3 siRNA-Transfektion

Um das Zielprotein Rad51 in den Zelllinien Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3, UM-SCC-47 und UD-SCC-2 zu einem bestimmten Zeitpunkt auszuschalten, wurde die Methode der siRNA-Transfektion mit Lipofectamin 2000 (Lipofectamin, Lipo) verwendet.

Eine siRNA ist eine sogenannte small interfering RNA, welche 17 bis 25 Nukleotide lang ist und als nicht-codierende RNA in dem sog. RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) an die Target-mRNA bindet (Han, 2018; Netzker, 2022). Daraufhin wird diese mRNA, welche in diesem Versuch für das Protein Rad51 kodiert, degradiert, sodass das entsprechende Protein nicht translatiert wird (sogenannte RNA-Interferenz) (Han, 2018; Netzker, 2022). Der Hersteller Dharmacon nutzt dabei ein Verfahren, um vier ideale unterschiedliche siRNA-Sequenzen herzustellen, was zu einer optimalen Degradierung der mRNA für Rad51 führt (Horizon Discovery Group, o.D.). Als Kontroll- und Vergleichsbedingung wurde simultan zu dem Ansatz mit der Rad51-siRNA ein zweiter Ansatz mit einer Non-Target (NT)-siRNA durchgeführt. Diese hat keine codierende mRNA als Zielsequenz und reguliert keine Proteine herab (Han, 2018).

Um die siRNA in die Zelle zu transportieren, wurde als Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 verwendet. Das Lipofectamin 2000 bindet dazu die siRNA und schleust diese über den Mechanismus der Lipofektion in die Zelle ein (Dana et al., 2017; Mo et al., 2012).

Je nach Zelllinie wurde eine unterschiedliche Konzentration sowohl an siRNA als auch an Lipofectamin 2000 verwendet. Das Lipofectamin 2000 wurde nach Herstellerangaben in 2-5 µL angewendet. Auch wurde zelllinienabhängig eine unterschiedliche Anzahl an Zellen für die Transfektion ausgesät (Tabelle 9). Das folgende Protokoll umfasst allgemein die Schritte der Transfektion und gilt für alle verwendeten Zelllinien.

Tabelle 9: Anzahl der ausgesäten Zellen pro 9,6 cm^2 für die Transfektion

Zelllinie	**Zellzahl pro 9,6 cm^2 in 2 mL Medium**
Cal-33	1×10^5
UM-SCC-11b	$1{,}2 \times 10^5$
UM-SCC-3	$1{,}2 \times 10^5$
UM-SCC-47	1×10^5
UD-SCC-2	$2{,}5 \times 10^5$

Einen Tag vor der Transfektion (D-1) wurden die Zellen in 2 mL Antibiotika-freiem Medium in einer 6-well Platte ausgesät, sodass nach 16 h Adhärenz-Zeit im Inkubator eine Konfluenz der Zellen von circa 60-80% vorlag.

Am Tag der Transfektion (D0) wurde zunächst die NT- und Rad51-siRNA 20 min vor dem Versuch auf Eis aufgetaut. Als Transfektionsmedium wurde OptiMEM (1x) GlutaMAX verwendet. Vor der Benutzung des Lipofectamins 2000, wurde dieses gevortext.

Zunächst wurden drei Reaktionsansätze angesetzt. Zusammen mit dem OptiMEM wurde je nach benötigter Konzentration das Lipofectamin 2000 gemischt. Ebenso wurde in zwei anderen Reagenzgefäßen die Rad51-siRNA und NT-siRNA mit OptiMEM vermischt. Diese drei Ansätze wurden kurz gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurde der Mastermix angefertigt: Ein Teil des Ansatzes mit dem Lipofectamin 2000 wurde zu gleichen Teilen mit den Ansätzen der Rad51- und NT-siRNA gemischt. Zusammenfassend wurden so zwei Mastermix angefertigt, einer mit Rad51-siRNA und parallel dazu derselbe Ansatz mit der NT-siRNA.

Beide Mastermix wurden kurz anzentrifugiert und 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert.
In der Zwischenzweit wurde das Antibiotika-freie Medium der 6-well Platten abgesaugt und jedes Well wurde mit 2 mL OptiMEM gewaschen. Anschließend wurden pro Well 500 µL OptiMEM pipettiert. Nach der Inkubationszeit wurden zu diesen 500 µL OptiMEM die 500 µL des jeweiligen Mastermix Tropfen für Tropfen langsam pipettiert, sodass sich ein Gesamttransfektionsvolumen von 1 mL ergab. Das Transfektionsmedium wurde für insgesamt 4 h im Inkubator auf den 6-well Platten belassen, anschließend abgesaugt und pro Well wurden 2 mL Vollmedium pipettiert.
Am Tag darauf (D1) fand die Aussaat des Koloniebildungstests statt (Kapitel 2.2.4).

Die Hemmung von Rad51 sowie die Kontrolle der NT-siRNA, bei der Rad51 keine Hemmung erfahren hat, wurden auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen. Zuvor wurden dafür Proteinlysate am Tag der Behandlung (D2) generiert (Kapitel 2.2.6.1).

2.2.4 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest ist ein Verfahren, um das zelluläre Überleben und die Teilungsfähigkeit von Zellen nach einer Behandlung zu überprüfen (Franken et al., 2006). Dazu wurden die Zellen, welche sich nach der Transfektion 24 h auf den 6-well Platten befanden, zunächst abgelöst. Sie wurden dann ins Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in Vollmedium gelöst sowie resuspendiert und anschließend mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Pro Petrischale wurden 600 Zellen in 3 mL Vollmedium ausgesät.
Diese wurden dann für 24 h in den Inkubator gestellt, ehe sie am nächsten Tag behandelt wurden. Wiederum 24 h nach der Behandlung wurde das Medium abgesaugt und pro Petrischale wurden je 2 mL Vollmedium pipettiert. Die Koloniebildungstests lagerten 7-21 Tage abhängig von der jeweiligen Zelllinie im Inkubator.
In regelmäßigen Abständen wurden dabei die Kolonien unter dem Mikroskop beobachtet und bei entsprechender Größe der Kolonien wurde zunächst das Vollmedium der Koloniebildungstests abgesaugt, mit 1x PBS gewaschen und anschließend mittels 10% Formaldehyd mit 0,1% Kristallviolett für 10 bis 20 min bei

Raumtemperatur fixiert und gefärbt. Im Anschluss wurde die überschüssige Färbelösung vorsichtig mit VE-Wasser abgewaschen und die Koloniebildungstests wurden für ein bis zwei Tage zum Trocknen ausgelegt.
Als finalen Schritt konnte man die Kolonien so unter zur Hilfenahme des Leuchtpultes und des EVOS XL Core Mikroskops manuell zählen. Eine Kolonie ist dabei definiert als eine Population aus mindestens 50 Tochterzellen.

Durch Zählen der nichtbehandelten Petrischalen konnte so zunächst die Plattierungseffizienz (PE) gemäß der Formel 2 berechnet werden.

$$PE = \frac{Anzahl\ der\ Kolonien}{ausgesäte\ Zellen}$$

Formel 2

Mittels der errechneten Plattierungseffizienz konnte so schließlich die Überlebensrate (survival fraction - SF) mittels der Formel 3 für jede Kondition bestimmt werden. Dabei wird die PE der jeweiligen behandelten Probe durch die PE der jeweiligen Kontrollgruppe geteilt. Die SF der behandelten Proben wurden zu der PE der korrespondierenden Kontrolle normiert, um die Effekte der verschiedenen Therapien, wie z.B. den Cisplatin- oder Bestrahlungseffekt, darzustellen. So wurde beispielsweise die SF der bestrahlten Probe zu der PE der jeweiligen Probe ohne Bestrahlung normiert.

$$SF = \frac{PE_{behandelt}}{PE_{Kontrollgruppe}}$$

Formel 3

2.2.5 Behandlung

2.2.5.1 Cisplatin

Die Behandlung mit Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin, CDDP; MW: 300,05 g/mol) erfolgte 24 h nach Aussaat des Koloniebildungstests. Das Cisplatin wurde mit einem Volumen von 1 mL von der Zytostatikazubereitung des Universitätsklinikums Marburg bereitgestellt und hatte eine Stockkonzentration von 1 mg/mL. Sowohl die Lagerung als auch die Arbeit mit dem Cisplatin unter der Sterilwerkbank fanden unter Lichtschutz statt, da dieses lichtsensibel ist und die Wirkung unter zu viel Lichteinfluss abgeschwächt werden kann (Abe et al., 2020).

Durch Verdünnung der Stocklösung mit ddH_20 wurde eine Zwischenverdünnung generiert, aus welcher mittels Vollmedium die verschiedenen Konzentrationen von 0,05 bis 1 µM Cisplatin in Reagenzgefäßen hergestellt wurden. Diese Gebrauchslösung wurde direkt in die Petrischalen zu den Zellen gegeben. Jede Petrischale beinhaltete ein Gesamtvolumen von 4 mL. Das Cisplatin wurde nach 24 h durch einen Mediumwechsel entfernt.

2.2.5.2 NVP-BEZ235

Der duale PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 (BEZ235, Dactolisib; MW: 469,55 g/mol) wurde bei -80 °C im Tiefkühlschrank in 500 µM Stocklösung mit einem Volumen von 1 mL gelagert und ist vollständig in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Vor der Benutzung musste BEZ235 bei Raumtemperatur für ca. 30 min auftauen.

Durch Verdünnung der Stocklösung mit Vollmedium wurde eine Gebrauchslösung von 50 nM stets frisch hergestellt. Diese Gebrauchslösung wurde direkt in die Petrischalen zu den Zellen gegeben. Jede Petrischale beinhaltete ein Gesamtvolumen von 4 mL. BEZ235 wurde 2 h vor Cisplatingabe bzw. Bestrahlung zu den Zellen gegeben und 26 h später durch einen Mediumswechsel entfernt.

Analog zur Herstellung des BEZ235 wurde DMSO in derselben Konzentration von 50 nM als Kontrolle angesetzt. BEZ235 ist in DMSO gelöst, was als solches eine zytotoxische Substanz darstellt (de Abreu Costa et al., 2017). Um den tatsächlichen BEZ-Effekt zu ermitteln, ist es daher notwendig, parallel sämtliche Konditionen mit DMSO anzufertigen, damit man die Wirkung des DMSO auf die Zellen beurteilen kann.

2.2.5.3 Bestrahlung

Die Bestrahlung mit Photonen wurde an der Core Facility: Röntgenbestrahlungsanlage der Philipps-Universität Marburg, Leitung Frau Prof. Dr. Rita Engenhart-Cabillic, durchgeführt. Für die Bestrahlung wurde eine X-RAD 320iX Röntgenröhre verwendet.
Als physikalische Dosis wurden 2 Gy verwendet. Die Dosisrate betrug dabei 1,2 Gy/min (bei 8 mA) mit 320 kV Beschleunigungsspannung. Die Petrischalen wurden auf einer 3 cm dicken Polymethylmethacrylat (PMMA)-Platte, welche als Rückstreukörper diente, gelagert und in einem Fokus-Objekt-Abstand von 60 cm platziert. Zur Filterung niedrigenergetischer Strahlung wurde ein Thoräusfilter (0,5 mm Kupfer + 0,5 mm Aluminium) verwendet.
Vor Beginn der Versuche wurden von Medizinphysikern der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie Absolutdosimetrien durchgeführt, um etwaige Dosisabweichungen auszuschließen.

2.2.6 Western Blot

2.2.6.1 Herstellung der Proteinlysate

Im Rahmen der Etablierung der siRNA-Transfektion wurde an den Tagen D1 bis D3 nach der Transfektion die Proteinlysate für den Western Blot gewonnen, für die Dosistitration sind alle Proteinlysate an Tag 2 generiert worden.
Nach der erfolgreichen Etablierung sind die Proteinlysate für die Versuche am Tag der Behandlung (D2) hergestellt worden (Abb. 5). Dies fand unmittelbar im Anschluss an die Behandlung statt, um so die Herabregulation von Rad51 zum Zeitpunkt der Behandlung festzuhalten.
Um ein Proteinlysat zu generieren, bedarf es zuvor der Herstellung des RIPA-Lysepuffers. Dieser setzt sich zusammen aus 485 µL RIPA-Lysepuffer mit jeweils 1% der Proteaseinhibitoren PMSF, PIC und Natriumorthovanadat (Tabelle 3). Die 6-well Platte wurde im Folgenden auf Eis gestellt, das Vollmedium abgesaugt und jedes Well zunächst mit circa 2 mL 1x PBS gewaschen. Danach wurde je nach Zelldichte der RIPA-Lysepuffer in einer Menge von 80 bis 120 µL hinzugeben und die Zellen mittels Zellschaber in den RIPA-Lysepuffer geschabt. Dieses Lysegemisch wurde in ein Reagenzgefäß transferiert

und im Tiefkühlschrank bei -80 °C zur thermischen Lyse für mindestens 24 h gelagert, ehe man die Proteinlysate für den Western Blot verwenden konnte.

2.2.6.2 Gießen der Gele

Zum Gießen der Gele wurden zwei Glasplatten, welche zuvor mit 70% Ethanol gereinigt wurden, am Rand mit Silikon bestrichen und zusammengesetzt. Für die Fixierung wurden sie in die Racks gestellt und diese Racks sogleich im Gießständer befestigt. Zuerst goss man das 10%ige Trenngel. Dieses setzte man in einem Zentrifugenröhrchen unter dem Abzug gemäß Tabelle 3 an. Nach kurzem Invertieren wurde es mit einer Pipettierhilfe in die Glasplatten luftblasenfrei pipettiert. Auf dieses Trenngel pipettierte man vorsichtig Isopropanol, um restliche Luftblasen zu entfernen und das Trenngel auf der Oberseite zu glätten. Nach circa 20 min polymerisierte das Trenngel und man konnte das Isopropanol mit Filterpapier aufsaugen.
Danach wurde das 10%ige Sammelgel angesetzt (ebenfalls Tabelle 3). Dieses wurde mit einer Pipettierhilfe auf das Trenngel luftblasenfrei pipettiert. Unmittelbar setzte man daraufhin den 10er oder 15er-Kamm in das Sammelgel ein, welcher die Geltaschen für die Proben bildete, und ließ das Gel 20 min polymerisieren.
Zur Aufbewahrung wurde das Gel mit in VE-Wasser getränkte Tücher eingewickelt und konnte so für circa sieben Tage im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden, wobei es mindestens 24 h benötigte, um verwendet werden zu können, da es dann vollständig polymerisiert und gehärtet war.

2.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die angefertigten Proteinlysate, welche im Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert wurden, wurden auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden sie für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet am Boden des Reagenzgefäßes bildete. Aus dem Überstand wurden davon bei 10er Gelen 20 µL in ein neues Reagenzgefäß pipettiert, in welches zuvor 7 µL des 4x Laemmli (Probenpuffer) vorgelegt wurden. Bei 15er Gelen wurden 15 µL des Überstandes eines Proteinlysates mit 5 µL 4x Laemmli (Probenpuffer) gemischt. Die Proben wurden danach bei 95 °C für 5 min in den Heizblock gestellt, um restliches Wasser zu verdunsten. Anschließend wurden sie kurz anzentrifugiert.

Die gegossenen Gele wurden währenddessen in das Kammerinsert gestellt, welches mit 1x Laufpuffer befüllt wurde. Im nächsten Schritt wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert: Bei 10er Gelen 25 µL der Probe, bei 15er Gelen 18 µL der Probe. In die jeweils äußeren Geltaschen wurden 10 µL eines Molekulargewichtsstandards als Marker pipettiert (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10-170 kDa). Es wurde zunächst eine Spannung von 80 V für circa 30 min angelegt, sodass sich der Marker aufteilen konnte. Die Spannung wurde dann auf 120 V erhöht und das Gel konnte für circa 1,5 h laufen. Aufgrund der angelegten Spannung und des Laufpuffers wanderten die negativ geladenen Proteine zur Anode und wurden so anhand ihrer Größe aufgeteilt. Dabei gilt, je geringer das Molekulargewicht des Proteins war, desto schneller wanderte es zur Anode. Rad51 lag bei einem Molekulargewicht von 37 kDa. Als Ladekontrolle diente alpha-Tubulin (50 kDa). Für die Zelllinie UD-SCC-2, welche kein alpha-Tubulin exprimiert, wurde beta-Actin (42 kDa) als Ladekontrolle verwendet. War der Marker fast durch das Gel gelaufen, wurde die Gelelektrophorese gestoppt.

2.2.6.4 Blot

Unmittelbar im Anschluss an die SDS-PAGE fand der Blot statt. Dafür wurden zwei Papierstapel in 1x Transferpuffer eingelegt und die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, 0,2 mm Porengröße) zunächst für 2 min in kaltem 100% Ethanol aktiviert. Nach der Aktivierung im Ethanol wurde die PVDF-Membran ebenfalls in 1x Transferpuffer getränkt. Für den Blot wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System mit dem Programm Mixed-MW (molecular weight; 2,5A; 25V; 7 Minuten; Proteine zwischen 5-150 kDa) verwendet. Der Aufbau des Blots sah folgendermaßen aus:

Anode – unterer Papierstapel – PVDF-Membran – Gel – oberer Papierstapel – Kathode

Nach dem Blot wurde die PVDF-Membran, welche nun mit den Proteinen beschichtet war, vorsichtig in 5% Milch-TBS-T zum Blockieren für 1 h auf den Kippschüttler gestellt. Die Milchproteine besetzten dabei alle freien Bindestellen für Proteine und verhinderten bei der Immunfärbung unspezifische Bindungen der Antikörper an der PVDF-Membran. Nachdem die 5% Milch-TBS-T mit TBS-T abgewaschen wurde, wurde die Membran entsprechend der darzustellenden Proteine zurechtgeschnitten.

Anschließend wurde sie in einem Zentrifugenröhrchen mit dem entsprechenden primären Antikörper, welcher in entsprechender Konzentration in 3% BSA angesetzt wurde (Tabelle 4), für mindestens eine Nacht auf dem Rollenmischer im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Funktion des primären Antikörpers bestand darin, zunächst an das gewünschte Protein zu binden.

2.2.6.5 Proteindetektion

Am nächsten Morgen wurde die Membran mitsamt dem primären Antikörper zunächst dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Nach dem Waschen wurde der sekundäre Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 in TBS-T in das Zentrifugenröhrchen zu der Membran pipettiert. Der sekundäre Antikörper band an den primären Antikörper, welcher das entsprechend darzustellende Protein gebunden hat. Der sekundäre Antikörper war Horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelt und besaß damit Peroxidase-Aktivität, dessen Aufgabe die Visualisierung der gewünschten Proteine war.
Der sekundäre Antikörper wurde 1 h auf dem Rollmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser wurden dann durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für je 5 min entfernt, sodass nur der gebundene sekundäre Antikörper an der PVDF-Membran übrigblieb.
Zur Detektion und Visualisierung der Proteine wurde ein Chemilumineszenz-Imager verwendet. Dafür musste zunächst ein Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Reagenz angesetzt werden. Dieses wurde stets frisch angesetzt und bestand aus 8 mL der Solution A, 4 µL H_2O_2 sowie 800 µL der Solution B. Da das ECL-Raegenz sehr lichtempfindlich war, wurde es in Aluminiumfolie umwickelt und so transportiert.
Über die Zugabe des ECL auf die PVDF-Membran konnte nun die am sekundären Antikörper gekoppelte HRP das im ECL-Reagenz enthaltene H_2O_2 katalysieren, was wiederum Luminol oxidierte. Wurde die entsprechende PVDF-Membran belichtet, zeigte sich eine zur Menge der Oxidation des Luminols proportionale Menge Chemiluminescene. Dabei war die entsprechende Proteinbande umso stärker gesättigt, je mehr Protein sich auf der PVDF-Membran befand.

2.2.7 Statistik und Datenanalyse

Wenn nicht anders angegeben, wurde jeder Versuch in sowohl biologischen als auch technischen Triplikaten angefertigt. Alle ermittelten Daten wurden in Excel übertragen. Die Daten werden als arithmetischer Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Für das Signifikanzniveau wurde der t-Test verwendet: Bei einem p-Wert $< 0{,}05$ sind die Daten als statistisch signifikant zu betrachten. Alle statistischen Analysen und Graphiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Heterogenität von HNSCC-Zelllinien

Im Koloniebildungstest wurden fünf HNSCC-Zelllinien (Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3, UM-SCC-47, UD-SCC-2) hinsichtlich ihrer Morphologie und Zellproliferation untersucht. Unabhängig vom HPV-Status zeigten diese dabei unterschiedlich schnelle Zellproliferationen sowie Wachstumsmuster (Abb. 6).

Die HPV-negative Zelllinie Cal-33 ist im Vergleich zu den anderen Zelllinien als mittelgroß zu bezeichnen. Sie zeigte ein rasenförmiges Wachstumsmuster und wuchs verhältnismäßig schnell, sodass der Koloniebildungstest nach 10 Tagen zu stoppen war. Anders verhielt sich die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-11b. Sie hat langgezogene und schmale Zellen. Da sie etwas langsamer als die Cal-33 wuchs, wurde der Koloniebildungstest an Tag 12 gestoppt. Die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-3 verhielt sich von der Wachstumsgeschwindigkeit ähnlich wie die UM-SCC-11b, der Koloniebildungstest wurde hierbei an Tag 11 gestoppt. Sie wuchs kompakter als die anderen Zelllinien. Die HPV-positive Zelllinie UM-SCC-47 ähnelt morphologisch der Cal-33, hier zeigte sich ebenfalls ein rasenförmiges Wachstumsmuster mit mittelgroßen Zellen, die schnell zu großen Inseln konfluierten. Sie zeigte das schnellste Wachstum unter den verwendeten Zelllinien, der Koloniebildungstest wurde an Tag 9 gestoppt. Die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 wuchs hingegen viel langsamer, die Dauer des Koloniebildungstests betrug 21 Tage. Auch morphologisch ist diese Zelllinie im Vergleich zu den anderen auffällig. Die kleinen und rundlichen Zellen wachsen in kleinen Gruppen zusammen.

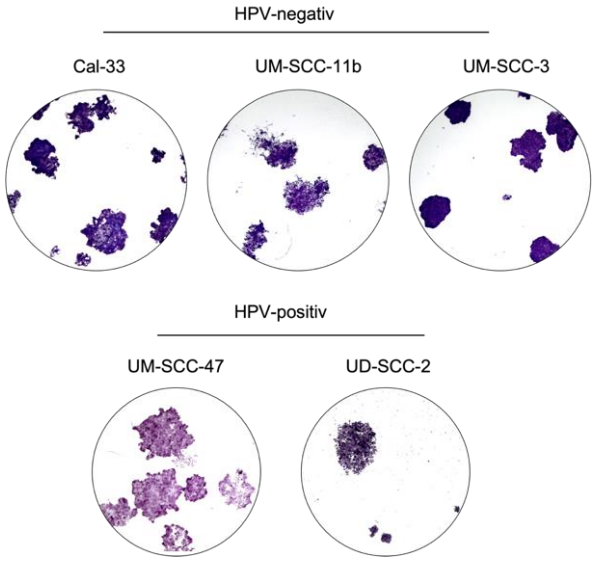

Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahmen von HPV-negativen (Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3) und HPV-positiven (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien im Koloniebildungstest

Repräsentative Fotos mikroskopischer Aufnahmen der gebildeten Kolonien der HPV-negativen (Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3) und HPV-positiven (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien. Die Kolonien sind mit Kristallviolett gefärbt.

3.2 Etablierung der siRNA

Bei den fünf verwendeten Zelllinien (Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3, UM-SCC-47, UD-SCC-2) wurde in einem ersten Schritt die basale Proteinexpression von Rad51 mittels Western Blot bestimmt (Abb. 7). Dabei zeigte sich, dass die Zelllinien Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3 sowie UM-SCC-47 eine ähnliche Proteinmenge an Rad51 exprimieren, während die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 eine verminderte Proteinexpression von Rad51 aufweist.

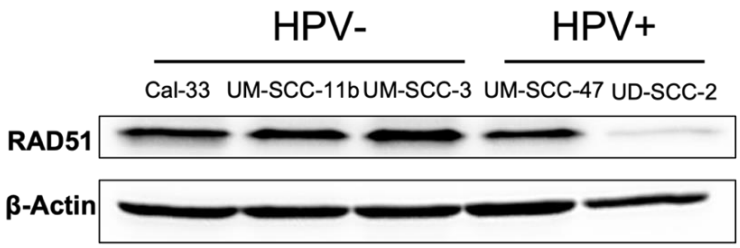

Abbildung 7: Basale Proteinexpression von Rad51 an nativen HNSCC-Zelllinien

Dargestellt ist ein Bild von einem Western Blot für die basale Proteinexpression von Rad51 an insgesamt fünf nativen HNSCC-Zelllinien (HPV-neg.: Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3; HPV-pos.: UM-SCC-47, UD-SCC-2). Beta-Actin diente als Ladekontrolle.

Mittels Kinetik und Titration wurde im folgenden Teil der Arbeit die benötigte Konzentration an Rad51-siRNA und NT-siRNA ermittelt.

Beispielhaft ist im Folgenden die Ermittlung der Konzentrationen der Rad51- und NT-siRNA für die HPV-negativen HNSCC-Zelllinien Cal-33 sowie UM-SCC-11b gezeigt. Wie in Abb. 8a zu sehen, ist ab einer verwendeten siRNA-Konzentration von 20 nM die Hemmung von Rad51 am deutlichsten in der Cal-33 nachzuvollziehen. Weiter ist in Abb. 8b gezeigt, dass die Hemmung der siRNA für das Protein Rad51 über mindestens drei Tage in der Cal-33 wirksam ist. Im Vergleich zur NT-siRNA behandelten Cal-33 und nur mit Lipofectamin 2000 behandelten Cal-33 zeigen diese eine deutliche Bande bei Rad51, während nach Behandlung mit Rad51-siRNA keine Bande und damit keine Proteinexpression zu sehen ist.

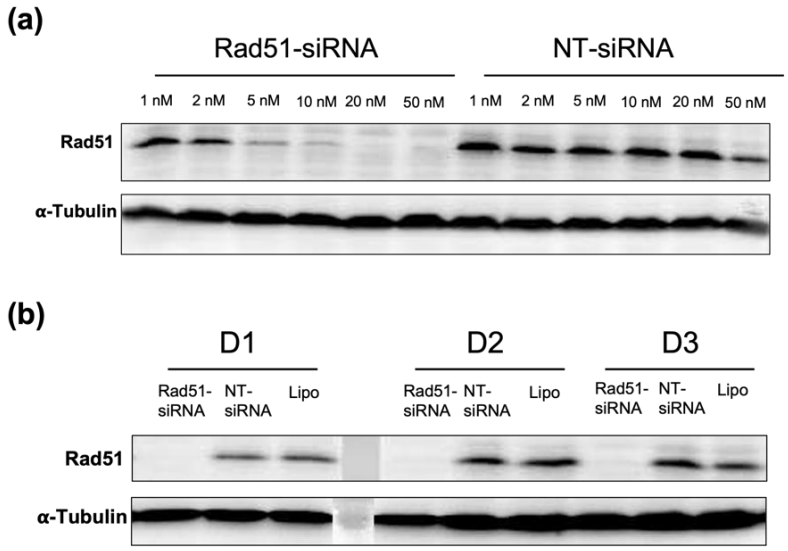

Abbildung 8: Western Blot für die Konzentrationsbestimmung und Wirkdauer der Rad51-siRNA und NT-siRNA an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie Cal-33

(a) Dargestellt ist ein Bild von einem Western Blot für Rad51 nach Behandlung mit Rad51-siRNA sowie NT-siRNA in Konzentrationen von 1 nM bis 50 nM an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie Cal-33. (b) Repräsentatives Bild eines Western Blots von Rad51 an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie Cal-33 nach siRNA-Transfektion mittels Rad51-siRNA in der Konzentration 20 nM nach Transfektion an den Tagen 1, 2 und 3 (D1-D3). Als Kontrolle wurden sowohl mit NT-siRNA als auch nur mit Lipofectamin 2000 (Lipo) behandelte Cal-33-Zellen verwendet. Alpha-Tubulin diente als Ladekontrolle.

In Abb. 9 zeichnet sich für die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-11b ein ähnliches Bild ab. Wie in Abb. 9a dargestellt, ist eine Hemmung von Rad51 ab einer siRNA-Konzentration von 20 nM zu sehen. Auch diese Herabregulation ist über drei Tage wirksam (Abb. 9b). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit NT-siRNA und Lipofectamin 2000 behandelt. Hierbei zeigte sich, wie zu erwarten, die Expression von Rad51 (Abb. 9). Eine native Expression von Rad51 zeigte bei der UM-SCC-11b eine stetige Zunahme von Tag 1 bis Tag 3 (D1-D3).

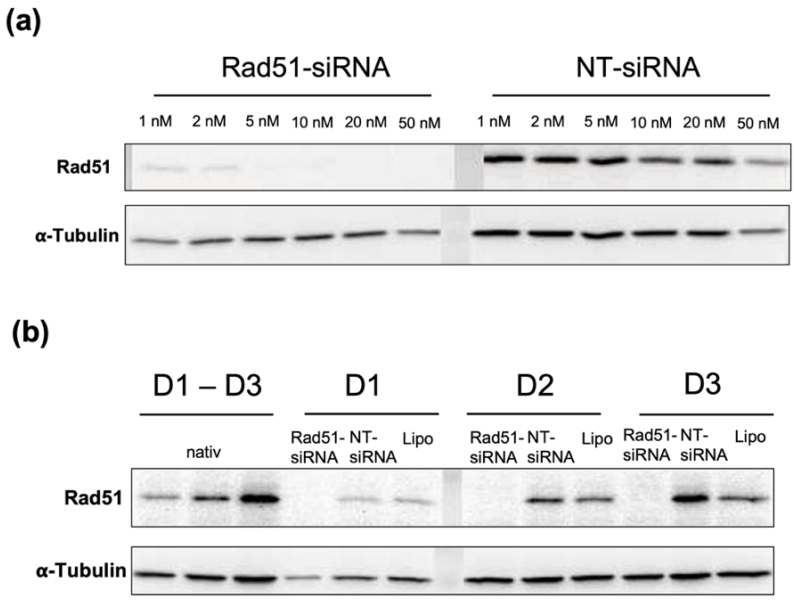

Abbildung 9: Western Blot für die Konzentrationsbestimmung und Wirkdauer der Rad51-siRNA und NT-siRNA an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie UM-SCC-11b

(a) Dargestellt ist ein Bild von einem Western Blot für Rad51 nach Behandlung mit Rad51-siRNA sowie NT-siRNA in Konzentrationen von 1 nM bis 50 nM an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie UM-SCC-11b. (b) Repräsentatives Bild eines Western Blots von Rad51 an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie UM-SCC-11b nach siRNA-Transfektion mittels Rad51-siRNA in der Konzentration 20 nM nach Transfektion an den Tagen 1, 2 und 3 (D1-D3) sowie die native Expression von Rad51 an den Tagen 1, 2 und 3 (D1-D3). Als Kontrolle wurden sowohl mit NT-siRNA als auch nur mit Lipofectamin 2000 (Lipo) behandelte UM-SCC-11b-Zellen verwendet. Alpha-Tubulin diente als Ladekontrolle.

Für die HPV-negative HNSCC-Zelllinie UM-SCC-3 zeigte sich eine Hemmung der Expression von Rad51 ab einer siRNA-Konzentration von 20 nM (Abb. 10). Die Hemmung mit einer siRNA-Konzentration von 50 nM zeigte keinen Unterschied im Vergleich zur siRNA-Konzentration mit 20 nM. Als Kontrolle dienten die mit NT-siRNA behandelten Zellen. Diese zeigten erwartungsgemäß die Expression von Rad51 (Abb. 10). Bei den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2 ist, wie Abb. 10 zu

entnehmen, eine siRNA-Konzentration von 50 nM ideal, um die Expression von Rad51 zu hemmen. Zuerst wurde die Konzentration der siRNA an der UM-SCC-47 mit 20 nM und 50 nM bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit NT-siRNA und Lipofectamin 2000 behandelt. Hier zeigte sich, wie zu erwarten, die Expression von Rad51 (Abb. 10). Die für die UM-SCC-47 ermittelte siRNA-Konzentration ist für die UD-SCC-2 getestet und übernommen worden. Dabei zeigte sich bei einer siRNA-Konzentration von 50 nM die Hemmung der Expression von Rad51. Zur Kontrolle wurde auch die UD-SCC-2 mit NT-siRNA in der Konzentration 50 nM behandelt. Rad51 wird dabei, wie zu erwarten, exprimiert.

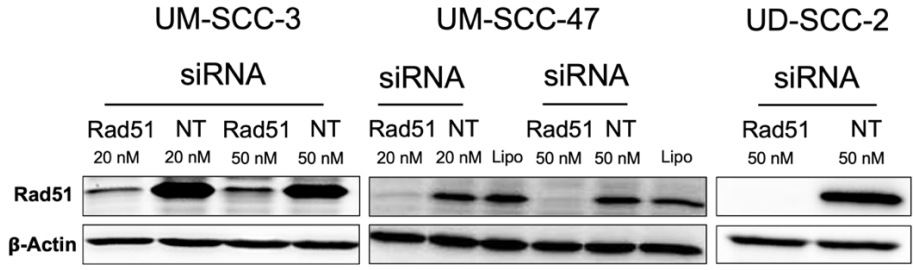

Abbildung 10: Western Blot für die Konzentrationsbestimmung der Rad51-siRNA und NT-siRNA an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie UM-SCC-3 sowie an den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2

Dargestellt ist ein Bild von einem Western Blot für Rad51 nach Behandlung mit Rad51-siRNA sowie NT-siRNA in den Konzentrationen 20 nM und 50 nM an den HNSCC-Zelllinien UM-SCC-3 (HPV-neg.), UM-SCC-47 und UD-SCC-2 (beide HPV-pos.). Als Kontrolle wurden mit NT-siRNA behandelte Zelllinien verwendet, für die UM-SCC-47 zusätzlich nur mit Lipofectamin 2000 (Lipo) behandelte Zellen. Beta-Actin diente als Ladekontrolle.

3.3 Plattierungseffizienz unter Hemmung von Rad51

Nach erfolgreicher Etablierung der siRNA-Transfektion wurde für jede Zelllinie die Plattierungseffizienz (PE) ermittelt, und zwar an nativen sowie an NT- und Rad51-siRNA-transfizierten Zelllinien.

Wie aus Abb. 11 hervorgeht, variiert die PE für die nativen Zellen unabhängig vom HPV-Status. Die PE beträgt im Mittel für die HPV-negativen Zelllinien Cal-33 0,37, für die UM-SCC-3 0,22 und für die UM-SCC-11b 0,23. Die HPV-positive Zelllinie UM-SCC-47 verzeichnet eine PE der nativen Zellen im Mittel von 0,44, die PE der ebenfalls HPV-positiven Zelllinien UD-SCC-2 hat einen Mittelwert von 0,18. Führt man die Transfektion

durch, ist bei den Zellen, die mit der NT-siRNA transfiziert wurden, kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den nativen Zellen hinsichtlich der PE zu erkennen. Bei der Cal-33 beträgt die PE jeweils im Mittel 0,33, bei der UM-SCC-3 0,21, bei der UM-SCC-11b 0,21, bei der UM-SCC-47 0,42 und bei der UD-SCC-2 0,16.

Betrachtet man die PE der Zellen, die mit der Rad51-siRNA transfiziert wurden, so lässt sich eine signifikante Abnahme der PE im Mittel im Vergleich zu den mit der NT-siRNA transfizierten Zellen feststellen. Für die Cal-33 liegt die PE im Mittel bei 0,03, für die UM-SCC-3 bei 0,07, für die UM-SCC-11b bei 0,03, für die UM-SCC-47 bei 0,15 und für die UD-SCC-2 bei 0,01.

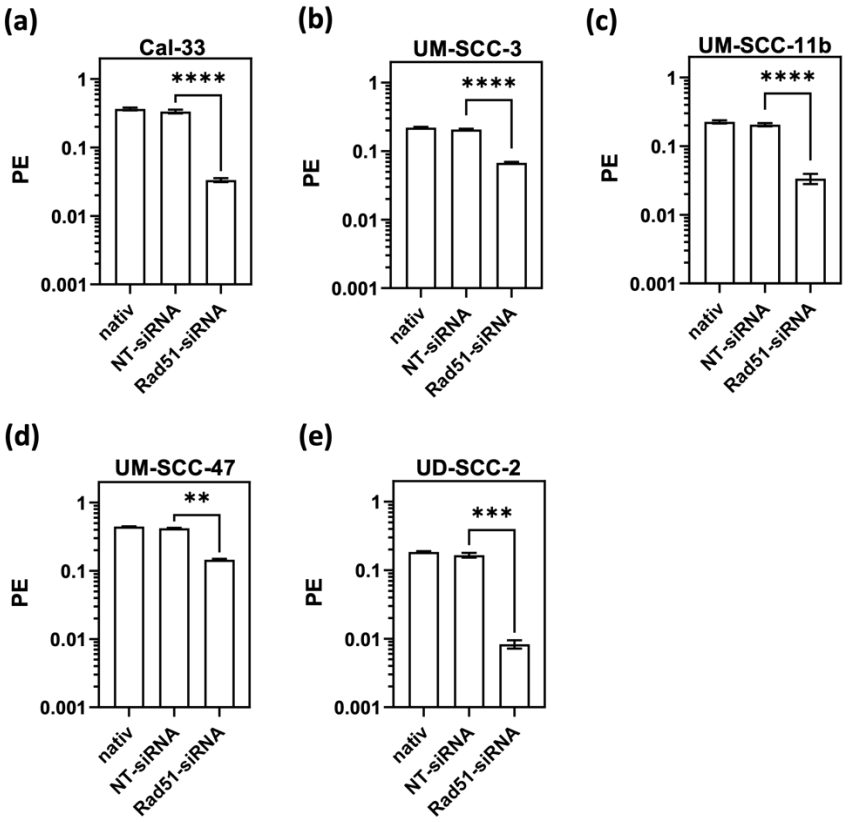

Abbildung 11: Plattierungseffizienz von HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien

(a, b, c) Vergleich der Plattierungseffizienzen (PE) von nativen, NT- sowie Rad51-siRNA transfizierten HPV-negativen HNSCC-Zelllinien Cal-33, UM-SCC-3 und UM-SCC-11b. (d, e) Vergleich der Plattierungseffizienzen (PE) von nativen, NT- sowie Rad51-siRNA transfizierten HPV-positiven HNSCC-Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2. Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3, ** P = 0,0022; *** P = 0,0005, **** P < 0,0001.

3.4 IC50-Bestimmung

Im nächsten Schritt wurden die IC50-Konzentrationen (mittlere inhibitorische Konzentration) der HNSCC-Zelllinien von Cisplatin bestimmt. Dazu wurden die Zelllinien nach erfolgter Transfektion für den Koloniebildungstest ausgesät und für 24 h mit Cisplatin in Konzentrationen von 0 bis 1 µM behandelt. Ein Mediumswechsel mit Vollmedium erfolgte 24 h später. Nach 7-21 Tagen wurden die Koloniebildungstests gestoppt und wie unter Kapitel 2.2.4 beschrieben ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass mit zunehmender Cisplatinkonzentration das zelluläre Überleben (SF; Überlebensrate) bei allen fünf Zelllinien abnimmt. Wenn man die Überlebensraten der HPV-negativen Zelllinien nach Hemmung von Rad51 mit der jeweiligen NT-Kontrolle vergleicht, lässt sich feststellen, dass die Überlebensrate deutlich sinkt.

So sieht man bei der HPV-negativen Zelllinie Cal-33, dass mit steigender Cisplatinkonzentration sowohl bei der NT-Kontrolle als auch unter Hemmung von Rad51 die SF sinkt (Abb. 12b). Zur Bestimmung der IC50 betrachtet man die Konzentration von Cisplatin, bei der die SF 0,5 beträgt (Abb. 12b, gestrichelte Linie). Für die Cal-33 liegt die IC50 von Cisplatin der NT-Kontrolle bei einer Konzentration von 0,8 µM Cisplatin. Unter Hemmung von Rad51 sieht man eine Reduktion der IC50 auf 0,4 µM Cisplatin. Für die UM-SCC-3 zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Mit steigender Konzentration von Cisplatin sinkt die SF. Bei der NT-Kontrolle liegt die IC50 bei 0,3 µM Cisplatin, unter Hemmung von Rad51 beträgt dieser Wert 0,05 µM Cisplatin (Abb. 12c). Für die UM-SCC-11b liegt die IC50 der NT-Kontrolle bei 0,5 µM Cisplatin, nach Hemmung von Rad51 bei 0,1 µM Cisplatin (Abb. 12d). Es lässt sich übereinstimmend feststellen, dass die IC50 von Cisplatin durch die Inhibition von Rad51 bei den HPV-negativen HNSCC sinkt.

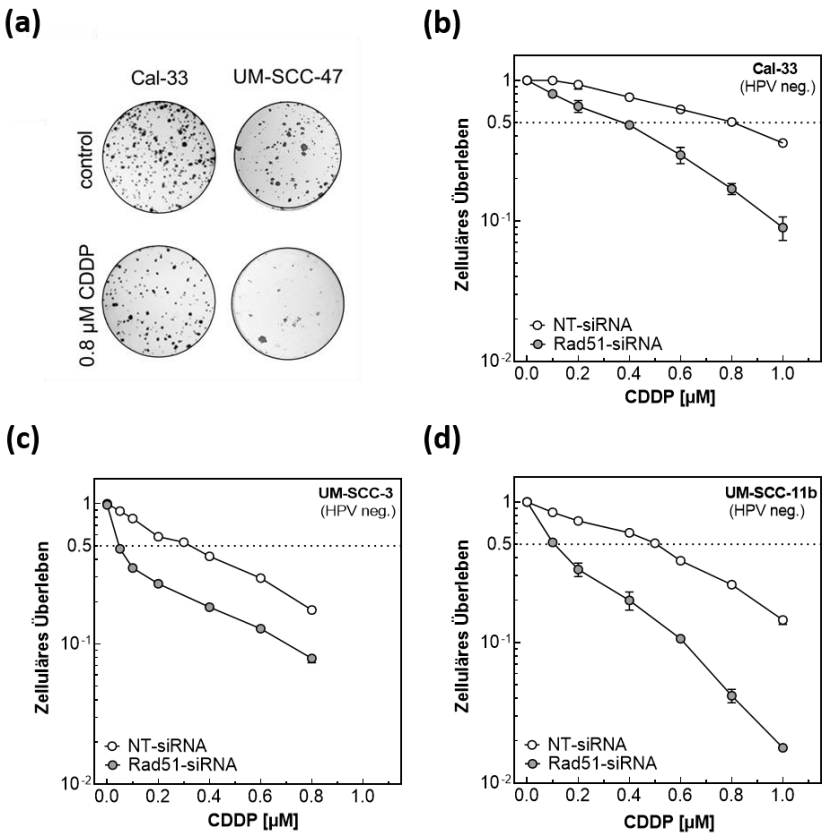

Abbildung 12: Cisplatinempfindlichkeit von HPV-negativen HNSCC-Zelllinien (Cal-33, UM-SCC-3, UM-SCC-11b)

(a) Zelluläres Überleben im Koloniebildungstest für die Cal-33 (HPV-negativ) und die UM-SCC-47 (HPV-positiv) nach 24 h Inkubation mit Cisplatin (CDDP) in der Konzentration 0,8 µM sowie einer unbehandelten Kontrolle (control). (b, c, d) Zelluläres Überleben nach Cisplatingabe (0-1,0 µM) der HPV-negativen Zelllinien Cal-33, UM-SCC-3 und UM-SCC-11b mit (Rad51-siRNA) und ohne (NT-siRNA) Hemmung von Rad51. Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3.

Bei den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2 lässt sich festhalten, dass auch bei diesen mit steigender Cisplatinkonzentration eine sinkende SF zu beobachten ist (Abb. 13a, b). Die IC50 der NT-Kontrolle liegt für die UM-SCC-47 bei 0,2 µM Cisplatin. Unter Hemmung von Rad51 kann diese nicht gesenkt werden (Abb. 13a, gestrichelte Linie). Für die UD-SCC-2 beobachtet man, dass die IC50 der NT-Kontrolle bei 0,4 µM Cisplatin liegt. Diese kann, wie bei der UM-SCC-47, durch eine Hemmung von Rad51 nicht gesenkt werden (Abb. 13b, gestrichelte Linie).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Cisplatinempfindlichkeit signifikant bei den HPV-negativen Zelllinien durch die Hemmung von Rad51 gesteigert werden kann, wie Abb. 13c zeigt. Bei den HPV-positiven Zelllinien zeigt sich hingegen keine Änderung der

Cisplatinempfindlichkeit, sowohl unter Hemmung von Rad51 als auch ohne Hemmung von Rad51.

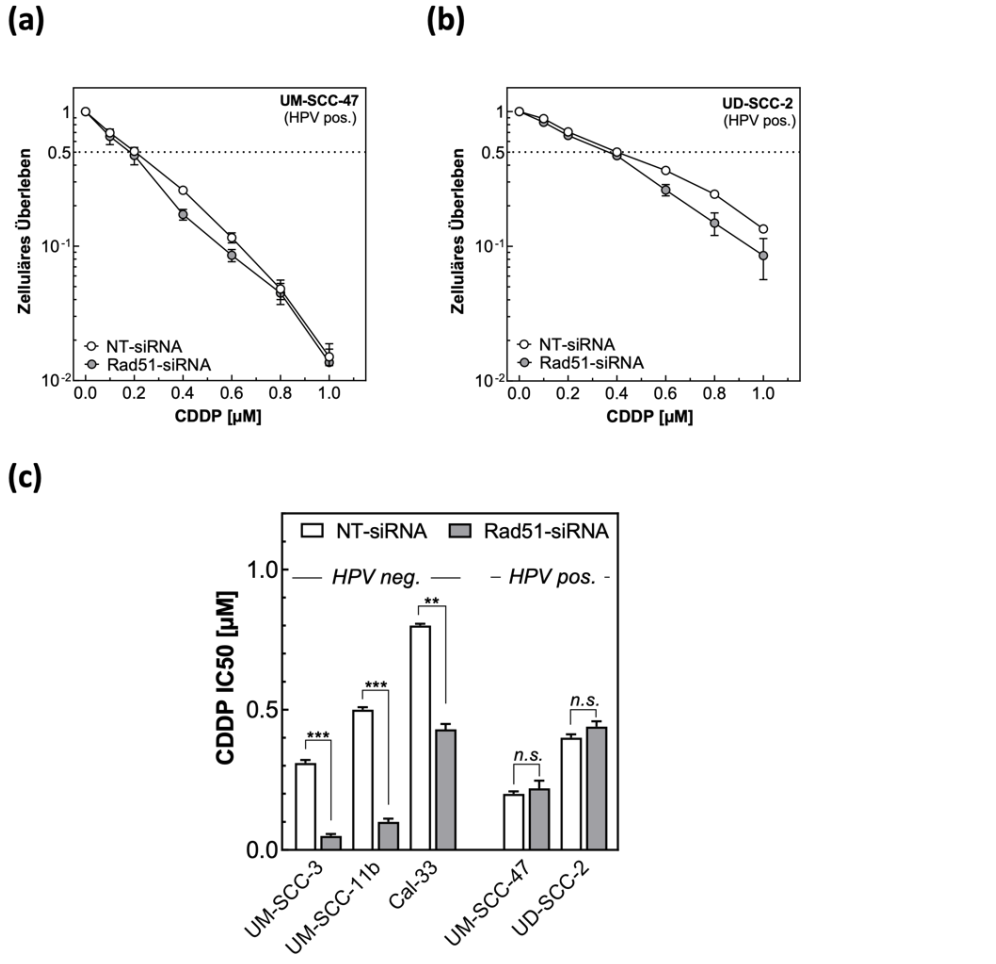

Abbildung 13: Cisplatinempfindlichkeit von HPV-positiven HNSCC-Zelllinien (UM-SCC-47, UD-SCC-2) sowie die IC50-Werte von Cisplatin der HPV-negativen (Cal-33, UM-SCC-3, UM-SCC-11b) und der HPV-positiven (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien

(a, b) Zelluläres Überleben nach Cisplatingabe (0-1,0 µM) der HPV-positiven HNSCC-Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2 mit (Rad51-siRNA) und ohne (NT-siRNA) Hemmung von Rad51. (c) Darstellung der IC50-Mittelwerte von Cisplatin (CDDP) der HPV-negativen (Cal-33, UM-SCC-3, UM-SCC-11b) und HPV-positiven (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien nach Hemmung von Rad51 (Rad51-siRNA) versus Kontrolle (NT-siRNA). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3, ** P = 0,001; *** P = 0,0001, n.s.: nicht signifikant.

3.5 Wirkung von BEZ235

In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung von BEZ235 auf das zelluläre Überleben im Koloniebildungstest untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Zelllinien für den Koloniebildungstest ausgesät, für 24 h mit 50 nM BEZ235 behandelt und die Überlebensfraktion bestimmt (Kapitel 2.2.4). Diese Konzentration erwies sich in Vorarbeiten aus unserem Labor als effektiv, um den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und damit auch das NHEJ zu inhibieren (Schötz et al., 2020).

Die HPV-positiven Zelllinien wurden nicht transfiziert, da bereits im Versuch der IC50-Bestimmung von Cisplatin gezeigt werden konnte, dass sich die IC50 von Cisplatin nicht verändert, wenn man eine Hemmung von Rad51 durchführt. Die Wirkung von BEZ235 wurde hier an nativen Zellen getestet. Als Kontrolle wurden simultan dazu die Zellen mit DMSO behandelt, die SF dieser Kontrolle als 1 normiert und ins Verhältnis zur jeweiligen mit BEZ235 behandelten Zelllinie gesetzt.

Wie in Abb. 14 dargestellt, zeigte sich, dass BEZ235 alleine keine Wirkung auf das zelluläre Überleben der HNSCC-Zelllinien hat. Einzig die HPV-positive Zelllinie UM-SCC-47 reagierte auf BEZ235 und zeigte im Koloniebildungstest eine verringerte Überlebensfraktion von 0,49 im Vergleich zur dazugehörigen DMSO-Kontrolle (Abb. 14a und b).

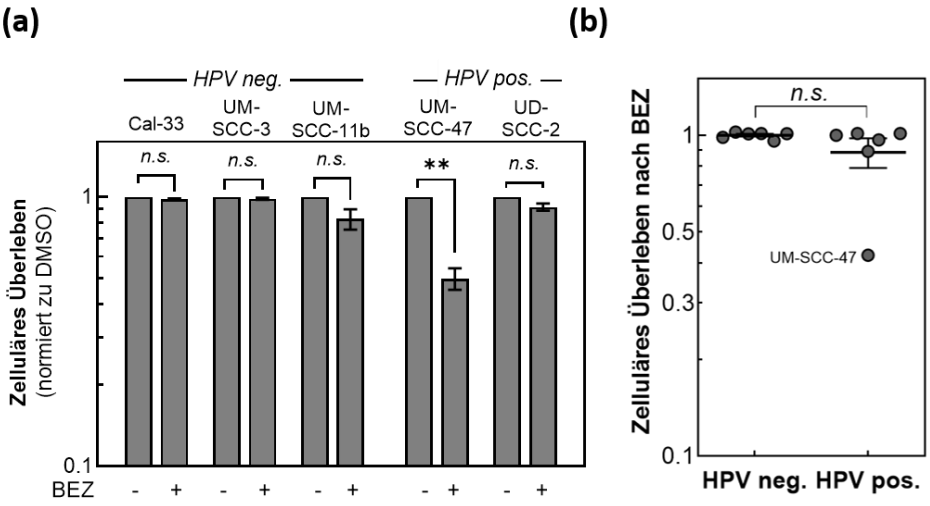

Abbildung 14: Wirkung von BEZ235 auf native HNSCC-Zelllinien

(a) Wirkung von BEZ235 (BEZ) auf das zelluläre Überleben von HPV-negativen (Cal-33, UM-SCC-3, UM-SCC-11b) sowie HPV-positiven (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien. Normiert zu Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrolle. (b) Wirkung von BEZ235 (BEZ) auf das zelluläre Überleben von HNSCC-Zelllinien, Abb. modifiziert nach Subtil (Subtil et al., 2022). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3, ** P = 0,001, n.s.: nicht signifikant.

3.6 Vorbehandlung mit BEZ235 führt zur Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit

Weiterhin sollte untersucht werden, ob BEZ235 die Wirkung von Cisplatin beeinflusst. Dazu wurde ebenfalls der Koloniebildungstest angewendet. Die HNSCC-Zelllinien wurden nach Aussaat des Koloniebildungstests mit 50 nM BEZ235 2 h vor der Cisplatingabe behandelt. Als Konzentration des Cisplatins wurde die jeweilige IC50 der Zelllinien verwendet (Abb. 13c). Die Zelllinien wurden für 24 h inkubiert, danach folgte ein Mediumswechsel. Die Kolonien wurden nach 7-21 Tagen gestoppt und entsprechend Kapitel 2.2.4 ausgewertet. Hierbei wurden die Daten jeweils zur entsprechenden Kontrolle (DMSO oder BEZ) normiert. Es sollte dargestellt werden, ob die jeweilige Behandlung zu einer Änderung der Cisplatinempfindlichkeit führt.

Kombiniert man BEZ235 mit der jeweiligen IC50 von Cisplatin zeigten sich folgende Resultate: Bei allen HPV-positiven HNSCC-Zelllinien konnte das zelluläre Überleben signifikant durch die Kombination gesenkt werden und BEZ235 konnte die Wirkung des Cisplatins verstärken (Abb. 15). So wurde bei der Behandlung der UD-SCC-2 mit Cisplatin alleine eine SF von 0,5 beobachtet, welche durch die Vorbehandlung mit BEZ235 auf eine SF von 0,26 gesenkt werden konnte. Bei der UM-SCC-47 wurde durch die Vorbehandlung mit BEZ235 in der Kombination mit Cisplatin eine SF von 0,34 ermittelt, somit konnte auch diese SF gesenkt werden (Abb. 15).

Bei den HPV-negativen Zelllinien zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung aus BEZ235 und Cisplatin, dass das zelluläre Überleben im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Gabe nicht weiter gesenkt werden konnte (Abb. 15a) (Subtil et al., 2022). Die SF entspricht demnach der IC50 von Cisplatin und BEZ235 kann die Wirkung des Cisplatins bei den HPV-negativen HNSCC-Zelllinien nicht verstärken. Die Ausnahme bildete hierbei die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-11b. Die SF sinkt, wenn BEZ235 in Kombination mit Cisplatin zur Behandlung der UM-SCC-11b eingesetzt wurde. Wie in Abb. 15a zu entnehmen ist, beträgt die SF dann 0,33 und ist statistisch signifikant ($P = 0,05$).

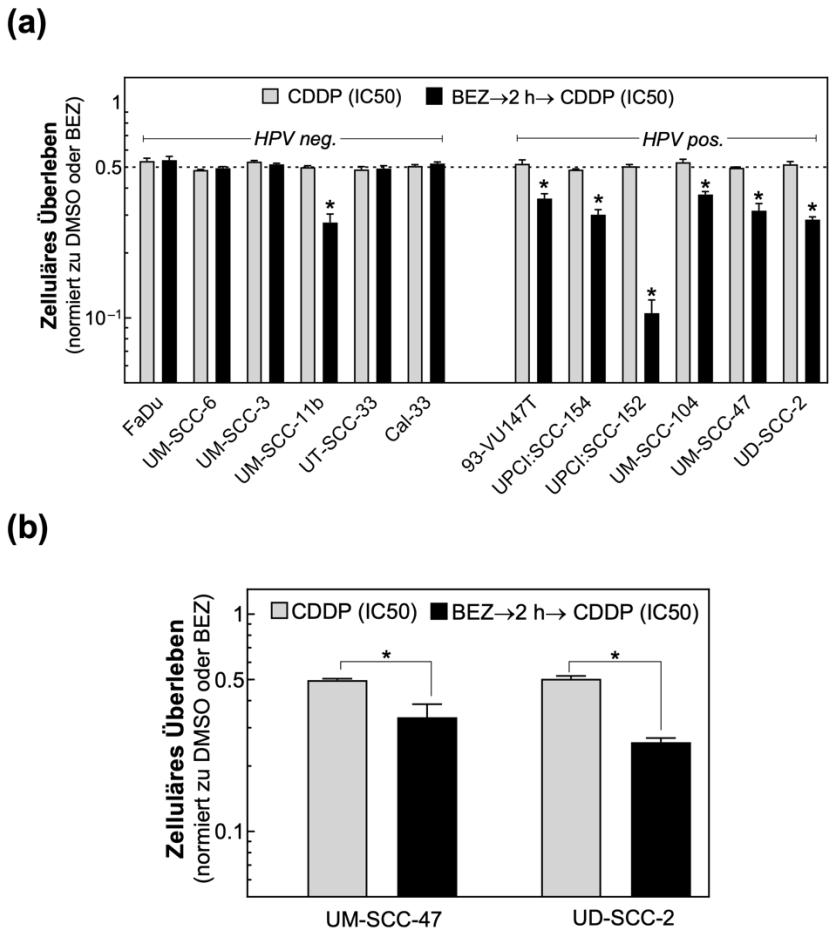

Abbildung 15: Wirkung von BEZ235 in Kombination mit Cisplatin auf HPV-negative und HPV-positive HNSCC-Zelllinien

(a) Effekt von Cisplatin (CDDP) alleine oder nach Vorbehandlung mit BEZ235 (BEZ) auf das zelluläre Überleben, dargestellt für je sechs HPV-negative sowie HPV-positive HNSCC-Zelllinien, Abb. modifiziert nach Subtil (Subtil et al., 2022). (b) Effekt von Cisplatin (CDDP) alleine oder nach Vorbehandlung mit BEZ235 (BEZ) für die HPV-positiven Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2. Als Konzentration des Cisplatins wurde die jeweilige IC50 der Zelllinien verwendet (Abb. 13c). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3, * P = 0,05.

Schaltet man Rad51 bei den HPV-negativen Zelllinien mittels Transfektion aus und behandelt diese mit BEZ235 vor, ist bei den HPV-negativen Zelllinien Cal-33 und UM-SCC-3 eine Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit festzustellen. Bei der Cal-33 lag die SF bei 0,32 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 16, P = 0,05). Auch bei der UM-SCC-3 sank die SF, wenn Rad51 ausgeschaltet wurde und eine Vorbehandlung mit BEZ235 und anschließender Cisplatingabe stattfanden: Die SF lag dann bei 0,37 (Abb. 16, P = 0,001). Man beobachtet für beide Zelllinien, dass die SF bei der NT-Kontrolle in der Kombination

BEZ235 und Cisplatin im Vergleich zur alleinigen Cisplatingabe nicht erniedrigt wurde (Abb. 16).

Eine Ausnahme bildete die UM-SCC-11b. Diese ließ sich nicht stärker gegenüber Cisplatin bei Vorbehandlung mit BEZ235 sensibilisieren, wenn Rad51 ausgeschaltet wurde. Die Überlebensfraktion beträgt normiert zu DSMO bei der Hemmung von Rad51 0,5. Wie in Abb. 15a bereits dargestellt, reagierte sie nativ auf die Kombination aus BEZ235 und Cisplatin mit einem signifikanten Abfall des zellulären Überlebens.

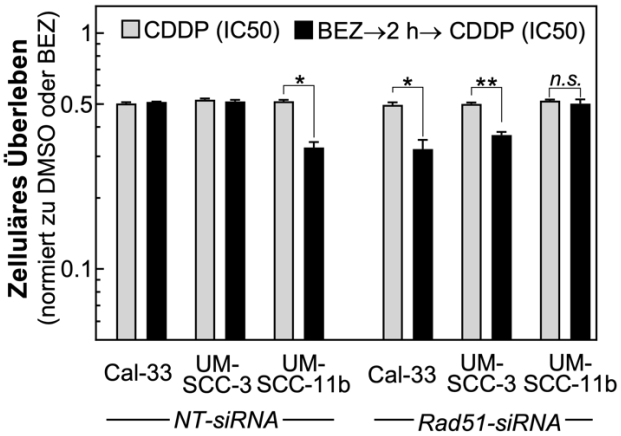

Abbildung 16: Wirkung von BEZ235 in Kombination mit Cisplatin auf HPV-negative HNSCC-Zelllinien (Cal-33, UM-SCC-3, UM-SCC-11b) bei einer Hemmung von Rad51

Effekt der Hemmung von Rad51 (Rad51-siRNA) im Vergleich zur NT-Kontrolle (NT-siRNA) auf eine Behandlung von Cisplatin (CDDP) alleine und in Kombination von BEZ235 (BEZ) und Cisplatin. BEZ235 wurde 2 h vor der Gabe des Cisplatins zu den Zellen gegeben. Als Konzentration des Cisplatins wurde die jeweilige IC50 der Zelllinien verwendet (Abb. 13c). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3, * P = 0,05, ** P = 0,001, n.s.: nicht signifikant.

3.7 Kombination von BEZ235, Cisplatin und Bestrahlung

Als weitere Behandlung erfolgte die Bestrahlung mit 2 Gy Photonenstrahlen. Diese wurde auch mit und ohne Cisplatin bzw. BEZ235 kombiniert. Bei den HPV-negativen HNSCC-Zelllinien wurde zudem die Hemmung von Rad51 durchgeführt. Analog zu den obigen Versuchen wurde ebenfalls der Koloniebildungstest angewendet. Hierbei wurden die Daten jeweils zur entsprechenden unbestrahlten Kontrolle normiert. Das bedeutet, es sollte dargestellt werden, ob die jeweilige Behandlung zu einer Steigerung der Strahlensensibilisierung führt.

Sowohl bei der Cal-33 als auch der UM-SCC-3 (beide HPV-negativ) ist zu beobachten, dass die Kombination aus Bestrahlung mit 2 Gy und Cisplatin gegenüber der alleinigen Bestrahlung zu keiner Senkung der SF führte (Abb. 17a). Bei der UM-SCC-3 lag die SF für 2 Gy bei 0,73, während sie in der Kombination mit Cisplatin 0,77 betrug. Ähnliches gilt für die Cal-33. Hierbei wurde eine SF von 0,72 bei der alleinigen Bestrahlung verzeichnet, wohingegen die Kombination mit Cisplatin zu einer Überlebensfraktion von 0,68 führte (Abb. 17a).

Eine leicht verminderte Überlebensfraktion ließ sich bei der UM-SCC-11b feststellen. Die SF betrug 0,6 für die alleinige Bestrahlung, die Kombination mit Cisplatin sorgte für eine leichte Senkung der SF auf 0,45 (Abb. 17a, P = 0,05).

Bei allen HPV-negativen Zelllinien konnte durch die Kombination aus Bestrahlung und BEZ235 das zelluläre Überleben signifikant gesenkt werden. Für die Cal-33 betrug die SF 0,46, die UM-SCC-3 verzeichnete eine SF von 0,43 und die UM-SCC-11b eine SF von 0,28 (Abb. 17b). Wurde die Tripel-Kombination aus BEZ235, Cisplatin und Bestrahlung angewendet, konnte das zelluläre Überleben noch weiter gesenkt werden. Bei der UM-SCC-3 ergab sich eine SF von 0,28, bei der UM-SCC-11b eine SF von 0,18 und bei der Cal-33 eine SF von 0,40 (Abb. 17b).

Bei den HPV-positiven Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2 lassen sich ähnliche Ergebnisse wie bei den HPV-negativen HNSCC-Zelllinien feststellen. Auch bei diesen ist zu beobachten, dass die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin hinsichtlich des zellulären Überlebens im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung keinen weiteren Vorteil erbrachte (Abb. 17a). Die SF betrug für die UM-SCC-47 bei alleiniger Bestrahlung 0,40. In Kombination der Bestrahlung mit Cisplatin lag die SF bei 0,43. Die UD-SCC-2 hatte eine

SF von 0,29 unter alleiniger Bestrahlung, in der Kombination betrug die SF 0,36 (Abb. 17a).

Bei der Kombination aus BEZ235 und Bestrahlung sank die SF bei der UM-SCC-47 auf 0,13, bei der UD-SCC-2 auf 0,15 (Abb. 17b). Bei der Tripel-Kombination aus BEZ235, Cisplatin und Bestrahlung wurde wie bei den HPV-negativen HNSCC-Zelllinien das niedrigste zelluläre Überleben erreicht (Abb. 17b). Für die UM-SCC-47 lag die SF bei 0,08, die UD-SCC-2 hatte eine Überlebensfraktion von ebenfalls 0,08 (Abb. 17b, P = 0,05).

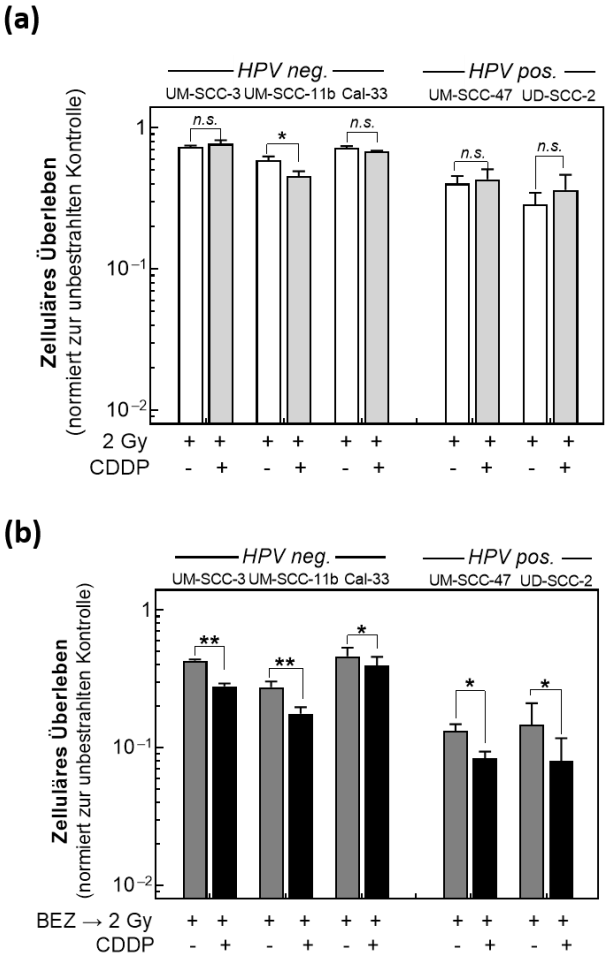

Abbildung 17: Wirkung von Cisplatin auf das zelluläre Überleben mit 2 Gy Photonenstrahlen mit und ohne Vorbehandlung durch BEZ235 bei HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien

(a) Wirkung von Cisplatin (CDDP) in Kombination mit 2 Gy Photonenstrahlen auf drei HPV-negative (UM-SCC-3, UM-SCC-11b, Cal-33) und zwei HPV-positive (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien. (b) Wirkung von Cisplatin (CDDP) in Kombination mit 2 Gy Photonenstrahlen auf drei HPV-negative (UM-SCC-3, UM-SCC-11b, Cal-33) und zwei HPV-positive (UM-SCC-47, UD-SCC-2) HNSCC-Zelllinien mit und ohne Vorbehandlung durch BEZ235 (BEZ). Als Konzentration des Cisplatins wurde die jeweilige IC50 der Zelllinien verwendet (Abb. 13c). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3, * P = 0,05, ** P = 0,001, n.s.: nicht signifikant.

Findet eine Hemmung von Rad51 an HPV-negativen Zelllinien statt, lässt sich sagen, dass das zelluläre Überleben in allen Kombinationen niedriger ist als bei den NT-siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 18).

Auch hier zeichnete sich das Bild ab, dass die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin bei einer Hemmung von Rad51 keinen zusätzlichen Vorteil hinsichtlich eines niedrigeren, zellulären Überlebens erbrachte. Bei der UM-SCC-3 lag die Überlebensfraktion für die alleinige Bestrahlung bei 0,51. Die Kombination mit Cisplatin ergab derweil eine Überlebensfraktion von 0,58 und machte diese Zelllinie signifikant strahlenresistenter (Abb. 18a, P = 0,05). Die Cal-33 zeigte eine SF von 0,40 unter alleiniger Bestrahlung, die in Kombination mit Cisplatin konstant blieb. Bei der UM-SCC-11b konnte unter Bestrahlung eine SF von 0,39 verzeichnet werden, diese stieg unter der Kombination mit Cisplatin auf 0,41 (Abb. 18a). Die NT-Kontrolle der UM-SCC-3 zeigte bei alleiniger Bestrahlung eine SF von 0,74, die Kombination mit Cisplatin ergab eine signifikante Zunahme der Strahlenresistenz mit einer SF von 0,81 (P = 0,001). Die Cal-33 zeigte eine SF von 0,69 bei Bestrahlung mit 2 Gy, die Kombination der Bestrahlung mit Cisplatin ergab eine SF von 0,68. Die UM-SCC-11b bildete die Ausnahme. Sie zeigte unter alleiniger Bestrahlung eine SF von 0,60, die unter der Kombination mit Cisplatin signifikant auf 0,49 abfiel (P = 0,001). Dies deckt sich mit den in Abb. 17a gemachten Ergebnissen.

Ein weiteres Absinken des zellulären Überlebens ließ sich durch die Behandlung von BEZ235 in Kombination mit einer Bestrahlung erreichen (Abb. 18b). Dies gilt sowohl für die NT-Kontrolle als auch für die Hemmung von Rad51. Die NT-Kontrolle zeigte sowohl für die UM-SCC-3 als auch für die Cal-33 bei der Kombination aus Bestrahlung und BEZ235 eine SF von 0,43, die SF der UM-SCC-11b lag bei 0,28. Die SF für die UM-SCC-3 betrug unter Hemmung von Rad51 0,24, die der Cal-33 0,19 und die der UM-SCC-11b 0,18 (Abb. 18b, jeweils statistisch signifikant).

Kombinierte man zur Bestrahlung und BEZ235 das Cisplatin, wurde die niedrigste Überlebensfraktion erreicht (Abb. 18b). Die NT-Kontrolle zeigte für die UM-SCC-3 zeigte in der Tripel-Kombination eine SF von 0,27. Die SF der Cal-33 betrug 0,34 und die der UM-SCC-11b 0,19. Unter Hemmung von Rad51 lag die SF der UM-SCC-11b bei 0,12, bei der Cal-33 0,11 und bei der UM-SCC-3 0,17 (Abb. 18b, jeweils statistisch signifikant).

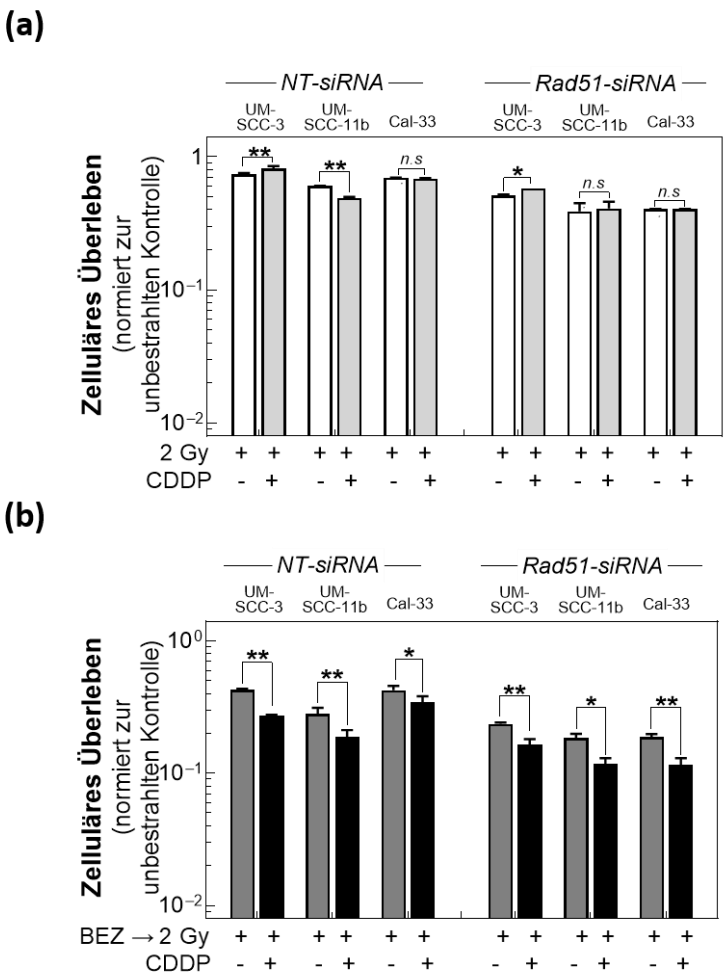

Abbildung 18: Wirkung von Cisplatin auf das zelluläre Überleben mit 2 Gy Photonenstrahlen mit und ohne Vorbehandlung durch BEZ235 bei HPV-negativen HNSCC-Zelllinien bei Transfektion mit NT- oder Rad51-siRNA

(a) Wirkung von Cisplatin (CDDP) in Kombination mit 2 Gy Photonenstrahlen auf drei HPV-negative (UM-SCC-3, UM-SCC-11b, Cal-33) HNSCC-Zelllinien mit (Rad51-siRNA) und ohne (NT-siRNA) Hemmung von Rad51. (b) Wirkung von Cisplatin (CDDP) in Kombination mit 2 Gy Photonenstrahlen auf drei HPV-negative (UM-SCC-3, UM-SCC-11b, Cal-33) HNSCC-Zelllinien mit und ohne Vorbehandlung durch BEZ235 (BEZ) sowie mit (Rad51-siRNA) und ohne (NT-siRNA) Hemmung von Rad51. Als Konzentration des Cisplatins wurde die jeweilige IC50 der Zelllinien verwendet (Abb. 13c). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3, * P = 0,05, ** P = 0,001, n.s.: nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung unabhängig vom HPV-Status das zelluläre Überleben nicht weiter absenkt. Cisplatin führt demnach nicht zu einer Steigerung der Strahlenempfindlichkeit in diesen Zelllinien. Im Gegensatz dazu steht BEZ235, welches eine Strahlensensibilisierung auslöst. Die Tripel-Kombination aus BEZ235, Cisplatin und Bestrahlung hat bei allen

HNSCC-Zelllinien unabhängig vom HPV-Status die niedrigste Überlebensfraktion und wirkt somit strahlensensibilisierend. Unter Hemmung von Rad51 in den HPV-negativen Zelllinien kann das zelluläre Überleben durch die Tripel-Kombination noch weiter gesenkt werden.

4. Diskussion

4.1 HNSCC-Zelllinien zeigen heterogenes Wachstum

Wie in meiner Arbeit dargestellt, unterscheiden sich je nach HNSCC-Zelllinie sowohl das Wachstumsmuster als auch die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Passend dazu konnten Nair et al. in ihrer Arbeit verschiedene Charakteristika von HNSCC-Zelllinien herausarbeiten (Nair et al., 2020). Unter anderem betrachteten sie die Morphologie sowie die Zellproliferation von verschiedenen HNSCC-Zelllinien. Dazu wurden die Zelllinien auf 6-well Platten ausgesät und jeden zweiten Tag gezählt. Das schnellste Wachstum wiesen die Zelllinien UM-SCC-38 (HPV-negativ), UM-SCC-104 (HPV-positiv) und UM-SCC-47 (HPV-positiv) auf, sie gingen nach 3-5 Tagen in das exponentielle Wachstum über und konnten so innerhalb von 13 Tagen 4,25 Verdopplungen ihrer Population erreichen (Nair et al., 2020). Eine Abnahme der Zellzahl zeigte sich nach Erreichen der maximalen Zelldichte. Die Autoren führen dies auf mangelnden Platz zum Wachsen und fehlende Nährstoffe zurück. Sie beschreiben das Wachstumsverhalten der Zelllinien als große Inseln, die ineinander zu einem „Monolayer“ (Nair et al., 2020) wachsen. Bei den Zelllinien UM-SCC-17-A (HPV-negativ) und UM-SCC-105 (HPV-positiv) dauerte es länger, bis sie das exponentielle Wachstum erreichten. Sie wuchsen auch laut den Autoren eher zu kleinen Inseln (Nair et al., 2020).
Es bestätigt sich, dass HNSCC-Zelllinien bezüglich Morphologie und Proliferation sehr heterogen sind, dies ist unabhängig vom HPV-Status. In meiner Arbeit konnte ich feststellen, dass sich auch die Koloniebildung je nach Zelllinie unterscheidet.

4.2 Hemmung von Rad51 mittels siRNA-Transfektion

Die Hemmung von Rad51 mittels siRNA-Transfektion ist bei den HNSCC-Zelllinien, wie in meiner Arbeit demonstriert, eine suffiziente Methode, um eine Herabregulation von Rad51 länger als 24 h zu gewährleisten. Dies konnte im Western Blot bestätigt werden (Kapitel 3.2).
In einer Arbeit zur Therapie von Krebsstammzellen aus HeLa-Zellkulturen wurde ebenfalls erfolgreich die Technik der siRNA-Transfektion zur Hemmung von Rad51 angewendet (Ruíz et al., 2018). Auch hierbei wurde zum Nachweis der Hemmung der

Western Blot verwendet. Dabei fanden die Autoren heraus, dass die siRNA in einer Konzentration von 20 nM bis 30 nM geeignet ist, um eine Hemmung von Rad51 zu gewährleisten (Ruíz et al., 2018). In meiner Arbeit wurde eine siRNA-Konzentration von 20 nM bis 50 nM für eine Hemmung von Rad51 eingesetzt. Anders als in meiner Arbeit wurden die HeLa-Zellen statt 4 h für 48 oder 72 h mit der siRNA inkubiert. Dabei sei nach 72 h die beste Herabregulierung von Rad51 zu sehen (Ruíz et al., 2018). Bei Ruiz et al. wurde weiterhin nicht die Lipofektion genutzt, um die siRNA in die Zelle zu schleusen, sondern das siPORT™ NeoFX™ Reverse Transfection Reagenz. Die Technik dieser Transfektion ist ebenfalls Lipid-basiert und hat laut Hersteller keine erhöhte Zytotoxizität, was die deutlich längere Inkubationszeit im Vergleich zur Transfektion mit Lipofectamin 2000 erklären könnte (Thermo Fisher Scientific Inc., o.D.).

Die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 zeigte im Western Blot eine geringere Expression von Rad51 im Vergleich zu den vier anderen HNSCC-Zelllinien (Abb. 7). Hierbei stellte sich die Frage, ob dies ein generelles Phänomen der HPV-positiven HNSCC-Zelllinien ist. Ziemann et al. konnten zeigen, dass die Bildung nach Bestrahlung von Rad51-Foci in HPV-positiven Zelllinien im Vergleich zu HPV-negativen Zelllinien vermindert ist (Ziemann et al., 2017). Somit könnte eine generelle Herabregulation der Proteinexpression hierfür verantwortlich sein. In unserer Arbeit Subtil et al. konnten wir zeigen, dass dies nicht der Fall ist (Abb. 19). Die relative Rad51-Expression auf Gesamtproteinebene gemessen im Western Blot zeigte in fünf HPV-negativen sowie fünf HPV-positiven Zelllinien keine signifikanten Unterschiede (Subtil et al., 2022). Im Gegensatz dazu steht eine Arbeit von Lindemann et al.: Sie werteten insgesamt 71 Patienten mit HPV-positiven und 449 Patienten mit HPV-negativen HNSCC bezüglich ihrer Rad51-Expression auf mRNA-Ebene aus (Lindemann et al., 2021). Dabei stellten sie fest, dass die HPV-positiven HNSCC signifikant mehr Rad51 exprimieren als die HPV-negativen HNSCC ($P < 0,0001$) (Lindemann et al., 2021). Es ist anzumerken, dass wir in unserer Publikation Subtil et al. die Ergebnisse auf Proteinebene beobachtet haben, während die Ergebnisse von Lindemann et al. auf Genebene beruhen. Inwiefern die mRNA auch zum fertigen Protein Rad51 translatiert wird, geht aus der Untersuchung von Lindemann et al. nicht hervor.

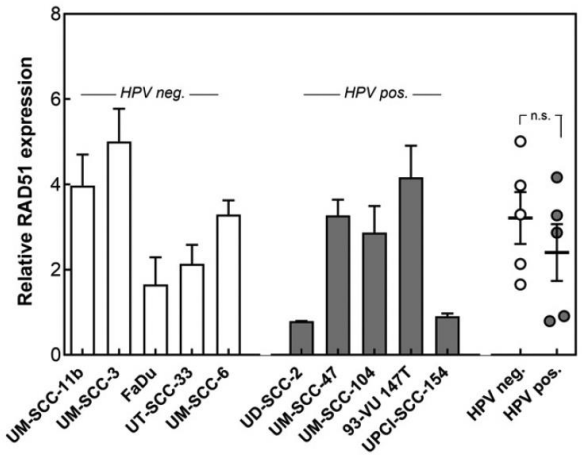

Abbildung 19: Relative Rad51-Expression in nativen HNSCC-Zelllinien

Dargestellt ist die relative Rad51-Expression in nativen HNSCC-Zelllinien. Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte ± Standardfehler, n > 3, n.s.: nicht signifikant (Subtil et al., 2022).

Wie in meiner Arbeit demonstriert, sinkt die Plattierungseffizienz bei einer Hemmung von Rad51 im Rahmen des Koloniebildungstests, und dies unabhängig vom HPV-Status. In einer Arbeit zu NSCLCs wurde an der Zelllinie A549 die Ausschaltung von Rad51 mittels Lentiviren erreicht (Yu et al., 2015). Die Lentiviren wurde zunächst über ein Plasmid mit der Rad51-siRNA infiziert. Anschließend wurde von diesen ein viraler Überstand gewonnen, mit dem die Zelllinie A549 infiziert wurde. Simultan dazu wurde ein Stamm von A549 gewonnen, der mit einer NT-siRNA infiziert wurde. Sie zeigten, wie in meiner Arbeit auch, dass die PE der Zellen, die mit der Rad51-siRNA transfiziert wurden, im Vergleich zur NT-Kontrolle im Koloniebildungstest abnahm (Yu et al., 2015). Mittels MTT-Assay (Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen (Ghasemi et al., 2021)) konnten sie demonstrieren, dass die Transfektion mit Rad51-siRNA zu einem signifikant höheren Zelltod im Vergleich zur NT-Kontrolle führte (Yu et al., 2015). Die Autoren nannten als Erklärung, dass Rad51 ein Schlüsselprotein der HR ist und damit für das zelluläre Überleben wichtig ist (Yu et al., 2015). Während der DNA-Synthesephase entstehen replikationsassoziierte DSB, die durch die HR behoben werden müssen (Arnaudeau et al., 2001). Ist die HR defizient, führt dies zum Verbleiben des DSB, welcher im weiteren Fortschreiten des Zellzyklus bei ausbleibender Reparatur in der Mitose zu chromosomalen Aberrationen führen kann (Li & Heyer, 2008). Eine defiziente HR führt demnach zu mangelnder genomischer Integrität, was wiederum die sinkende PE erklärt (Yu et al., 2015).

4.3 Cisplatinempfindlichkeit der HVP-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien

Unter der Hemmung von Rad51 konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Cisplatinempfindlichkeit bei den HPV-negativen Zelllinien gesteigert werden kann, während sie bei den HPV-positiven Zelllinien konstant bleibt. Dies ist ein zusätzlicher Nachweis, dass die HR in HPV-positiven Zelllinien defekt und in HPV-negativen HNSCC-Zelllinien intakt ist, wie dies bereits in einer anderen Arbeit beschrieben wurde (Ziemann et al., 2017). Cisplatin wirkt vor allem in der S-Phase der Zellen (Subtil et al., 2022). In dieser Phase des Zellzyklus ist die HR als Hauptreparaturprozess an der Reparatur Cisplatin-induzierter DSB beteiligt (Chen et al., 2016; Damia & Broggini, 2019; Rocha et al., 2018). Bei einer defekten HR können diese DSB nicht mehr suffizient repariert werden, was eine gesteigerte Cisplatinempfindlichkeit zur Folge hat (Birkelbach et al., 2013; Huang et al., 2013). Auch dies konnte in meiner Arbeit bestätigt werden, da bei den HPV-negativen Zelllinien unter der Hemmung von Rad51 die IC50 von Cisplatin gesenkt und damit die Cisplatinempfindlichkeit gesteigert werden konnte. Dazu passend wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass eine Hemmung von Rad51 bei HeLa-Zellen ebenfalls zu einer gesteigerten Cisplatinempfindlichkeit führt (Ito et al., 2005). Mittels MTT-Assay konnten die Autoren feststellen, dass die Kombination aus Rad51-siRNA und Cisplatin das Tumorwachstum signifikant im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit siRNA oder Cisplatin hemmt (Ito et al., 2005). Auch bei NSCLC-Zellen konnte bei einer eingeschränkten Bildung von Rad51-Foci nach Cisplatin-Behandlung eine höhere Cisplatinempfindlichkeit beobachtet werden (Birkelbach et al., 2013). Dazu wurden insgesamt 16 NSCLC-Zelllinien hinsichtlich ihrer Bildung von Rad51-Foci auf eine Behandlung mit Cisplatin, Mitomycin C und Olaparib, einem PARP-Inhibitor, untersucht. Vier dieser Zelllinien zeigten eine eingeschränkte Bildung von Rad51-Foci. Dies konnte im Koloniebildungstest bestätigt werden. Die eingeschränkte Bildung der Rad51-Foci korrelierte mit einem niedrigeren zellulären Überleben bei Behandlung mit Cisplatin (Birkelbach et al., 2013). Somit stehen meine gefundenen Ergebnisse im Einklang mit diesen Arbeiten.

In einer Arbeit aus unserem Labor konnte passend von Ziemann et al. gezeigt werden, dass sich in den HPV-positiven Zelllinien nach Bestrahlung nahezu keine Rad51-Foci im Gegensatz zu HPV-negativen Zelllinien nachweisen lassen, welche ihren typischen Peak

etwa 6 h nach Bestrahlung zeigen (Ziemann et al., 2017). Da Rad51 ein Hauptprotein der HR ist, erklärt dies die gesteigerte Cisplatinempfindlichkeit, wenn man Rad51 in den HPV-negativen Zelllinien ausschaltet: Die HR als Reparaturweg wird dadurch inhibiert. Bei den HPV-positiven Zelllinien, welche ohnehin eine defekte HR aufweisen, kann durch eine Hemmung von Rad51 keine Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit erreicht werden, wie für die Zelllinien UM-SCC-47 und UD-SCC-2 demonstriert (Abb. 13).

4.4 Einfluss von BEZ235 auf die Cisplatinempfindlichkeit

Es konnte in einer vorangegangenen Arbeit aus dem Labor gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit BEZ235 das NHEJ inhibiert, während die HR von BEZ235 unbeeinflusst bleibt (Schötz et al., 2020). Um zwischen NHEJ und HR unterscheiden zu können, wurden in das Genom der Zelllinien H1299 und UD-SCC-2 spezielle GFP-Reparaturplasmide integriert (Schötz et al., 2020). Nachfolgend wird enzymatisch ein DSB in die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) eingeführt. Findet die Reparatur vom DSB durch das NHEJ statt, zeigt sich in der Durchflusszytometrie, dass GFP exprimiert wurde. Das Plasmid zum Nachweis der HR enthält zusätzlich eine nicht-fluoreszierende GFP-Sequenz, welche als homologe Sequenz zur Reparatur dient. Mittels Durchflusszytometrie kann so zwischen NHEJ und HR unterschieden werden. BEZ235 konnte dabei die Reparaturaktivität durch das NHEJ um 30-40% senken, während die HR durch BEZ235 nicht beeinflusst wurde (Schötz et al., 2020). Das NHEJ ist vor allem für die Reparatur von DSB verantwortlich, die durch Cisplatin-induzierte Intrastrang-Quervernetzungen verursacht sind (Damia & Broggini, 2019; Pastwa et al., 2014). Wird das NHEJ durch BEZ235 supprimiert, könnten demnach Reparaturprozesse durch die HR stattfinden. In meiner Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit 50 nM BEZ235 in HPV-negativen Zelllinien, in denen Rad51 ausgeschaltet ist, zu einer gesteigerten Cisplatinempfindlichkeit führt. Damit verhalten sich HPV-negative HNSCC-Zelllinien bei einer Hemmung von Rad51 genauso wie native HPV-positive Zelllinien, welche ohnehin einen Defekt in der HR aufweisen (Ziemann et al., 2017). Infolgedessen beobachtet man für die HPV-positiven Zelllinien, dass diese bereits im nativen Zustand bei Vorbehandlung mit BEZ235 eine gesteigerte Cisplatinempfindlichkeit aufweisen (Abb. 15).

Eine Arbeit von Hsu et. al kam zu einem anderen Ergebnis. Sie zeigten im MTT-Assay an der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie FaDU, dass die kombinierte Behandlung von BEZ235 sowie Cisplatin im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit BEZ235 oder Cisplatin zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums führte (Hsu et al., 2018). BEZ235 wurde wie in meiner Arbeit auch in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Als Konzentration des Cisplatins verwendeten sie jedoch nicht die IC50, sondern eine Konzentration von 2 µM. Weiterhin fanden sie mittels Durchflusszytometrie heraus, dass die Kombination aus BEZ235 und Cisplatin zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase führt und damit den Zellzyklus stoppt, was eine geringere Proliferation der Zellen zur Folge hat. Als Ursache nennen die Autoren den synergistischen Effekt von beiden Substanzen, dieser resultiert in einer verminderten Proliferation sowie gesteigerten Apoptose (Hsu et al., 2018). Die von Hsu et al. gemachte Beobachtung wurde an einer einzigen Zelllinie getestet, sodass man hier von einer eingeschränkten Aussagekraft ausgehen kann. Zudem verwendeten sie eine höhere Konzentration des Cisplatins. Diese ist mit 2 µM viel höher als die von mir verwendeten IC50-Konzentrationen (Spannweite 0,05 - 0,8 µM CDDP, Abb. 13c). Dies kann den toxischen Effekt erklären, den Cisplatin alleine auf die Zellen ausübt. Auf eine Konzentrationsreihe, um die IC50 von Cisplatin zu ermitteln, verzichteten sie. Auch wurden die Zellen bis zu 72 h mit den Substanzen inkubiert, hierbei kann Cisplatin seine toxische Wirkung über einen längeren Zeitraum entfalten. In meiner Arbeit betrug die Inkubationszeit hingegen maximal 24 h.

Wie wir in unserer Publikation weiterhin zeigen konnten, weisen HPV-negative HNSCC-Zelllinien im nativen Zustand keine Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit bei Vorbehandlung mit 50 nM BEZ235 auf (Subtil et al., 2022). Dies wurde an insgesamt fünf HPV-negativen HNSCC-Zelllinien (FaDu, UM-SCC-6, UM-SCC-3, UT-SCC-33, Cal-33) demonstriert. In meiner Arbeit konnte ich dieses Ergebnis zudem für die Cal-33 und UM-SCC-3 bestätigen. Ausnahme ist die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-11b. Diese Zelllinie zeigt als einzige unter den HPV-negativen Zelllinien nach Vorbehandlung mit BEZ235 eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin (Subtil et al., 2022). Es ist auch bekannt, dass diese Zelllinie über eine intakte HR verfügt (Ziemann et al., 2017). Mittels Immunfluoreszenz konnten Ziemann et al. zeigen, dass die UM-SCC-11b nach der Behandlung mit Roscovitin, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), und Bestrahlung Rad51-Foci ausbilden. Dies war bei den HPV-positiven Zelllinien hingegen

nicht zu beobachten. Auch das Ansprechen der UM-SCC-11b auf Roscovitin spricht für eine intakte HR, da die CDK in die HR involviert sind (Ziemann et al., 2017). Man würde annehmen, dass bei Hemmung von Rad51 die UM-SCC-11b bei Vorbehandlung mit BEZ235 eine gesteigerte Cisplatinempfindlichkeit aufweist. Wie meine Ergebnisse jedoch zeigen, erlischt dieser BEZ-Effekt, wenn man eine Hemmung von Rad51 an der UM-SCC-11b durchführt (Abb. 16). Die Zellen werden daraufhin resistenter gegenüber der Kombination aus BEZ235 und Cisplatin. Eventuell nutzt diese Zelllinie bei Hemmung der HR einen anderen DNA-Reparaturweg, so dass BEZ2325 keine Wirkung zeigt. Es könnte sein, dass die DSB-Reparatur über eine geringere Expression der Proteine ATM, Mre11 sowie H2AX reguliert wird, wie dies für die UM-SCC-11b in einem Western Blot in der Arbeit von Wang et al. gezeigt wurde (Wang et al., 2012). Stattdessen wird bei der UM-SCC-11b das Protein Wip1 vermehrt exprimiert. Dieses ist ein Regulator der DNA damage response (DDR) und moduliert so die Zellantwort auf einen DNA-Schaden (Wang et al., 2012), was meine Ergebnisse erklären könnte.

4.5 Wirkung von BEZ235 in Kombination mit Cisplatin und Bestrahlung

Sowohl bei den HPV-negativen als auch bei den HPV-positiven Zelllinien verstärkt BEZ235 den Effekt der Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin. Der Effekt des BEZ235 beruht auf der Inhibition des NHEJ (Schötz et al., 2020). Durch die Behandlung mit Cisplatin werden DSB induziert, welche nun nicht mehr suffizient in der G1-Phase repariert werden können (Schötz et al., 2020). Dadurch dass man die Zellen zusätzlich bestrahlt, ist das Risiko höher, mehr letale Schäden in der Zelle zu erzielen, da diese auch DSB induzieren. Dieser Effekt ist bei den HPV-positiven Zelllinien noch stärker ausgeprägt als bei den HPV-negativen Zelllinien. Womöglich liegt dies an dem Defekt der HR bei den HPV-positiven Zelllinien. Nach Bestrahlung beobachtet man bei diesen nämlich, dass die HPV-positiven Zelllinien weniger Rad51-Foci ausbilden (Ziemann et al., 2017) und erklärt, warum die HPV-positiven Zelllinien radiosensibler als die HPV-negativen Zelllinien sind (Kranjc Brezar et al., 2020).

In anderen Studien wurden ebenfalls Substanzen gesucht, die die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin verstärken. So konnte bei den NSCLC-Zellen das orale Antidiabetikum Metformin als potenter Wirkverstärker identifiziert werden (Riaz et al., 2019). An den humanen NSCLC-Zelllinien A549 und H460 wurde im Koloniebildungstest

das zelluläre Überleben hinsichtlich einer Behandlung mit Metformin (Konzentration 1 mM und 2 mM) oder Cisplatin (Konzentration 1 µM) oder der Kombination beider Medikamente getestet. Zuvor wurden die Zelllinien jeweils mit 0, 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt. Es zeigte sich dabei, dass Metformin alleine eine radiosensibilisierende Wirkung auf diese Zelllinien ausübt ($p < 0{,}0001$, ANOVA F-test) und zeigte in Kombination der Bestrahlung mit Cisplatin für die A549-Zellen supra-additive Effekte ($p = 0{,}018$) und für die H460-Zellen additive Effekte ($p = 0{,}71$) (Riaz et al., 2019). Bei Zervixkarzinomzellen konnte die Wirkungsverstärkung der Behandlung aus Bestrahlung und Cisplatin durch den PARP-Inhibitor Olaparib im Koloniebildungstest nachgewiesen werden (IJff et al., 2021). Vier Zervixkarzinomzelllinien wurden in Kombinationen aus Hyperthermie (42 °C), Cisplatin (0,3 - 0,5 µM), Bestrahlung (2 - 6 Gy) und Olaparib (4,0 - 5,0 µM) behandelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass Olaparib sowohl bei der Bestrahlung mit Cisplatin als auch bei der Bestrahlung mit Hyperthermie zu einem niedrigeren zellulären Überleben führt. Die Vierfachkombination brachte im Gegensatz zur Tripel-Therapie keinen weiteren Vorteil (IJff et al., 2021).

Anders als in meiner Arbeit für BEZ235 an HNSCC-Zelllinien demonstriert, kann der Multikinase-Inhibitor Sorafenib die Wirkung aus Bestrahlung und Cisplatin bei den HNSCC nicht verstärken (Möckelmann et al., 2016). Im Koloniebildungstest beobachteten Möckelmann et al., dass Sorafenib bei der HNSCC-Zelllinie FaDU die Cisplatin-induzierte Strahlensensibilisierung aufhebt und in zwei anderen HNSCC-Zelllinien (SAS und UT-SCC-60B) diese nicht beeinflusst, während es einzig in der HNSCC-Zelllinie UT-SCC-42A eine leichte Sensibilisierung in niedrigen Dosisbereichen zeigte (Möckelmann et al., 2016). Die Arbeitsgruppe um Zeng et al. zeigte im Koloniebildungstest an der HPV-positiven Zelllinie UM-SCC-47, dass das zelluläre Überleben durch die Kombination aus Cisplatin und Bestrahlung mit dem CHK1/2-Inhibitor Prexasertib nicht weiter gesenkt werden kann (Zeng et al., 2020). Die Autoren nennen als Ursache, dass die UM-SCC-47 bereits auf die alleinige Strahlung sehr sensitiv reagiert (Zeng et al., 2020). Im Gegensatz zu Prexasertib konnte in dieser Arbeit für BEZ235 gezeigt werden, dass die UM-SCC-47 durch die Behandlung mit BEZ235 und Cisplatin noch strahlensensitiver wird (Abb. 17b, $P = 0{,}05$). An den HPV-negativen HNSCC- Zelllinien UM-SCC-1 sowie UM-SCC-6 wurde ebenfalls die Tripelkombination aus Cisplatin, Bestrahlung und Prexasertib im Koloniebildungstest angewendet (Zeng et al.,

2020). Hierbei zeigte sich eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit. Für BEZ235 spricht jedoch, dass es in unserer Publikation an vier HPV-negativen und fünf HPV-positiven Zelllinien getestet wurde und zeigte dabei unabhängig vom HPV-Status eine strahlensensibilisierende Wirkung bei simultaner Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung (Subtil et al., 2022). Dies konnte ich zudem in dieser Arbeit bestätigen (Abb. 17b).

Kombiniert man die Bestrahlung mit Cisplatin, zeigte sich in meiner Arbeit bei allen HNSCC-Zelllinien unabhängig vom HPV-Status nur eine moderate bis keine Sensibilisierung der Strahlenempfindlichkeit, bei manchen sogar eine Abnahme der Strahlenempfindlichkeit beim Einsatz von Cisplatin. Dies konnte auch in der Arbeit von Busch et al. beobachtet werden (Busch et al., 2016). Im Koloniebildungstest wurden ebenfalls HPV-negative sowie HPV-positive HNSCC-Zelllinien bezüglich ihres zellulären Überlebens auf eine kombinierte Behandlung aus Bestrahlung und Cisplatin untersucht. Auch hier zeigten sich vorwiegend additive Effekte, nur bei einer Minderheit der Zelllinien waren moderate, synergistische Wirkungen zu beobachten (Busch et al., 2016). Als Erklärung nennen die Autoren die Heterogenität der HNSCC-Zelllinien und den unterschiedlichen Versuchsaufbau. So verwendeten sie in einer Versuchsreihe die IC50 von Cisplatin und bestrahlten die Zelllinien drei Tage später, in einer anderen Versuchsreihe verwendeten sie die IC75 von Cisplatin mit einer Bestrahlung 6 h nach Cisplatingabe. Für die Zelllinie UD-SCC-2 bedeutete die niedrigere IC50-Konzentration an Cisplatin mit der verzögerten Bestrahlung eine geringere Überlebensfraktion als bei der höheren IC75-Konzentration mit der früheren Bestrahlung (Busch et al., 2016). Ziemann et al. aus unserer Arbeitsgruppe stellte ebenfalls heraus, dass die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin vor allem additive Effekte auf HNSCC-Zelllinien ausübt (Ziemann et al., 2015). Für die HPV-negative Zelllinie UD-SCC-1 konnten sie im Koloniebildungstest eine Abnahme der Strahlenempfindlichkeit nachweisen (Ziemann et al., 2015), wie es in meiner Arbeit an der ebenfalls HPV-negativen Zelllinie UM-SCC-3 zu beobachten war (Abb. 17a und 18a).

Die im klinischen Alltag gängige Therapiekombination aus Bestrahlung und Cisplatin für die HNSCC beruht demnach vor allem auf additiven Effekten. In der Klinik konnten durch die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin in vielen Studien hohe Heilungsraten bei den HNSCC erzielt werden (Bernier et al., 2004; Cooper et al., 2004; Mendenhall et al.,

2006; Szturz et al., 2019). So veröffentlichten Cooper et al., dass die postoperative Radiochemotherapie mit Cisplatin der alleinigen Radiotherapie hinsichtlich der lokoregionären Kontrolle sowie des krankheitsfreien Überlebens (DFS - disease free survival) signifikant überlegen ist (Cooper et al., 2004). Eingeräumt haben die Autoren, dass durch die Hinzugabe des Cisplatins die Nebenwirkungen unter der Therapie angestiegen sind (Cooper et al., 2004). Dies macht erneut die Notwendigkeit einer Therapieoptimierung deutlich.

Führt man die Hemmung von Rad51 an den HPV-negativen Zelllinien durch, zeigt sich bei allen verwendeten Zelllinien eine verstärkte Wirkung von BEZ235 bei der Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin, was sich in einem niedrigeren zellulären Überleben widerspiegelt (Abb. 18b). Dies erklärt sich dadurch, dass neben der Hemmung des NHEJ durch BEZ235 der andere wichtige Reparaturweg für DSB, die HR, inhibiert ist. Die durch Cisplatin und Bestrahlung induzierten DSB haben einen höheren letalen Effekt, da weder in der G1- noch in der S- sowie G2-Phase diese DNA-Schäden repariert werden können. Diese Wirkung von BEZ235 konnte in unserer Publikation mittels Immunfluoreszenz an der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC-3 sowie an der HPV-positiven Zelllinie UM-SCC-47 bestätigt werden (Subtil et al., 2022). In Zellen der G1-Phase waren nämlich nach der Behandlung mit Cisplatin eine leichte Erhöhung an γH2AX/53BP1-Foci zu sehen, die unter der Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin weiter anstiegen. Wurde die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin um BEZ235 erweitert, wurden die meisten γH2AX/53BP1-Foci in G1-Phase-Zellen gemessen (Subtil et al., 2022), und dies unabhängig vom HPV-Status. Dabei zeigte die HPV-positive Zelllinie UM-SCC-47 absolut betrachtet mehr γH2AX/53BP1-Foci als die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-3, was sich dadurch erklären lässt, dass die HR bei den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien defekt ist (Subtil et al., 2022; Ziemann et al., 2017). Eine Weiterführung dieses Versuches wäre es, an HPV-negativen Zelllinien die Hemmung von Rad51 mittels siRNA-Transfektion durchzuführen und diese mit Immunfluoreszenz unter oben genannten Behandlungskombinationen auf die Anzahl von γH2AX/53BP1-Foci zu untersuchen.

4.6 Bedeutung des HPV-Status für die Homologe Rekombination

Erstmalig wurde in dieser Arbeit verdeutlicht, wie das zelluläre Überleben der HPV-negativen HNSCC-Zelllinien von der HR abhängig ist. Es zeigt sich, dass eine Hemmung der HR in einem signifikant geringeren Überleben bezüglich verschiedener Behandlungskombinationen aus Cisplatin, BEZ235 und Bestrahlung resultiert. Im Rahmen der Reparatur von DSB steht den Zellen in der späten S- und der frühen G2-Phase die HR nicht zur Verfügung. Dies bedeutet für die Zellen irreparable, letale Schäden. Es bestätigt sich damit, dass die HR in HPV-negativen HNSCC-Zelllinien intakt ist.

Anders ist es bei den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien. Diese reagieren bei einer Hemmung von Rad51 unverändert auf Cisplatin hinsichtlich ihres zellulären Überlebens. Dies macht deutlich, dass die HPV-positiven Zelllinien über eine defekte HR verfügen, wie eine andere Arbeit ebenfalls zeigen konnte (Ziemann et al., 2017).

Es zeigte sich in meiner Arbeit, dass HPV-positive Zelllinien sensitiver hinsichtlich des zellulären Überlebens auf Cisplatin ansprechen als HPV-negative Zelllinien. Dies liegt, wie oben beschrieben, an der defekten homologen Rekombination. Bezüglich der Cisplatinempfindlichkeit kann somit der positive HPV-Status als molekularer Marker für das Ansprechen der Therapie mit Cisplatin fungieren. Auch andere Studien suchen nach Markern, die das Ansprechen auf eine Behandlung mit Cisplatin vorhersagen (Griso et al., 2022). Griso et al. arbeiteten dazu verschiedene Mechanismen der Cisplatinresistenz bei HNSCC heraus. Als möglichen Marker nannten sie den Transkriptionsfaktor NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Für Cisplatin-resistente HNSCC konnte gezeigt werden, dass diese eine hohe Expression von NRF2 aufweisen. Dieser fördert die Translation von Proteinen, die durch Cisplatin induzierte reactive oxygen species (ROS) abfangen und so zur Cisplatinresistenz beitragen (Griso et al., 2022).

In einer Analyse zu verschiedenen Signalwegen in HNSCC-Zelllinien konnte festgestellt werden, dass der Fanconi-Anämie/BRCA-Signalweg (FA/BRCA-Signalweg) wichtig für die Cisplatinempfindlichkeit ist (Martens-de Kemp et al., 2017). Dieser Signalweg vermittelt die Reparatur von DNA-Quervernetzungen, welche maßgeblich durch Cisplatin induziert werden (Chen et al., 2016; Martens-de Kemp et al., 2017). Mittels siRNA-Transfektion wurden BRCA1 und BRCA2, welche in den FA/BRCA-Signalweg involviert sind, ausgeschaltet (Martens-de Kemp et al., 2017). Dies hatte zur Folge, dass die Wirkung

des Cisplatins verstärkt wurde und die Zellüberlebensfähigkeit im MTT-Assay abnahm (Martens-de Kemp et al., 2017). Ein anderer Marker ist die heterodimere Nuklease ERCC1-XPF, welche als prognostischer Biomarker hinsichtlich der Wirkung von Cisplatin bei fortgeschrittenen HNSCC fungiert (Bauman et al., 2013). Cisplatin kann, wie bereits erwähnt, DNA-Stränge untereinander vernetzen oder innerhalb eines DNA-Stranges eine Vernetzung aufbauen (Chen et al., 2016). Diese Läsionen werden z.B. durch die NER (Nukleotid-Exizionsreparatur) repariert, an welcher ERCC1-XPF beteiligt ist (Bauman et al., 2013). Bauman et al. bestimmten an insgesamt 90 Kopf-Hals-Tumoren, die mit einer definitiven Radiochemotherapie behandelt wurden, durch Immunhistochemie das Expressionsniveau von ERCC1. Dabei fanden sie heraus, dass eine hohe Expression von ERCC1 mit einem niedrigeren progressionsfreien Überleben assoziiert ist (Bauman et al., 2013).

4.7 Klinische Relevanz und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit BEZ235 zum einen die Cisplatinempfindlichkeit in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien steigert und zum anderen, dass die Strahlenempfindlichkeit auch in Kombination mit Cisplatin gesteigert werden kann. Diese erhöhte Strahlensensibilisierung durch BEZ235 geschieht unabhängig vom HPV-Status. BEZ235 wurde bereits in einer Phase-II-Studie als Monotherapie angewendet, welche aufgrund von Nebenwirkungen vorzeitig beendet werden musste (NCT01856101). Wie Rodon et al. jedoch feststellten, sind diese Nebenwirkungen konzentrationsabhängig (Rodon et al., 2018). In meinem Experiment konnte gezeigt werden, dass bereits eine Konzentration von 50 nM BEZ235 eine Strahlensensibilisierung im Koloniebildungstest hervorruft. Unter anderem werden aktuell in Studien die PI3K-Inhibitoren BKM120 sowie GDC0980 für die HNSCC getestet, welche jedoch weniger effektiv bezüglich ihrer Wirkung sind (Glorieux et al., 2020).
Die hier gezeigten Untersuchungen sind an Zellkulturen durchgeführt worden. Damit sind diese Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragbar. In einem nächsten Schritt sollte dieser Ansatz auch *in vivo* in einem Tumormodell überprüft werden. Eine Idee wäre zum Beispiel, diese Untersuchungen an frischem Tumormaterial mittels ex-vivo Assays durchzuführen, um so auch die Reaktion des Tumormilieus zu beurteilen. Auch sollte überprüft werden, inwieweit BEZ235 eine

strahlensensibilisierende Wirkung im Normalgewebe hat – hierzu fehlen aktuell Untersuchungen.

Für die Zukunft könnten die hier vorgestellten Ergebnisse dazu beitragen, ein neues Interesse an dem dualen Inhibitor BEZ235 zu wecken, um die Wirkung von BEZ235 in Kombination mit einer Radiochemotherapie in einer neuen klinischen Studie mit HNSCC zu untersuchen. Die Verstärkung der Radiochemotherapie durch BEZ235 könnte zu einer Reduzierung der Cisplatinkonzentration führen, wodurch die Nebenwirkungen der Therapie verringert werden könnten. Somit könnte diese Tripel-Kombination ein klinisch vielversprechender Ansatz sein, um bessere Prognosen bei gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen zu erzielen.

5. Zusammenfassung

Die Kopf-Hals-Karzinome (HNSCC) sind weltweit betrachtet die sechst häufigste Tumorerkrankung des Menschen und weisen eine steigende Inzidenz auf. Zu den Risikofaktoren zählen neben dem Konsum von Alkohol und Nikotin die Infektion mit dem humanen Papillomavirus, häufig des Typs 16. Ätiologisch unterscheidet man somit zwischen HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC.

Die multimodale Therapie der beiden Entitäten ist identisch. Neben der Operation wird eine Strahlentherapie in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin als definitive oder adjuvante Behandlung angewendet. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen bei den HPV-positiven HNSCC bei ca. 85%, während sie hingegen bei den HPV-negativen HNSCC bei circa 50% stagnieren. Aufgrund der Toxizität des Cisplatins sowie der Radiotherapie gehen diese Behandlungen mit erheblichen Nebenwirkungen und Einschränkungen der Lebensqualität einher.

Wie vorangegangene Experimente im Labor bereits gezeigt haben, kann der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg effektiv durch NVP-BEZ235 (BEZ235) inhibiert werden. Dies führt zu einer Strahlensensibilisierung unabhängig vom HPV-Status.

In dieser Dissertation sollte geklärt werden, inwieweit der HPV-Status Einfluss auf das zelluläre Überleben hat, wenn man die homologe Rekombination (HR) über Hemmung ihres Schlüsselproteins Rad51 mittels siRNA-Transfektion inhibiert. Dies wurde an drei HPV-negativen (Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3) sowie an zwei HPV-positiven (UM-SCC-47, UD-SCC-2) Zelllinien demonstriert. Nach der Hemmung von Rad51 wurden die Zellen mit Cisplatin, BEZ235 oder einer Bestrahlung behandelt. Zudem wurden die verschiedenen Therapien auch untereinander kombiniert. Das zelluläre Überleben wurde mittels des Koloniebildungstests ermittelt. Die Hemmung von Rad51 wurde durch den Western Blot bewiesen.

Folgende Beobachtungen konnten festgehalten werden:

1. Die Plattierungseffizienz nimmt unabhängig vom HPV-Status nach der Hemmung von Rad51 je nach Zelllinie mehr oder weniger stark ab.
2. Während die HPV-negativen Zelllinien nach der Hemmung von Rad51 eine höhere Cisplatinempfindlichkeit aufweisen, bleibt diese bei den HPV-positiven Zelllinien identisch.

3. Die Vorbehandlung mit BEZ235 50 nM zeigt bei den nativen HPV-negativen Zelllinien (Ausnahme UM-SCC-11b) keine Wirkung in Kombination mit Cisplatin im Gegensatz zu den HPV-positiven Zelllinien.
4. Bei einer Hemmung von Rad51 verhalten sich die HPV-negativen Zelllinien bei einer Vorbehandlung mit BEZ235 und anschließender Cisplatingabe wie native HPV-positive Zelllinien.
5. Die Kombination aus Bestrahlung und Cisplatin zeigt bei den HPV-negativen Zelllinien gegenüber einer alleinigen Bestrahlung additive Effekte. Bei einer Hemmung von Rad51 sinkt das zelluläre Überleben unter dieser Kombination ebenfalls nicht.
6. Die Kombination aus Bestrahlung und BEZ235 zeigt bei den HPV-negativen Zelllinien einen Vorteil hinsichtlich eines niedrigeren zellulären Überlebens. Bei einer Herabregulation von Rad51 sinkt das zelluläre Überleben unter dieser Kombination weiter.
7. Die Triple-Therapie aus BEZ235, Cisplatin und Bestrahlung zeigt sowohl bei HPV-negativen als auch bei HPV-positiven Zelllinien das niedrigste zelluläre Überleben. Dieses lässt sich noch weiter senken, wenn die HPV-negativen Zelllinien eine Herabregulation von Rad51 erfahren.

Diese Arbeit bestätigt somit, dass die HPV-positiven Zelllinien über eine defekte HR verfügen, während sie bei den HPV-negativen Zelllinien intakt ist. Dies könnte die besseren Prognosen der HPV-positiven HNSCC erklären. Schaltet man Rad51, ein Schlüsselprotein der HR, in den HPV-negativen Zelllinien aus, beobachtet man unter Behandlung mit Cisplatin, BEZ235 und/oder Bestrahlung ein ähnliches zelluläres Überleben wie bei den HPV-positiven Zelllinien.

Es zeigte sich zudem, dass BEZ235 eine ausgeprägte strahlensensibilisierende Wirkung hat und in der Kombination mit einer Bestrahlung und Cisplatin das niedrigste zelluläre Überleben erreichte. Zukünftig ist zu untersuchen, ob diese in vitro gemachten Ergebnisse der Triple-Therapie auch in einer klinischen Studie zu fortgeschrittenen HNSCC reproduzierbar sind. Dies könnte dazu führen, dass die Nebenwirkungen durch Reduktion der Cisplatinkonzentration verringert sowie die Prognosen der HNSCC durch eine erhöhte Wirksamkeit der Radiochemotherapie verbessert werden.

6. Summary

Head and neck cancer (HNSCC) is the sixth most common tumor worldwide and shows an increasing incidence. In addition to consumption of alcohol and nicotine, the risk factors include infection with the human papilloma virus, often type 16. Etiologically, a distinction is made between HPV-negative and HPV-positive HNSCC.

The multimodal therapy of these two entities is identical. In addition to surgery, radiotherapy is used in combination with the chemotherapy drug cisplatin as definitive or adjuvant treatment. The 5-year survival rate for HPV-positive HNSCC is around 85%, while it stagnates at around 50% for HPV-negative HNSCC. Due to the strong toxicity of cisplatin and radiotherapy, these therapies are associated with significant side effects and reduced quality of life.

As previous experiments in the laboratory have shown, the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway can be effectively blocked by NVP-BEZ235 (BEZ235). This leads to radiation sensitization regardless of HPV status.

In this dissertation, it should be clarified to what extent the HPV status influences cellular survival if homologous recombination (HR) is inhibited via knockdown of its key protein Rad51 using siRNA transfection. This was demonstrated in three HPV-negative (Cal-33, UM-SCC-11b, UM-SCC-3) and two HPV-positive (UM-SCC-47, UD-SCC-2) cell lines. After knockdown of Rad51 cells were treated by cisplatin, BEZ235 or irradiation. In addition, various therapies were also combined with each other. Cellular survival was determined using colony formation assay. Knockdown of Rad51 was demonstrated by Western blot.

Following observations were made:

1. Plating efficiency decreases to a greater or lesser extent depending on cell line, regardless of the HPV-status after knockdown of Rad51.
2. While HPV-negative cell lines show a higher sensitivity to cisplatin after Rad51 knockout, this remains identical in HPV-positive cell lines.
3. Pretreatment with BEZ235 50 nM shows no effect in native HPV-negative cell lines (exception UM-SCC-11b) in combination with cisplatin in contrast to HPV-positive cell lines.

4. If Rad51 is knocked down, HPV-negative cell lines behave like native HPV-positive cell lines when pretreated with BEZ235 and then given cisplatin.
5. Combination of irradiation and cisplatin shows additive effects in HPV-negative cell lines compared to irradiation alone. If Rad51 is knocked down, cellular survival does not decrease under this combination either.
6. Combination of irradiation and BEZ235 shows an advantage in terms of lower cellular survival in HPV-negative cell lines. If Rad51 is knocked down, cellular survival is further reduced under this combination.
7. Triple therapy of BEZ235, cisplatin and irradiation shows the lowest cellular survival in both HPV-negative and HPV-positive cell lines. This can be reduced even further if Rad51 is knocked down in HPV-negative cell lines.

This work thus confirms that HPV-positive cell lines have a defective HR, while it is intact in HPV-negative cell lines. This could explain the better prognosis of HPV-positive HNSCC. When Rad51, a key protein of HR, is knocked down in HPV-negative cell lines, cellular survival is similar to that seen in HPV-positive cell lines under treatment with cisplatin, BEZ235 and/or irradiation.

BEZ235 was also found to have a pronounced radiosensitizing effect and achieved the lowest cellular survival when combined with irradiation and cisplatin. Future research is needed to determine whether these results of triple therapy made in vitro can be reproduced in a clinical trial of advanced HNSCC. This could lead to a reduction in side effects by reducing the concentration of cisplatin, as well as an improvement in the prognosis of HNSCC by increasing the efficacy of radiochemotherapy.

7. Literaturverzeichnis

Abe, T., Matsumoto, D., Nakayama, T., Shimazaki, Y., Sagara, A., Kanehira, D., Azechi, T., Sato, F., Sakai, H., Yumoto, T., & Kamei, J. (2020). Effect of different shielding conditions on the stability of Cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, *6*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s40780-020-00163-x

Arenz, A., Ziemann, F., Mayer, C., Wittig, A., Dreffke, K., Preising, S., Wagner, S., Klussmann, J. P., Engenhart-Cabillic, R., & Wittekindt, C. (2014). Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlenther Onkol*, *190*(9), 839-846. https://doi.org/10.1007/s00066-014-0605-5

Arnaudeau, C., Lundin, C., & Helleday, T. (2001). DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol*, *307*(5), 1235-1245. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4564

Arnoult, N., Correia, A., Ma, J., Merlo, A., Garcia-Gomez, S., Maric, M., Tognetti, M., Benner, C. W., Boulton, S. J., Saghatelian, A., & Karlseder, J. (2017). Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature*, *549*(7673), 548-552. https://doi.org/10.1038/nature24023

Bauman, J. E., Austin, M. C., Schmidt, R., Kurland, B. F., Vaezi, A., Hayes, D. N., Mendez, E., Parvathaneni, U., Chai, X., Sampath, S., & Martins, R. G. (2013). ERCC1 is a prognostic biomarker in locally advanced head and neck cancer: results from a randomised, phase II trial. *Br J Cancer*, *109*(8), 2096-2105. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.576

Bauml, J. M., Vinnakota, R., Anna Park, Y. H., Bates, S. E., Fojo, T., Aggarwal, C., Limaye, S., Damjanov, N., Di Stefano, J., Ciunci, C., Genden, E. M., Wisnivesky, J. P., Ferrandino, R., Mamtani, R., Langer, C. J., Cohen, R. B., & Sigel, K. (2019). Cisplatin Every 3 Weeks Versus Weekly With Definitive Concurrent Radiotherapy for Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J Natl Cancer Inst*, *111*(5), 490-497. https://doi.org/10.1093/jnci/djy133

Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefèbvre, J.-L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., & van Glabbeke, M. (2004). Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, *350*(19), 1945-1952. https://doi.org/10.1056/NEJMoa032641

Birkelbach, M., Ferraiolo, N., Gheorghiu, L., Pfäffle, H. N., Daly, B., Ebright, M. I., Spencer, C., O'Hara, C., Whetstine, J. R., Benes, C. H., Sequist, L. V., Zou, L., Dahm-Daphi, J., Kachnic, L. A., & Willers, H. (2013). Detection of Impaired Homologous Recombination Repair in NSCLC Cells and Tissues. *Journal of Thoracic Oncology*, *8*(3), 279-286. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31827ecf83

Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J. B., Stemhagen, A., & Fraumeni, J. F., Jr. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, *48*(11), 3282-3287.

Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., & Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genet Mol Biol*, *38*(4), 420-432. https://doi.org/10.1590/s1415-475738420150019

Brook, I. (2020). Late side effects of radiation treatment for head and neck cancer. *Radiat Oncol J*, *38*(2), 84-92. https://doi.org/10.3857/roj.2020.00213

Budach, W., Hehr, T., Budach, V., Belka, C., & Dietz, K. (2006). A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer*, *6*, 28. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-28

Busch, C. J., Becker, B., Kriegs, M., Gatzemeier, F., Krüger, K., Möckelmann, N., Fritz, G., Petersen, C., Knecht, R., Rothkamm, K., & Rieckmann, T. (2016). Similar cisplatin sensitivity of HPV-positive and -negative HNSCC cell lines. *Oncotarget*, *7*(24), 35832-35842. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9028

Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*, *58*(5), 235-263. https://doi.org/10.1002/em.22087

Chen, P., Li, J., Chen, Y. C., Qian, H., Chen, Y. J., Su, J. Y., Wu, M., & Lan, T. (2016). The functional status of DNA repair pathways determines the sensitization effect to cisplatin in non-small cell lung cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*, *39*(6), 511-522. https://doi.org/10.1007/s13402-016-0291-7

Cooper, J. S., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Campbell, B. H., Saxman, S. B., Kish, J. A., Kim, H. E., Cmelak, A. J., Rotman, M., Machtay, M., Ensley, J. F., Chao, K. S. C., Schultz, C. J., Lee, N., & Fu, K. K. (2004). Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, *350*(19), 1937-1944. https://doi.org/10.1056/NEJMoa032646

Damia, G., & Broggini, M. (2019). Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair. *Cancers (Basel)*, *11*(1). https://doi.org/10.3390/cancers11010119

Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J., & Gharagouzlo, E. (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*, *13*(2), 48-57.

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, *740*, 364-378. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025

de Abreu Costa, L., Henrique Fernandes Ottoni, M., Dos Santos, M. G., Meireles, A. B., Gomes de Almeida, V., de Fátima Pereira, W., Alves de Avelar-Freitas, B., & Eustáquio Alvim Brito-Melo, G. (2017). Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF-α, IFN-γ, and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecules*, *22*(11). https://doi.org/10.3390/molecules22111789

Deans, A. J., & West, S. C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(7), 467-480. https://doi.org/10.1038/nrc3088

Dikomey, E., Borgmann, K., Köcher, S., Kriegs, M., Mansour, W., Parplys, A., Rieckmann, T., & Rothkamm, K. (2016). Radiation DNA damage and use in cancer/therapeutics-translation of radiation modifiers. In *DNA Repair in Cancer* (pp. 329-352). Elsevier Inc.

Dikomey, E., Borgmann, K., Kriegs, M., Mansour, W., Petersen, C., & Rieckmann, T. (2012). Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen. In *Allgemeine Tumortherapie*. Zeller - Zur Hausen Onkologie. ecomed Medizin, Heidelberg.

Dille, M. F., Wilmington, D., McMillan, G. P., Helt, W., Fausti, S. A., & Konrad-Martin, D. (2012). Development and validation of a cisplatin dose-ototoxicity model. *J Am Acad Audiol*, *23*(7), 510-521. https://doi.org/10.3766/jaaa.23.7.3

Dirks, W. G., MacLeod, R. A., Nakamura, Y., Kohara, A., Reid, Y., Milch, H., Drexler, H. G., & Mizusawa, H. (2010). Cell line cross-contamination initiative: an interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. *Int J Cancer*, *126*(1), 303-304. https://doi.org/10.1002/ijc.24999

Florea, A. M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*, *3*(1), 1351-1371. https://doi.org/10.3390/cancers3011351

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, *1*(5), 2315-2319. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*, *22*(23). https://doi.org/10.3390/ijms222312827

Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., Zahurak, M. L., Daniel, R. W., Viglione, M., Symer, D. E., Shah, K. V., & Sidransky, D. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, *92*(9), 709-720. https://doi.org/10.1093/jnci/92.9.709

Gillison, M. L., Zhang, Q., Jordan, R., Xiao, W., Westra, W. H., Trotti, A., Spencer, S., Harris, J., Chung, C. H., & Ang, K. K. (2012). Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*, *30*(17), 2102-2111. https://doi.org/10.1200/jco.2011.38.4099

Giordano, F. (2019). Kapitel 3 - HNO-Tumoren. In F. Giordano, F. Wenz, M. B. Mannheim, D. B. Mannheim, S. C. Mannheim, K. F. Mannheim, C. G. Hamburg, M. G. Mannheim, C. H. Mannheim, K. L. Karlsruhe, C. N. Mannheim, N. N. Freiburg, P. N. Mannheim, M. O. Mannheim, A. S.-C. Mannheim, E. S. Mannheim, & V. S. Mannheim (Eds.), *Strahlentherapie kompakt (Dritte Ausgabe)* (pp. 49-62). Urban & Fischer. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-3-437-23292-3.00003-9

Glorieux, M., Dok, R., & Nuyts, S. (2020). The influence of PI3K inhibition on the radiotherapy response of head and neck cancer cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 16208. https://doi.org/10.1038/s41598-020-73249-z

Griso, A. B., Acero-Riaguas, L., Castelo, B., Cebrián-Carretero, J. L., & Sastre-Perona, A. (2022). Mechanisms of Cisplatin Resistance in HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cells*, *11*(3), 561. https://www.mdpi.com/2073-4409/11/3/561

Grønhøj Larsen, C., Gyldenløve, M., Jensen, D. H., Therkildsen, M. H., Kiss, K., Norrild, B., Konge, L., & von Buchwald, C. (2014). Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer*, *110*(6), 1587-1594. https://doi.org/10.1038/bjc.2014.42

Han, H. (2018). RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods Mol Biol*, *1706*, 293-302. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(9), a011189. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189

Horizon Discovery Group. (o.D.). *Dharmacon™ siRNA solutions*. URL: https://horizondiscovery.com/en/gene-modulation/knockdown/sirna (Stand: 01.07.2023)

Hsu, C.-M., Lin, P.-M., Tsai, Y.-T., Tsai, M.-S., Tseng, C.-H., Lin, S.-F., & Yang, M.-Y. (2018). NVP-BEZ235, a dual PI3K-mTOR inhibitor, suppresses the growth of FaDu hypopharyngeal squamous cell carcinoma and has a synergistic effect with Cisplatin. *Cell Death Discovery*, *4*, 57. https://doi.org/10.1038/s41420-018-0060-7

Hu, J., Cao, J., Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Zhang, B., Shen, J., Cai, L., Cai, X., & Chen, M. (2021). Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*(1), 157. https://doi.org/10.1186/s13045-021-01169-0

Huang, J., Zhang, J., Shi, C., Liu, L., & Wei, Y. (2016). Survival, recurrence and toxicity of HNSCC in comparison of a radiotherapy combination with cisplatin versus cetuximab: a meta-analysis. *BMC Cancer*, *16*(1), 689. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2706-2

Huang, J.-W., Wang, Y., Dhillon, K. K., Calses, P., Villegas, E., Mitchell, P. S., Tewari, M., Kemp, C. J., & Taniguchi, T. (2013). Systematic Screen Identifies miRNAs That Target RAD51 and RAD51D to Enhance Chemosensitivity. *Molecular Cancer Research*, *11*(12), 1564-1573. https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-13-0292

Iglesias-Bartolome, R., Martin, D., & Gutkind, J. S. (2013). Exploiting the head and neck cancer oncogenome: widespread PI3K-mTOR pathway alterations and novel molecular targets. *Cancer Discov*, *3*(7), 722-725. https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-13-0239

IJff, M., van Bochove, G. G. W., Whitton, D., Winiarczyk, R., Honhoff, C., Rodermond, H., Crezee, J., Stalpers, L. J. A., Franken, N. A. P., & Oei, A. L. (2021). PARP1-Inhibition Sensitizes Cervical Cancer Cell Lines for Chemoradiation and Thermoradiation. *Cancers (Basel)*, *13*(9). https://doi.org/10.3390/cancers13092092

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K. L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, *17*(15), 1829-1834. https://doi.org/10.1101/gad.1110003

Ito, M., Yamamoto, S., Nimura, K., Hiraoka, K., Tamai, K., & Kaneda, Y. (2005). Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *J Gene Med*, *7*(8), 1044-1052. https://doi.org/10.1002/jgm.753

Jamieson, E. R., & Lippard, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*, *99*(9), 2467-2498. https://doi.org/10.1021/cr980421n

Johnson, A. D., Alberts, B., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., & Schäfer, U. (2017). Zellsignalübertragung. In *Molekularbiologie der Zelle* (pp. 971-974). WileyJohn Wiley & Sons.

Johnson, D. E., Burtness, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3

Keilholz, U. (2012). Diagnostik und moderne Therapie von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. *ONKOLOGIE heute*, 36-40.

Klussmann, J. P., Preuss, S. F., & Speel, E. J. (2009). Human papillomavirus and cancer of the oropharynx. Molecular interaction and clinical implications. *Hno*, *57*(2), 113-122. https://doi.org/10.1007/s00106-008-1867-y (Humane Papillomviren und Oropharynxkarzinome. Molekulare Interaktion und klinische Auswirkung.)

Kranjc Brezar, S., Prevc, A., Niksic Zakelj, M., Brozic, A., Cemazar, M., Strojan, P., & Sersa, G. (2020). Synergistic effect of cisplatin chemotherapy combined with fractionated radiotherapy regimen in HPV-positive and HPV-negative experimental pharyngeal squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, *10*(1), 1563. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58502-9

Kuger, S., Cörek, E., Polat, B., Kämmerer, U., Flentje, M., & Djuzenova, C. S. (2014). Novel PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Radiosensitizes Breast Cancer Cell Lines under Normoxic and Hypoxic Conditions. *Breast Cancer (Auckl)*, *8*, 39-49. https://doi.org/10.4137/bcbcr.S13693

Lacas, B., Carmel, A., Landais, C., Wong, S. J., Licitra, L., Tobias, J. S., Burtness, B., Ghi, M. G., Cohen, E. E. W., Grau, C., Wolf, G., Hitt, R., Corvò, R., Budach, V., Kumar, S., Laskar, S. G., Mazeron, J. J., Zhong, L. P., Dobrowsky, W., . . . Pignon, J. P. (2021). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 107 randomized trials and 19,805 patients, on behalf of MACH-NC Group. *Radiother Oncol*, *156*, 281-293. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.01.013

Lassen, P., Eriksen, J. G., Hamilton-Dutoit, S., Tramm, T., Alsner, J., & Overgaard, J. (2009). Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*, *27*(12), 1992-1998. https://doi.org/10.1200/jco.2008.20.2853

Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(1), 9-22. https://doi.org/10.1038/nrc2982

Li, X., & Heyer, W.-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, *18*(1), 99-113. https://doi.org/10.1038/cr.2008.1

Li, Y., Yang, C., Gan, Y., Lu, F., & Qin, Y. (2023). Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, *280*(1), 11-22. https://doi.org/10.1007/s00405-022-07572-8

Lindemann, A., Patel, A. A., Tang, L., Tanaka, N., Gleber-Netto, F. O., Bartels, M. D., Wang, L., McGrail, D. J., Lin, S. Y., Frank, S. J., Frederick, M. J., Myers, J. N., & Osman, A. A. (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. https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-20-0252

Linge, A., Schötz, U., Löck, S., Lohaus, F., von Neubeck, C., Gudziol, V., Nowak, A., Tinhofer, I., Budach, V., Sak, A., Stuschke, M., Balermpas, P., Rödel, C., Bunea, H., Grosu, A. L., Abdollahi, A., Debus, J., Ganswindt, U., Lauber, K., . . . Baumann, M. (2018). Comparison of detection methods for HPV status as a prognostic marker for loco-regional control after radiochemotherapy in patients with HNSCC. *Radiother Oncol*, *127*(1), 27-35. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.12.007

Liu, Y., & Lu, L. Y. (2020). BRCA1 and homologous recombination: implications from mouse embryonic development. *Cell Biosci*, *10*, 49. https://doi.org/10.1186/s13578-020-00412-4

Lohaus, F., Linge, A., Tinhofer, I., Budach, V., Gkika, E., Stuschke, M., Balermpas, P., Rödel, C., Avlar, M., Grosu, A. L., Abdollahi, A., Debus, J., Bayer, C., Belka, C., Pigorsch, S., Combs, S. E., Mönnich, D., Zips, D., von Neubeck, C., . . . Baumann, M. (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. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.11.011

Lui, V. W., Hedberg, M. L., Li, H., Vangara, B. S., Pendleton, K., Zeng, Y., Lu, Y., Zhang, Q., Du, Y., Gilbert, B. R., Freilino, M., Sauerwein, S., Peyser, N. D., Xiao, D., Diergaarde, B., Wang, L., Chiosea, S., Seethala, R., Johnson, J. T., . . . Grandis, J. R. (2013). Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*, *3*(7), 761-769. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0103

Luo, H., Yu, Y. Y., Chen, H. M., Wu, W., Li, Y., & Lin, H. (2019). The combination of NVP-BEZ235 and rapamycin regulates nasopharyngeal carcinoma cell viability and apoptosis via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Exp Ther Med*, *17*(1), 99-106. https://doi.org/10.3892/etm.2018.6896

Mahaney, B. L., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*, *417*(3), 639-650. https://doi.org/10.1042/bj20080413

Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., & Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci*, *17*(1). https://doi.org/10.3390/ijms17010102

Martens-de Kemp, S. R., Brink, A., van der Meulen, I. H., de Menezes, R. X., te Beest, D. E., Leemans, C. R., van Beusechem, V. W., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2017). The FA/BRCA Pathway Identified as the Major Predictor of Cisplatin Response in Head and Neck Cancer by Functional Genomics. *Molecular Cancer Therapeutics*, *16*(3), 540-550. https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-16-0457

Mendenhall, W. M., Hinerman, R. W., Amdur, R. J., Malyapa, R. S., Lansford, C. D., Werning, J. W., & Villaret, D. B. (2006). Postoperative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Med Res*, *4*(3), 200-208. https://doi.org/10.3121/cmr.4.3.200

Mesri, E. A., Feitelson, M. A., & Munger, K. (2014). Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe*, *15*(3), 266-282. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.011

Mo, R. H., Zaro, J. L., Ou, J. H., & Shen, W. C. (2012). Effects of Lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells. *Mol Biotechnol*, *51*(1), 1-8. https://doi.org/10.1007/s12033-011-9422-6

Möckelmann, N., Rieckmann, T., Busch, C.-J., Becker, B., Gleißner, L., Hoffer, K., Omniczynski, M., Steinmeister, L., Laban, S., Grénman, R., Petersen, C., Rothkamm, K., Dikomey, E., Knecht, R., & Kriegs, M. (2016). Effect of sorafenib on cisplatin-based chemoradiation in head and neck cancer cells. *Oncotarget*, *7*(17). https://www.oncotarget.com/article/8275/text/

Mylly, M., Nissi, L., Huusko, T., Routila, J., Vaittinen, S., Irjala, H., Leivo, I., & Ventelä, S. (2022). Epidemiological Study of p16 Incidence in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma 2005-2015 in a Representative Northern European Population. *Cancers (Basel)*, *14*(22). https://doi.org/10.3390/cancers14225717

Nair, T. S., Thomas, T. B., Yang, L., Kakaraparthi, B. N., Morris, A. C., Clark, A. M., Campredon, L. P., Brouwer, A. F., Eisenberg, M. C., Meza, R., & Carey, T. E. (2020). Characteristics of head and neck squamous cell carcinoma cell Lines reflect human tumor biology independent of primary etiologies and HPV status. *Transl Oncol*, *13*(10), 100808. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100808

Netzker, R. (2022). Micro-RNA (miRNA) und Short interfering RNA (siRNA). In J. Rassow, R. Netzker, & K. Hauser (Eds.), *Duale Reihe Biochemie* (5. vollständig überarbeitete Auflage ed., pp. 477). Georg Thieme Verlag KG. https://doi.org/10.1055/b000000425

Ojeda, L., Gao, J., Hooten, K. G., Wang, E., Thonhoff, J. R., Dunn, T. J., Gao, T., & Wu, P. (2011). Critical role of PI3K/Akt/GSK3β in motoneuron specification from human neural stem cells in response to FGF2 and EGF. *PLoS One*, *6*(8), e23414. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023414

Oun, R., Moussa, Y. E., & Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans*, *47*(19), 6645-6653. https://doi.org/10.1039/c8dt00838h

Paplomata, E., & O'Regan, R. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol*, *6*(4), 154-166. https://doi.org/10.1177/1758834014530023

Pastwa, E., Poplawski, T., Lewandowska, U., Somiari, S. B., Blasiak, J., & Somiari, R. I. (2014). Wortmannin potentiates the combined effect of etoposide and cisplatin in human glioma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *53*, 423-431. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.06.007

Porceddu, S. V., Scotté, F., Aapro, M., Salmio, S., Castro, A., Launay-Vacher, V., & Licitra, L. (2019). Treating Patients With Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Unsuitable to Receive Cisplatin-Based Therapy. *Front Oncol*, *9*, 1522. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01522

Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*, *4*, 64. https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064

Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., & Jasin, M. (2015). Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*(4), a016600. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016600

Rathod, S., Gupta, T., Ghosh-Laskar, S., Murthy, V., Budrukkar, A., & Agarwal, J. (2013). Quality-of-life (QOL) outcomes in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) treated with intensity-modulated radiation therapy (IMRT) compared to three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT): evidence from a prospective randomized study. *Oral Oncol*, *49*(6), 634-642. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.02.013

Riaz, M. A., Sak, A., Erol, Y. B., Groneberg, M., Thomale, J., & Stuschke, M. (2019). Metformin enhances the radiosensitizing effect of cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines with different cisplatin sensitivities. *Sci Rep*, *9*(1), 1282. https://doi.org/10.1038/s41598-018-38004-5

Rieckmann, T., Tribius, S., Grob, T. J., Meyer, F., Busch, C. J., Petersen, C., Dikomey, E., & Kriegs, M. (2013). HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an

impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol*, *107*(2), 242-246. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.03.013

Rocha, C., Silva, M., Quinet, A., Cabral-Neto, J., & Menck, C. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship. *Clinics*, *73*. https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s

Rodon, J., Pérez-Fidalgo, A., Krop, I. E., Burris, H., Guerrero-Zotano, A., Britten, C. D., Becerra, C., Schellens, J., Richards, D. A., Schuler, M., Abu-Khalaf, M., Johnson, F. M., Ranson, M., Edenfield, J., Silva, A. P., Hackl, W., Quadt, C., Demanse, D., Duval, V., & Baselga, J. (2018). Phase 1/1b dose escalation and expansion study of BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in patients with advanced solid tumors including patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, *82*(2), 285-298. https://doi.org/10.1007/s00280-018-3610-z

Rühle, A., Grosu, A. L., & Nicolay, N. H. (2021). De-Escalation Strategies of (Chemo)Radiation for Head-and-Neck Squamous Cell Cancers-HPV and Beyond. *Cancers (Basel)*, *13*(9). https://doi.org/10.3390/cancers13092204

Ruíz, G., Valencia-González, H. A., León-Galicia, I., García-Villa, E., García-Carrancá, A., & Gariglio, P. (2018). Inhibition of RAD51 by siRNA and Resveratrol Sensitizes Cancer Stem Cells Derived from HeLa Cell Cultures to Apoptosis. *Stem Cells Int*, *2018*, 2493869. https://doi.org/10.1155/2018/2493869

Salazar, R., Garcia-Carbonero, R., Libutti, S. K., Hendifar, A. E., Custodio, A., Guimbaud, R., Lombard-Bohas, C., Ricci, S., Klümpen, H. J., Capdevila, J., Reed, N., Walenkamp, A., Grande, E., Safina, S., Meyer, T., Kong, O., Salomon, H., Tavorath, R., & Yao, J. C. (2018). Phase II Study of BEZ235 versus Everolimus in Patients with Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Naïve Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Oncologist*, *23*(7), 766-e790. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0144

Sanford-Crane, H., Pejovic, T., & Xiao, X. (2018). Drugging homologous recombination: back to the future. *Future Med Chem*, *10*(11), 1279-1281. https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0096

Schötz, U., Balzer, V., Brandt, F. W., Ziemann, F., Subtil, F. S. B., Rieckmann, T., Kocher, S., Engenhart-Cabillic, R., Dikomey, E., Wittig, A., & Arenz, A. (2020). Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Enhances Radiosensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Due to Suppressed Double-Strand Break (DSB) Repair by Non-Homologous End Joining. *Cancers (Basel)*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/cancers12020467

Schwarz, B. M. (2021). *Nanoskopische Charakterisierung von strahlungsinduzierten DNA Schäden im Kontext der Chromatinstruktur und Reparaturproteinorganisation* [Dissertation, Universität der Bundeswehr München]. München.

Seifert, R. (2018). Arzneistoffe zur Behandlung von malignen Tumorerkrankungen. In *Basiswissen Pharmakologie* (pp. 379). Springer-Verlag GmbH Deutschland. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-56303-8

Stephen, J. K., Divine, G., Chen, K. M., Chitale, D., Havard, S., & Worsham, M. J. (2013). Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol*, *2*(1), 51-61. https://doi.org/10.5539/cco.v2n1p51

Stöver, I., & Feyer, P. (2018). *HNO-Tumoren* (Vol. 2). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-56577-3

Strojan, P., Hutcheson, K. A., Eisbruch, A., Beitler, J. J., Langendijk, J. A., Lee, A. W. M., Corry, J., Mendenhall, W. M., Smee, R., Rinaldo, A., & Ferlito, A. (2017). Treatment of late sequelae after radiotherapy for head and neck cancer. *Cancer Treat Rev*, *59*, 79-92. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.07.003

Subtil, F. S. B., Gröbner, C., Recknagel, N., Parplys, A. C., Kohl, S., Arenz, A., Eberle, F., Dikomey, E., Engenhart-Cabillic, R., & Schötz, U. (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*, *14*(13), 3160. https://doi.org/10.3390/cancers14133160

Szturz, P., Cristina, V., Herrera Gómez, R. G., Bourhis, J., Simon, C., & Vermorken, J. B. (2019). Cisplatin Eligibility Issues and Alternative Regimens in Locoregionally Advanced Head and Neck Cancer: Recommendations for Clinical Practice. *Front Oncol*, *9*, 464. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00464

Szturz, P., Wouters, K., Kiyota, N., Tahara, M., Prabhash, K., Noronha, V., Castro, A., Licitra, L., Adelstein, D., & Vermorken, J. B. (2017). Weekly Low-Dose Versus Three-Weekly High-Dose Cisplatin for Concurrent Chemoradiation in Locoregionally Advanced Non-Nasopharyngeal Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Aggregate Data. *Oncologist*, *22*(9), 1056-1066. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0015

Thermo Fisher Scientific Inc. (o.D.). *siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent*. URL: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/AM4510 (Stand: 07.06.2023)

Toulany, M., Lee, K. J., Fattah, K. R., Lin, Y. F., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Chen, B. P., Chen, D. J., & Rodemann, H. P. (2012). Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res*, *10*(7), 945-957. https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-11-0592

Toyoda, M., Watanabe, K., Amagasaki, T., Natsume, K., Takeuchi, H., Quadt, C., Shirao, K., & Minami, H. (2019). A phase I study of single-agent BEZ235 special delivery system sachet in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, *83*(2), 289-299. https://doi.org/10.1007/s00280-018-3725-2

Tribius, S., & Bergelt, C. (2011). Intensity-modulated radiotherapy versus conventional and 3D conformal radiotherapy in patients with head and neck cancer: is there a worthwhile quality of life gain? *Cancer Treat Rev*, *37*(7), 511-519. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.01.004

Vigneswaran, N., & Williams, M. D. (2014). Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, *26*(2), 123-141. https://doi.org/10.1016/j.coms.2014.01.001

Wang, L., Han, S., Zhu, J., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Lin, E., Wang, X., Molkentine, D. P., Blanchard, P., Yang, Y., Zhang, R., Sahoo, N., Gillin, M., Zhu, X. R., Zhang, X., Myers, J. N., & Frank, S. J. (2019). Proton versus photon radiation-induced cell death in head and neck cancer cells. *Head Neck*, *41*(1), 46-55. https://doi.org/10.1002/hed.25357

Wang, L., Mosel, A. J., Oakley, G. G., & Peng, A. (2012). Deficient DNA Damage Signaling Leads to Chemoresistance to Cisplatin in Oral Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(11), 2401-2409. https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-12-0448

Wang, W. J., Long, L. M., Yang, N., Zhang, Q. Q., Ji, W. J., Zhao, J. H., Qin, Z. H., Wang, Z., Chen, G., & Liang, Z. Q. (2013). NVP-BEZ235, a novel dual PI3K/mTOR inhibitor, enhances the radiosensitivity of human glioma stem cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, *34*(5), 681-690. https://doi.org/10.1038/aps.2013.22

Waßmuth, L. (2020). *Strahlenempfindlichkeit von nicht synchronisierten und synchronisierten (G1-Phase, S-/G2-Phase) HNSCC-Zellen nach Behandlung mit NVP-BEZ235 und CDDP* [Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg]. Marburg.

Wittekindt, C., Wagner, S., Mayer, C. S., & Klussmann, J. P. (2012). Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *Laryngorhinootologie*, *91 Suppl 1*, 1-26. https://doi.org/10.1055/s-0031-1297241 (Grundlagen der Tumorentstehung und die Bedeutung Humaner Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen.)

Wright, W. D., Shah, S. S., & Heyer, W. D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, *293*(27), 10524-10535. https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372

Xu, C. X., Li, Y., Yue, P., Owonikoko, T. K., Ramalingam, S. S., Khuri, F. R., & Sun, S. Y. (2011). The combination of RAD001 and NVP-BEZ235 exerts synergistic anticancer activity against non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *PLoS One*, *6*(6), e20899. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020899

Yu, S. S., Tu, Y., Xu, L. L., Tao, X. Q., Xu, S., Wang, S. S., Xiong, Y. F., & Mei, J. H. (2015). Effects of Rad51 on survival of A549 cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, *16*(1), 175-179. https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.1.175

Zecha, J. A., Raber-Durlacher, J. E., Nair, R. G., Epstein, J. B., Sonis, S. T., Elad, S., Hamblin, M. R., Barasch, A., Migliorati, C. A., Milstein, D. M., Genot, M. T., Lansaat, L., van der Brink, R., Arnabat-Dominguez, J., van der Molen, L., Jacobi, I., van Diessen, J., de Lange, J., Smeele, L. E., . . . Bensadoun, R. J. (2016). Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *Support Care Cancer*, *24*(6), 2781-2792. https://doi.org/10.1007/s00520-016-3152-z

Zeng, L., Nikolaev, A., Xing, C., Della Manna, D. L., & Yang, E. S. (2020). CHK1/2 Inhibitor Prexasertib Suppresses NOTCH Signaling and Enhances Cytotoxicity of Cisplatin and Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *19*(6), 1279-1288. https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-19-0946

Zhou, C., & Parsons, J. L. (2020). The radiobiology of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Mol Med*, *22*, e3. https://doi.org/10.1017/erm.2020.4

Ziemann, F., Arenz, A., Preising, S., Wittekindt, C., Klussmann, J., Engenhart-Cabillic, R., & Wittig, A. (2015). Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation ± Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis. *Am J Cancer Res*.

Ziemann, F., Seltzsam, S., Dreffke, K., Preising, S., Arenz, A., Subtil, F. S. B., Rieckmann, T., Engenhart-Cabillic, R., Dikomey, E., & Wittig, A. (2017). Roscovitine strongly enhances the effect of olaparib on radiosensitivity for HPV neg. but not for HPV pos. HNSCC cell lines. *Oncotarget*, *8*(62), 105170-105183. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22005

Zimmermann, M., Zouhair, A., Azria, D., & Ozsahin, M. (2006). The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol*, *1*, 11. https://doi.org/10.1186/1748-717x-1-11

8. Anhang

8.1 Curriculum Vitae

Dieser Teil der Arbeit enthält personenbezogene Daten und ist daher nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer/innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Baranovski, Bauer, Bette, Brehm, Bonaterra, Cetin, Decher, del Rey, Eickmann, Feuser, Hildebrandt, Kinscherf, Lill, Löffler, Mey, Milani, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Reese, Rost, Rust, Schütz, Schwarz, Seitz, Steiniger, Suske, Thieme, Weihe, Wertenbruch, Westermann, Wilhelm, Wrocklage

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Arenz, Bartsch, Bauer, Becker, Burchert, Czubayko, Denkert, Divchev, Donner-Banzhoff, Duda, Drefke, Eberle, Engenhart-Cabillic, Fritz, Franz, Froehlich, Fuchs-Winkelmann, Geraedts, Gress, Hofmann, Hoyer, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kill, Kirschbaum, Kornek, Köhler, König, Kühnert, Lohoff, Mahnken, Maier, Menzler, Metzelder, Merte, Moll, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oberkircher, Opitz, Pagenstecher, Parahuleva, Peterlein, Renke, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schymalla, Seifert, Seitz, Sekundo, Sommer, Stuck, Subtil, Tackenberg, Theiß, Thiemer, Timmermann, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Wulf, Wündisch, Ziller, Zwiorek

8.3 Danksagung

Zu allererst gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Rita Engenhart-Cabillic, welche mir während einer Famulatur in der Strahlentherapie die Möglichkeit gegeben hat, eine Doktorarbeit in ihrer Abteilung anzufertigen. Sie war eine gute Mentorin und hat mich durch ihre klinische Expertise immer bereichert.

Ein großer Dank geht an das gesamte Labor der Strahlentherapie. Ich danke Frau PD Dr. Ulrike Theiß, dass ich in dieser AG meine Experimente durchführen konnte. Ihre fundierten Ratschläge in den wöchentlichen Meetings waren immer ein guter Input für meine Experimente und Auswertungen.
Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey, welcher mir durch seine langjährige wissenschaftliche Erfahrung bei der Interpretation und Analyse meiner Daten eine große Hilfe war.
Für eine sehr gute und verlässliche Betreuung möchte ich Frau PD Dr. Florentine Subtil danken. Von der Planung der Experimente, über das Anfertigen der Publikation bis hin zur Korrektur der Dissertation hat sie mich immer durch ihren wissenschaftlichen Rat und ihre konstruktiven Vorschläge unterstützt. Sie hat mich stets aufgemuntert und hatte immer ein offenes Ohr für mich.

Weiter möchte ich mich bei Leoni Piepke und Stefanie Preising bedanken. Nicht nur, dass Ihr zwei mich hervorragend in den Laboralltag und in die verschiedenen Methoden eingearbeitet habt, sondern auch die privaten Unterhaltungen zwischendurch waren immer wieder schön mit Euch und sorgten für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Auch möchte ich mich bei meinen studentischen Kollegen und Kolleginnen bedanken, mit denen ich auch Gespräche abseits der Arbeit im Labor führen konnte.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meinen Eltern und meinem Bruder Tobias. Ohne Euch wären dieses Studium, die gute Bildung, die ich erfahren darf, und diese Doktorarbeit nicht möglich! Danke für ermutigende Worte, gute Ratschläge und hundertprozentige Verlässlichkeit.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Bedeutung der Homologen Rekombination für die Wirkung des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 auf eine kombinierte Behandlung von Kopf-Hals-Tumorzellen mit Cisplatin und Bestrahlung*“ in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter Leitung von Frau Prof. Dr. Rita Engenhart-Cabillic mit Unterstützung durch Frau PD Dr. Ulrike Theiß und Frau PD Dr. Florentine Subtil ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:
Subtil, F. S. B., Gröbner, C., **Recknagel, N.**, Parplys, A. C., Kohl, S., Arenz, A., Eberle, F., Dikomey, E., Engenhart-Cabillic, R., & Schötz, U. (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*, *14*(13), 3160. https://www.mdpi.com/2072-6694/14/13/3160

Ort, Datum, Unterschrift Doktorand

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum, Unterschrift Referentin