

Strahlenbiologische Charakterisierung humaner Oropharynx-Karzinom-Zelllinien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Mayer, Christina (geb. Genzler)
aus Frankfurt am Main
Gießen, 2014

Strahlenbiologische Charakterisierung humaner Oropharynx-Karzinom-Zelllinien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Mayer, Christina (geb. Genzler)
aus Frankfurt am Main
Gießen, 2014

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf-Halschirurgie und
plastische Operationen der
Universitätsklinikum Gießen & Marburg GmbH, Standort Gießen

Prof. Dr. med. Jens Peter Klußmann, Direktor der Klinik

Gutachter: Prof. Dr. med. Jens Peter Klußmann

Gutachter: Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic

Datum der Disputation: 27. April 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Humanes Papilloma-Virus (HPV) und seine Rolle bei der Karzinogenese	1
1.2	Das HPV-Genom, die Transkription viraler Gene und deren Integration in die zelluläre DNA.....	3
1.3	Tumore des Kopf-Hals-Bereiches: Inzidenz, Ätiologie, Risikofaktoren	7
1.3.1	Heterogenität der HNSCC und Behandlungsstrategien	8
1.4	Grundlagen und Wirkung ionisierender Strahlung.....	9
1.4.1	Zelluläre Strahlenantwort und Reparaturmechanismen	10
1.4.2	Einfluss von HPV auf die zelluläre Wirkung ionisierender Strahlung.....	12
1.5	Zielsetzung	13
2	Materialien und Methoden	15
2.1	Geräte und Materialien	15
2.1.1	Spezielle Geräte und Materialien am Standort Gießen	16
2.1.2	Spezielle Geräte und Materialien am Standort Marburg	17
2.2	Chemikalien und Reagenzien	17
2.3	Antikörper und Enzyme	19
2.4	Primer.....	20
2.5	Zellkulturen.....	21
2.5.2	Verwendete Zelllinien	21
2.5.3	Kultivierung der verwendeten Zelllinien	22
2.6	Methoden	23
2.6.1	HPV-PCR	24
2.6.2	Sequenzierung der HPV E6 und E7-Genregion.....	26
2.6.3	Wachstumskurven und Koloniebildungseffizienz	28
2.6.4	Bestrahlung	29
2.6.5	Klonogenes Überleben (Dosis-Effekt-Kurven)	29
2.6.6	Durchflusszytometrie zur Zellzyklus-Analyse	30
2.6.7	Proteinbiochemie.....	31
2.7	RNA-Isolation	37
2.8	cDNA-Synthese	37
2.9	Quantitative real time PCR	37
2.10	p53 Signaling Pathway RT-PCR Array.....	39
2.11	qPCR Auswertung	41
2.12	Statistik.....	42
3	Ergebnisse	43
3.1	HPV-Nachweis	43

3.2	Dosis-Effekt-Beziehung	43
3.2.1	Wachstumskurven	43
3.2.2	Klonogenes Überleben	44
3.3	Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung	45
3.4	Proteinexpressions-Änderung nach Bestrahlung	48
3.4.1	Proteinexpression von p16 ^{INK4A} nach Bestrahlung	48
3.4.2	Proteinexpression von Retinoblastom nach Bestrahlung	49
3.4.3	Proteinexpression von p53 und phospho p53 (Ser15) nach Bestrahlung....	52
3.5	qPCR: mRNA-Expression von viralen Onkogenen E6 und E7	54
3.6	Sequenzierung der E6 und E7-Gen-Region der HPV-positiven Zelllinien	56
3.7	p53 Signaling Pathway RT-PCR Array.....	61
4	Diskussion.....	65
4.1	Einfluss ionisierender Strahlung auf HNSCC-Tumorzelllinien	65
4.1.1	Strahlenempfindlichkeit	65
4.1.2	Zellzyklus	66
4.1.3	Markerproteine bei der primären Strahlenantwort.....	67
4.2	Einfluss ionisierender Strahlung auf virale Onkoproteine	70
4.3	Einfluss ionisierender Strahlung auf die p53-abhängige Genexpression.....	72
4.4	Ausblick	74
5	Zusammenfassung.....	77
6	Summary.....	78
7	Abkürzungsverzeichnis	79
8	Abbildungsverzeichnis	81
9	Tabellenverzeichnis	82
10	Literaturverzeichnis	83
11	Publikationsverzeichnis.....	93
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	94
13	Danksagung.....	95

1 Einleitung

1.1 Humanes Papilloma-Virus (HPV) und seine Rolle bei der Karzinogenese

Bereits 1974 wurden unter der Leitung von Harald zur Hausen (Zur Hausen et al. 1974) erste Experimente auf der Suche nach Krebs auslösenden Viren in Zervix-Karzinomen unternommen. 1984 wurden die ersten Virus-Typen aus Zervix-Biopsien isoliert und ihre DNA kloniert (Dürst et al. 1983). Bei diesen Viren handelt es sich um humane Papilloma-Viren (HPV). Es sind kleine, unbehüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von ca. 55 nm, deren Erbinformation aus ringförmig geschlossener, doppelsträngiger DNA von ungefähr 8000 Basenpaaren besteht. Heute sind mehr als 120 Subtypen der Gattung bekannt (Longworth und Laimins 2004), die entweder Basalzellen der Haut (β -Gruppe) oder anogenitale und orale Mukosa (α -Gruppe) infizieren. Innerhalb der α -Gruppe unterscheidet man zwischen nichtonkogenen oder „low-risk“-HPV Typen wie HPV-6 und -11, und onkogene oder „high-risk“-HPV Typen wie HPV16 und -18. Allerdings können nur die durch „high-risk“ HPV-Typen entstandenen Schädigungen Dysplasien und Karzinome entwickeln, die „low-risk“-Typen bilden meist Kondylome und Papillome (Zur Hausen 2002).

Eine Infektion mit HPV wird einerseits mit der Anzahl der Sexualpartner in Zusammenhang gebracht (Kreimer et al. 2004), andererseits scheinen Rauchen und Alkoholkonsum eine Infektion zu begünstigen (Franceschi et al. 1999).

Die Infektion mit HPV16 erfolgt in der Zervix, indem durch kleinste Läsionen der obersten Epithelschichten die Basalzellen frei zugänglich sind (Abbildung 1). Diese werden vom Virus infiziert, indem die virale DNA in die Wirtszelle eingeschleust wird und dort vorerst episomal in geringer Kopienzahl vorliegt. Auf diese Weise kann eine persistierende Infektion über mehrere Monate andauern, ohne dass Krebs entsteht.

Für die Vollendung des viralen Lebenszyklus ist eine Ausdifferenzierung der infizierten Basalzellen erforderlich. Da es sich bei diesen Zellen u. a. um Stammzellen handelt, können diese zu Zelltypen der darüber liegenden Zellschichten differenzieren. Betrifft die Infektion eine solche Stammzelle, so wird gewährleistet, dass das Virus nach der Zellteilung einerseits in der Tochter-Stammzelle persistiert, andererseits als Tochterzelle in die oberen Epithelschichten abgegeben wird. Diese Schichten umfassen meist ausdifferenzierte Zellen, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden und sich daher nicht mehr teilen. In seiner Eigenschaft zur Transformation ausdifferenzierter Zellen zu proliferierenden Krebs-Zellen kann das Virus in G₀-Phase arretrierte Zellen in die G₁- und S-Phase treiben (Münger et al. 1989a). Nach der

Infektion liegt die virale DNA episomal in der Wirts-Zelle vor. Die Integration in das Wirts-Genom erfolgt zufällig und ist entscheidend für die Entstehung eines Karzinoms. Bei der Entstehung eines Zervix-Karzinoms ist in über 95% der Fälle eine Assoziation mit HPV16 bzw. -18 ursächlich (van den Brule, A J et al. 1990) (Zur Hausen 1996). Seit den 80er Jahren wurden auch bei Kopf-Hals-Karzinomen onkogene oder „high-risk“-HPV-Typen entdeckt (Klussmann et al. 2001). Papillomaviren des Typs 16 und 18 sind hierbei im Mittel bei bis zu 15-25% der Patienten an der Entstehung von Plattenepithelkarzinome beteiligt (Kreimer et al. 2005). Besonders betroffen sind in absteigender Reihenfolge Oropharynx, Larynx/Hypopharynx und die Mundhöhle.

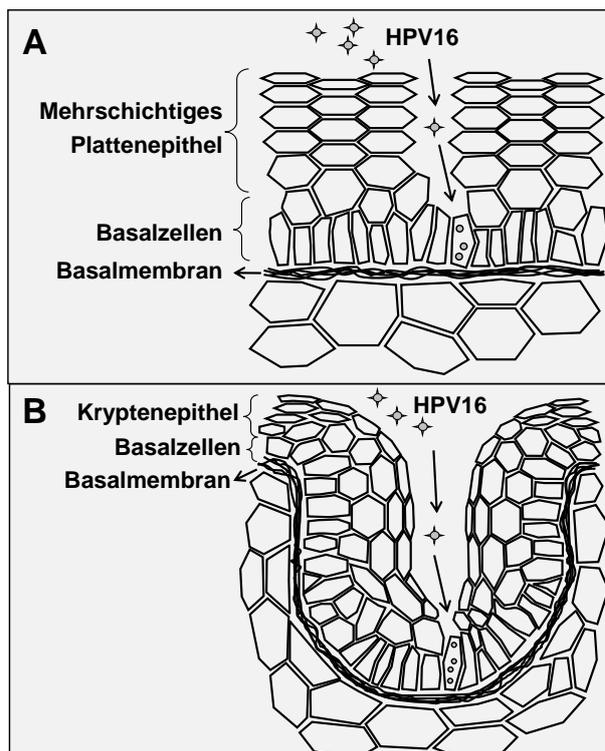


Abbildung 1: Infektion mit HPV16 in mehrschichtigem Plattenepithel der Zervix uteri und der Tonsillenkrypte

Die Basalzellen des mehrschichtigen Plattenepithels liegen durch Läsionen frei und können durch HPV16 infiziert werden (A). Das weitmaschige Kryptenepithel ermöglicht dem Virus einen direkten Zugang zu den Basalzellen (B).

Anders als bei der Zervix uteri bildet das oropharyngeale Gewebe der Seitenwand in der Tonsilla palatina so genannte Krypten zur Oberflächen-Vergrößerung aus

(Abbildung 1). Diese Ausstülpungen sind durch retikuläres Plattenepithel mit Basalzell-ähnlicher Differenzierung gekennzeichnet. Da die Basalmembran in den Krypten porös ist, um eine direkte Passage von Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen zu ermöglichen, besteht ein enger Kontakt zum lymphatischen Gewebe. Demnach können Viren direkt durch die Krypten zur Basalmembran gelangen, und die in der Zervix uteri notwendige Läsion der oberen Epithelschichten ist hier für einen Virus-Kontakt mit der Basalzellschicht und für deren Infektion wahrscheinlich nicht nötig.

Das E2-Protein bildet homodimere Komplexe, die sich an vier E2-spezifische DNA-Sequenzen innerhalb der Kontroll-Region des Virusgenoms binden (Massimi et al. 1999; Androphy et al. 1987). In seiner Funktion als Haupt-Regulator der viralen Genexpression und DNA-Replikation kann E2 die Transkription sowohl aktivieren als auch inhibieren, Mutationen im E2-Gen gehen mit der Immortalisierung humaner Zellen einher (Romanczuk und Howley 1992).

Das virale E4-Protein wird zwar zeitlich später als die anderen „early genes“ transkribiert, liegt dagegen mengenmäßig am meisten vor. Durch eine Überlappung mit dem E2-Gen wird es von einem anderen Leserahmen transkribiert, und bildet nach Transformation ein E1-E4-Fusionsprotein. Dieses interagiert mit Zytoskelett-Proteinen in ausdifferenzierten Epithelzellen, hat unterstützende Funktion bei Assemblierung und Freisetzung der Viruspartikel (Roberts et al. 1994; Roberts et al. 1997).

Das E5-Gen kodiert für ein Protein, das durch seine hydrophobe Eigenschaft in intrazellulären Membranen und in der Plasmamembran detektiert wird und dort mit wichtigen Wachstumsrezeptoren wie EGF- (*epidermal growth factor*) oder PDGF-Rezeptor (*platelet derived growth factor*) interagiert (DiMaio und Mattoon 2001). Über die Assoziation mit Membran-gebundenen ATPasen ist das E5-Protein an der zellulären Transformation beteiligt (Conrad et al. 1993).

Eine wichtige Funktion des E6-Proteins ist die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53 über Ubiquitin-vermittelte Degradation (Scheffner et al. 1992, 1992; Scheffner et al. 1990; Scheffner et al. 1992), indem es die zelluläre Protein-Ligase E6-AP (*E6 associated protein*) rekrutiert (Huibregtse et al. 1991; Talis et al. 1998). Allerdings genügt bereits die Bindung von E6 an p53, um dessen transkriptionelle Eigenschaft zu inhibieren (Lechner et al. 1992; Thomas et al. 1999). Außerdem hat das E6-Protein inhibitorische Wirkung auf die Apoptose, den Zellzyklus-Arrest nach DNA-Schaden, und es induziert die Expression und Aktivität der Telomerase (Oh et al. 2001; Yuan et al. 2012). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die Onkoproteine E6 und E7 genomische Instabilität bewirken (Zur Hausen 1996; White et al. 1994; Korzeniewski et al. 2011), und die effiziente Immortalisierung humaner Keratinozyten bewirkten (Münger et al. 1989b). Wenngleich beide Proteine weder enzymatische noch spezifische DNA-bindende Eigenschaften besitzen, beeinflussen sie dennoch Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose und Expression EMT-induzierender Gene (Hellner et al. 2009).

Das E7-Protein bindet an das Tumorsuppressorprotein Retinoblastom (Rb), welches im hyperphosphorylierten Zustand mit dem Transkriptionsfaktor E2F verbunden ist (Münger et al. 1989b). Durch die Bindung von E7 an Rb wird E2F freigesetzt und treibt seinerseits die DNA-Synthese von Proliferations-fördernden Genen an, wie z. B. die Cycline A und E (Dyson 1998; Zerfass et al. 1995). Das E7-Onkoprotein inaktiviert außerdem den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21 (CDKN1A) (Funk et al. 1997) und führt durch die Inhibierung von Rb zur Akkumulation des Tumorsuppressors p16^{INK4A} (Sano et al. 1998). Dieses Protein wird als klinischer Marker in Kombination mit dem Nachweis von HPV-DNA für eine aktive HPV-Infektion herangezogen (Klussmann et al. 2003).

Die Gene L1 und L2 werden später als die „early genes“ transkribiert, da sie hauptsächlich in den äußeren Epithelschichten exprimiert werden. Sie kodieren für Kapsidproteine, die zusammengesetzt das ikosaedrische Kapsid bilden, in das das virale Genom durch Interaktion mit L2 eingeschlossen wird (Zhou et al. 1994).

Ein wesentlicher Schritt zur Karzinogenese HPV-assoziiierter Basalzellen der Zervix ist die Integration des viralen Erbguts in das Wirts-Genom. Dieser Prozess führt zur Öffnung der ringförmigen Virus-DNA in der E2-ORF Region und hat zur Folge, dass benachbarte Regionen deletiert werden (Olthof et al. 2012): Die Gene E4, E5 und teilweise E2 und L2 (Abbildung 3).

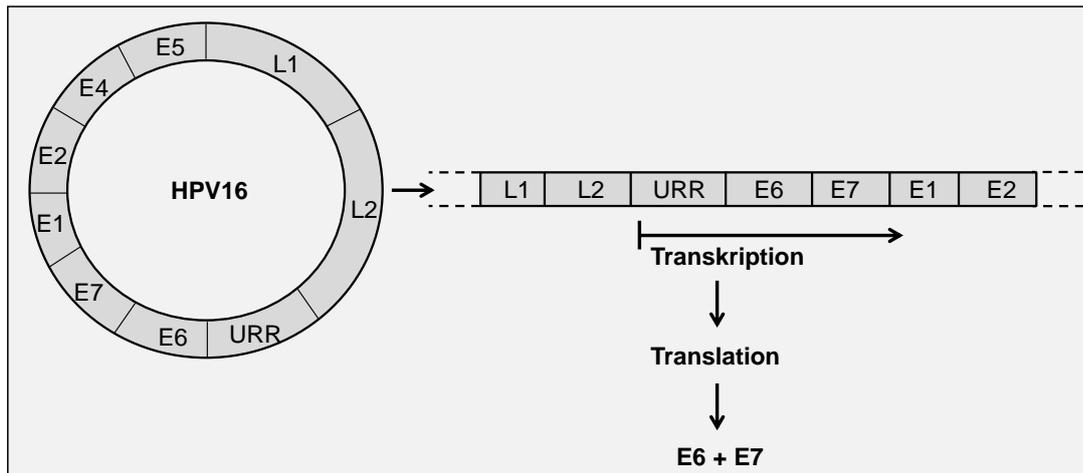


Abbildung 3: Integration des HPV16-Genoms

Bei der Integration des HPV16-Genoms wird die Ringstruktur geöffnet und in die zelluläre DNA eingebaut. Dieser Prozess führt in der Regel zur Transkription beginnend von der Kontrollregion (URR) und mündet in der Expression der E6 und E7 Onkoproteine.

Für das Zervix-Karzinom ist bekannt, dass das HPV16-Genom präferierte Integrationsstellen besitzt, sog. „fragile sites“, an denen eine Integration leichter möglich ist (Wentzensen et al. 2004). Diese Bereiche befinden sich in repetitiven Regionen des humanen Genoms und teilweise auch an Orten mit Krebs-assoziierten Genen (Li et al. 2013). Das Ereignis der Integration hat den Effekt, dass die Gene E6 und E7 verstärkt gebildet werden (Romanczuk und Howley 1992), was dazu führt, dass Chromosomen und Zentrosomen-Alterationen angehäuft werden (White et al. 1994). In Tonsillen-Plattenepithel-Karzinomen wurde die E6- und E7-Überexpression ebenfalls mit der Integration von HPV-DNA in das Wirtsgenom in Verbindung gebracht (Kluschmann et al. 2001; Andl et al. 1998; Hafkamp et al. 2008; Wiest et al. 2002). Laut einer aktuellen Studie wurde bei den HPV-positiv getesteten Tonsillen-Karzinomen jedoch keine genomische Instabilität gefunden (Mooren et al. 2013).

Für das HPV16-Genom wurden zahlreiche natürlich vorkommende Sequenz-Varianten beschrieben, die je nach Bevölkerungs-Region genetische Variationen enthalten (Chan et al. 1992). Im Zervix-Karzinom zeichnete sich beim Vergleich von HPV16 Genom-Sequenzen eine evolutionsbedingte Entwicklung von Virus-Subtyp-Linien ab (Smith et al. 2011). Weiterhin wurde gefunden, dass verschiedene HPV16-Varianten divergente biologische Aktivitäten z. B. bei der Regulation des Tumorsuppressors p53 besitzen (Stöppler et al. 1996).

1.3 Tumore des Kopf-Hals-Bereiches: Inzidenz, Ätiologie, Risikofaktoren

Tumore im Kopf-Hals-Bereich bezeichnen Malignome, die aus unterschiedlichen Regionen des Kopf-Hals-Bereiches hervorgehen. Dieser Bereich ist in fünf Regionen eingeteilt: Mundhöhle, Nasopharynx (Nasenrachenraum), Oropharynx (Mundrachenraum), Hypopharynx (Schlundrachenraum) und Larynx (Kehlkopf). Der Oropharynx wird in Seitenwand (Tonsillen) Vorderwand (Zungengrund, Vallecula, linguale Epiglottis) und Dach (Weichgaumen und Uvula) unterteilt.

In über 95% der Fälle handelt es sich bei den Kopf-Hals-Tumoren um Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), die weltweit an sechster Stelle der Häufigkeit der Tumorerkrankungen stehen (Ferlay et al. 2010; Kamangar et al. 2006). Jährlich erkranken ca. 650.000 Menschen neu an HNSCC, und etwa die Hälfte der Patienten stirbt auch daran (Parkin et al. 2005). Über eine längere Zeitspanne betrachtet wird jedoch ein Wandel von Inzidenz- und Mortalitätsraten deutlich (Wittekindt et al. 2012), sodass Trends zur Prognose von Häufigkeiten sowohl von der Ab- bzw. Zunahme von Risikofaktoren, als auch den Inzidenzen einzelner Sublokalisationen abhängig sind (Husmann 2010). Krebsneuerkrankungen von Rachen und Mundhöhle lagen im internationalen Vergleich im Jahr 2006 laut einer Studie des Robert-Koch-Institutes bei den Männern bei 16,4/100.000 und bei den Frauen bei 5,2/100.000. Frauen sind insgesamt deutlich seltener betroffen. Dementsprechend waren auch die ermittelten Mortalitätsraten dieser Gruppe geringer. Das Alter der Patienten scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen: Zwischen 40 und 60 Jahren erkranken vermehrt Männer an Mund- und Rachentumoren (Chaturvedi et al. 2008).

Zwar wird allgemein ein Rückgang der Inzidenzen im Kopf-Hals-Bereich registriert, allerdings nicht bei allen Sublokalisationen. So wurde beispielsweise 2007 eine erhöhte Inzidenz bei Mundhöhlen- und Oropharynx-Karzinomen bei jungen Erwachsenen festgestellt (Shiboski et al. 2005), und in Australien (Hocking et al. 2011), Dänemark (Blomberg et al. 2011), Kanada (Auluck et al. 2010), USA (Chaturvedi et al. 2008), Großbritannien (Conway et al. 2006), Schweden (Hammarstedt et al. 2006), Niederlande (Braakhuis, Boudewijn J M et al. 2009) wurden vermehrt Oropharynx-Karzinome diagnostiziert.

Insgesamt sind hohe Inzidenz-Raten in Regionen mit hohem Tabak- und Alkohol-Konsum berichtet (Parkin und Bray 2006); Chaturvedi et al. 2008), und die Kombination beider Substanzen scheint sich additiv auszuwirken (Pai und Westra

2009, 2009; Franceschi et al. 1999). Dagegen publizierten Llewellyn et al. (2003) eine Studie, in der 25% der Patienten mit HNSCC-Tumoren angegeben, nie geraucht oder getrunken zu haben. Da diese Patienten zudem jünger als 45 Jahre waren, scheinen weitere exogene Risikofaktoren für die Entwicklung von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs zu existieren. Als mehr oder weniger gut anerkannt gelten übermäßige UV-Exposition, Ernährung, Mundhygiene, Exposition mit karzinogenen Substanzen (z. B. Asbest) und Infektionen. Eine Infektion mit HPV gilt als ursächlich für das Auftreten vermehrter Krebserkrankungen im Oropharynx (Andl et al. 1998; Gillison et al. 2000; Hammarstedt et al. 2006; Wiest et al. 2002; Zur Hausen 1996). In einer gepoolten Analyse von Fall-Kontroll-Studien wurde verändertes Sexualverhalten als Risikofaktor oraler HPV-Infektionen identifiziert (Heck et al. 2010).

1.3.1 Heterogenität der HNSCC und Behandlungsstrategien

Die überwiegende Mehrheit der Kopf-Hals-Tumore stellt HNSCC dar, weshalb erwartungsgemäß ein homogenes Krankheitsbild vorliegen müsste. Tatsächlich bewirkt der Einfluss und das Zusammenspiel unterschiedlicher exogener (z. B. Alkohol und Nikotin) und endogener Faktoren (z. B. genomische Instabilität, onkogene Virusinfektion) eine Heterogenität unter den Plattenepithelkarzinomen. So haben Patienten mit HPV-positiven Tumoren zwar eine bessere Prognose und ein besseres Gesamt-Überleben (Ang et al. 2010; Hafkamp et al. 2008; Gillison et al. 2000; Ritchie et al. 2003), allerdings weisen sie fortgeschrittenere Tumorstadien (Andl et al. 1998) und mehr Metastasen auf (Hafkamp et al. 2008) im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen Tumoren. Diese Heterogenität wurde seit den 90er Jahren immer wieder bestätigt, und insbesondere bei Oropharynx-Karzinomen ein kausaler Zusammenhang mit einer HPV16-Infektion festgestellt (Ang et al. 2010; Chung und Gillison 2009; Klussmann et al. 2003; Ritchie et al. 2003; Klussmann et al. 2001; Hafkamp et al. 2008; Gillison et al. 2000). Generell werden HPV-positive Tumoren bei Patienten mit geringerem Nikotin- und Alkohol-Konsum detektiert (Andl et al. 1998; Hafkamp et al. 2008; Sinha et al. 2012), wobei diese Tumoren signifikant seltener genetische Alterationen und Amplifikationen beinhalten (Klussmann et al. 2009). Noxen-assoziierte Oropharynx-Karzinome dagegen enthalten signifikant häufiger genetische Deletionen und Amplifikationen, vor allem im Gen des Tumorsuppressors p53 (Gillison et al. 2000, 2000; Andl et al. 1998). Zusammengefasst bilden HPV- und Noxen-assoziierte Tumoren zwei verschiedene Tumorentitäten, die durch ihre große Divergenz die Therapie erschweren.

Eine gezielte Tumorthherapie sollte demnach nur individuell und Personenbezogen erfolgen. Stattdessen basiert die gängige Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren meist auf operativer Resektion des Tumors und ggf. Entfernung der Halslymphknoten (*Neck-Dissection*) sowie anschließender Radio- und/oder Chemotherapie. Ein Überlebensvorteil bei kompletter Resektion mit Lokalrezidivrate von nur 12-18% im Vergleich zu 80% bei nicht vollständiger Resektion ist lange bekannt (Byers et al. 1978). In zahlreichen Publikationen wurde ein besseres Überleben für Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren beschrieben, auch unabhängig von der durchgeführten Therapie (Ang et al. 2010). Der Stellenwert der Tumorresektion ist für Patienten mit HPV-assoziiertem Oropharynx-Karzinom somit unklar, wenngleich Fischer et al. (2010) bei einer Therapie ohne Operation im Gegensatz zu Resektion plus Radiatio/Radiochemotherapie eine vergleichbare Prognose beobachteten.

1.4 Grundlagen und Wirkung ionisierender Strahlung

Ionisierende Strahlung bezeichnet Teilchen- oder elektromagnetische Strahlung, deren Energie ausreicht, um beim Durchdringen von Materie Elektronen aus Atomhüllen von Molekülen herauszulösen. Die Atome werden somit sehr reaktiv und als ionisiert bezeichnet. Zu Teilchenstrahlung zählen α -Strahlung (Heliumionen) und β -Strahlung (Elektronen, Positronen), zu elektromagnetischer Strahlung Röntgen- und γ -Strahlung. Letztere entsteht auf natürliche Weise als Nebenprodukt des Kernzerfalls einer radioaktiven Substanz. In Linearbeschleunigern wird γ -Strahlung künstlich erzeugt, indem elektrisch geladene Teilchen auf gerader Strecke mit Hilfe einer angelegten Wechselspannung stark beschleunigt werden und auf eine Anode aufprallen. γ -Strahlung entsteht hierbei als Abbremsstrahlung von Elektronen. Als ionisierend werden generell Strahlen ab einer Energie von 124eV bezeichnet. γ -Strahlung wird dabei mit einer Wellenlänge von unter 5pm definiert, was einer Energie von über 200keV entspricht.

Diejenige Energiedosis (D), die beim Durchtritt von Strahlung durch Materie von der Materie aufgenommen wird, wird als absorbierte Energie (E) pro Masseinheit (m) mit der Einheit Gray (Gy) angegeben (Volkmer 1994):

$$D \text{ [Gy]} = \frac{E \text{ [J]}}{m \text{ [kg]}}$$

Die biologische Wirksamkeit von Strahlung ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Strahlungsart und Strahlungs-Dosis. Sie beeinflussen, ob und in welchem Ausmaß

ein Organismus einen strahleninduzierten Schaden reparieren kann. Da die Strahlenempfindlichkeit von Organen und Geweben gegenüber ionisierender Strahlung verschieden ist, reagieren diejenigen Organe und Gewebe mit verstärkter Proliferation sensibler, denn durch Bestrahlung wird der Prozess der Zellteilung negativ beeinflusst.

Insgesamt kann ionisierende Strahlung im lebenden Organismus direkt beim Auftreffen auf Materie, aber auch indirekt durch Radikal-Bildung nach dem Auftreffen entstehen. So können sowohl die DNA als auch Proteine geschädigt werden, wobei veränderte DNA-Sequenzen möglicherweise schwerere Folgen nach sich ziehen, vor allem wenn beide DNA-Stränge betroffen sind. Die häufigsten Veränderungen der DNA sind Basenmodifikationen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) sowie Basenverlust, Einzel- und Doppelstrangbrüche. Bei Bestrahlung von 1Gy Röntgenstrahlung entstehen ca. 40 Doppelstrangbrüche, was epigenetische Modifikationen wie die Methylierung von DNA und die Phosphorylierung von Histonen hervorruft (Rogakou et al. 1998). Weiterhin können zytogenetische Effekte wie Translokation von Chromosomen-Bereichen, Telomer-Kürzung und frühzeitige Chromosomen-Kondensation erfolgen (Pernot et al. 2012).

1.4.1 Zelluläre Strahlenantwort und Reparaturmechanismen

Säugetierzellen reagieren auf endogenen (z. B. Radikale) und exogenen Stress (z. B. Bestrahlung, Alkohol, Nikotin) mit der Aktivierung von Schutzmechanismen, die in erster Linie die Integrität der DNA sicherstellen. Beschädigte DNA kann von bestimmten Enzymen in den Zellen erkannt und anschließend repariert werden, wobei die Reparatur-Effizienz vom Schadensmaß abhängt. Häufen sich DNA-Schäden – vor allem Doppelstrangbrüche – an, so ist die Wahrscheinlichkeit einer korrekten DNA-Reparatur vermindert und es entstehen DNA-Modifikationen und -Fragmente. Zellen, die in hohem Maße beschädigte DNA enthalten, dürfen diese nicht an Tochterzellen weitergeben. Damit die Tochterzelle allerdings eine vollständige und fehlerfreie DNA-Kopie erhält, müssen strenge Kontrollen, sog. Checkpoints, während der Zellzyklusprogression passiert werden (Abbildung 4).

und die verschiedenen Schutzfunktionen, so können Mutationen und geschädigte Zellen akkumulieren.

1.4.2 Einfluss von HPV auf die zelluläre Wirkung ionisierender Strahlung

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist einer der wichtigsten Regulatoren der zellulären Strahlenantwort. Es koordiniert in der Zelle u. a. die Funktionen für Apoptose-Induktion, Zellzyklus-Arrest und Wachstumskontrolle, sowie Reparatur und Replikation der zellulären DNA. Die Zelle reagiert auf genotoxischen Stress mit der Aktivierung von p53. Dies wird hauptsächlich durch posttranslationale Modifikationen des p53-Proteins gewährleistet (Maltzman und Czyzyk 1984), wodurch deren Halbwertszeit stabilisiert wird und die Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern erfolgen kann. Dort bindet p53 an definierten Regionen an die DNA und gewährleistet durch seine Eigenschaft als Transkriptionsfaktor die Transkription von Apoptose-Genen bzw. Proliferations-Inhibitoren nach Strahleninduziertem DNA-Schaden.

In Tumoren mit HPV-Assoziation wird p53 allerdings durch das virale Onkoprotein E6 inhibiert (Huibregtse et al. 1991; Lechner et al. 1992; Talis et al. 1998; Thomas et al. 1999; Werness et al. 1990; Scheffner et al. 1990). Das p53-kodierende Gen liegt in HPV-positiven Tumoren meist in der Wildtyp-Form vor (Andl et al. 1998; Gillison et al. 2000; Hafkamp et al. 2003); Wiest et al. 2002), HPV-negative humane Tumore enthalten dagegen meist ein mutiertes p53-Gen (Dahm-Daphi 2000).

In der Literatur wird die Beteiligung von HPV und p53 an der Strahlensensitivität HPV-positiver Zellen kontrovers diskutiert. Man vermutet einerseits einen Zusammenhang zwischen der p53-Aktivierung und der Strahlensensitivität HPV-assoziiierter Zellen (Gupta et al. 2009; Kimple et al. 2013). Andererseits zeigten *in vitro* Experimente, dass HPV-assoziierte Zellen eine p53-unabhängige Strahlensensitivität besitzen (Patel et al. 2000), wobei Nagel et al. (2013) und Spanos et al. (2009) beim Vergleich HPV-positiver Zelllinien mit HPV-negativen keine erhöhte Strahlensensitivität bei HPV-positiven Zelllinien detektierten.

Ein weiterer wichtiger Tumorsuppressor ist das Retinoblastomprotein (Rb). Die Hauptfunktion dieses Proteins liegt in der Freisetzung bzw. Bindung des Transkriptionsfaktors E2F. Im Laufe des Zellzyklus wird Rb in mehreren Schritten durch Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert (Buchkovich et al. 1989). Im hypophosphorylierten Zustand ist es mit E2F verbunden, in hyperphosphorylierter Form wird E2F freigesetzt und gelangt seinerseits in den Kern, wo es die Transkription

der S-Phase-Gene einleitet. Nach UV-induziertem DNA-Schaden wurde in humanen Melanozyten ein verlängerter G1-Phase-Arrest festgestellt, offenbar bedingt durch eine inhibierte Rb-Phosphorylierung (Loignon und Drobetsky 2002; Medrano et al. 1995). Andererseits fanden Loignon und Drobetsky (2002), dass abhängig von der Strahlungsart der Rb-abhängige G1-Arrest unterschiedlich beeinflusst wird.

Es ist bekannt, dass das virale Onkoprotein E7 das Rb-Protein bindet und es für den Abbau markiert (Dyson 1998; Münger et al. 2001; Boyer et al. 1996). Slebos et al. (1994) fanden, dass E7-exprimierende Zellen nach Exposition mit Gamma-Strahlung keinen G1-Arrest vollzogen, und Lindel et al. (2012) konnten verminderte Rb-Mengen nach Exposition mit 2 und 7Gy Gamma-Strahlung feststellen, die gleichzeitig mit einer erhöhten Strahlensensitivität der Zellen korrelierte.

Ein weiterer wichtiger Tumorsuppressor ist der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p16^{INK4A}. Er verhindert die Phosphorylierung von Rb und hält so den Zellzyklus an. Das p16-Protein bedarf allerdings der Regulation durch ein intaktes Rb-Protein, weshalb in HPV-assoziierten Zellen mit E7-abhängiger Rb-Degradation p16 überexprimiert wird (Sano et al. 1998). Das p16 Protein gilt so zusammen mit dem Nachweis der HPV-DNA als klinischer Marker einer aktiven HPV-Infektion im Kopf-Hals-Bereich (Klussmann et al. 2003).

1.5 Zielsetzung

Trotz der distinkten Entitäten HPV- und Noxen-assoziiierter HNSCC erfolgt die Therapie bei den meisten HNSCC-Tumoren mittels radikaler Resektion und anschließender Radio- und/oder Chemotherapie. Klinische Hinweise darauf, ob eine alleinige Radiotherapie oder Radiochemotherapie den gleichen Erfolg wie eine Resektion gefolgt von adjuvanter Radio-/ Radio-Chemotherapie bei HPV-assoziierten Tumoren bringen würde, existieren nicht und es gibt nur wenige experimentelle Studien hierzu. Daher sollte anhand von *in vitro* Experimenten an Zellkulturen untersucht werden, ob HPV-positive Tumorzelllinien im Vergleich zu HPV-negativen durch alleinige Bestrahlung effektiv behandelt werden können und welche molekularen Veränderungen durch eine Bestrahlung hervorgerufen werden.

Zunächst sollte eine strahlenbiologische Charakterisierung der verwendeten Zelllinien erfolgen. Dafür sollte die Strahlensensitivität gegenüber ionisierender Strahlung determiniert werden, sowie ihre Auswirkung auf die Zellproliferation und das Reparatur-

Verhalten der Zellen. Die bessere Prognose der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren wird durch eine verstärkte Strahlensensitivität erklärt, die molekularen Ursachen sind allerdings unbekannt. Daher sollten molekulare Marker identifiziert werden, die in HPV-negativen Tumoren dysreguliert sind, eine erhöhte Strahlenresistenz gegenüber HPV-positiven Tumoren verursachen und einen potentiellen Angriffspunkt für eine bessere Therapie darstellen. Hierzu sollte die Expression der Gene untersucht werden, die an der zellulären Strahlenantwort beteiligt sind. Die Gen-Produkte sollten ebenfalls analysiert werden, um Unterschiede zwischen HPV-positiven und -negativen Zelllinien zu definieren. Die unterschiedliche Protein-Expression könnte Aufschluss über eine Resistenzbildung nach Bestrahlung in HPV-negativen Zelllinien geben und so molekulare „*targets*“ für optimierte Therapieansätze Noxen-assoziiierter Tumore bringen.

Die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 ist essentiell für die Transformation epithelialer Zellen. In wie weit die Bestrahlung einen Einfluss auf die Expression der viralen Onkogene in HPV-positiven Zellen hat, ist nicht bekannt. Daher sollte die E6- und E7-Expression untersucht werden, um Aufschluss über die transkriptionelle Regulation nach Bestrahlung zu erlangen. Eine veränderte, strahleninduzierte Genexpression könnte Hinweise zur Erklärung des besseren Gesamtüberlebens HPV-positiver Tumorpatienten liefern. Dies könnte ausschlaggebend für eine zu verändernde Therapiemodalität bei HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx sein.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

In der Arbeit wurden die folgenden Laborgeräte und Materialien verwendet:

Geräte	Hersteller
Neubauer improved Zählkammer	Hartenstein
Waagen: PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
ABJ	
Magnetrührer RCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen
pH Meter HI 2211 pH/ORP Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Wärmeschrank Heratherm	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt; NeoLab, Heidelberg
Mixing Block MB-102	Bioer Technology, China
Vortex Mixer	NeoLab, Heidelberg
Vortex LabDancer	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad Aqualine AL2	Lauda GmbH & Co KG, Königshofen

Materialien	Hersteller	
Biosphere® Filterspitze farblos	Sarstedt, Nümbrecht	
Filterpapier	Rotilabo-Blotting Papier, Roth, Karlsruhe	
Imaging Chamber 8 microscope slide bottom (8 Kammern à 0,88cm ²)	PAA, Pasching, Österreich	
Nitrocellulosemembran: Protran	Whatman GmbH, Dassel	
Nitrocellulose Transfer Membran		
Pasteur-Pipetten 150mm, 230mm	VWR International GmbH, Darmstadt	
Reaktionsgefäße	1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
	15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten: 1ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; Sarstedt, Nümbrecht	
Zellkulturgefäße	3,5cm, 6cm, 10cm Durchmesser	Sarstedt, Nümbrecht
	6-, 12-, 24-, 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber 16cm, 23cm	Sarstedt, Nümbrecht	

2.1.1 Spezielle Geräte und Materialien am Standort Gießen

Am Standort Gießen wurden folgende spezielle Geräte und Materialien verwendet:

Geräte und Materialien	Hersteller	
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Waldbronn	
ChemiDoc XRS System incl. Software ImageLab Version 3.0	BioRad, Dreieich	
Glaspipette: Hamilton	Hamilton Company, Nevada, USA	
Inkubator Heracell 240i	Thermo Scientific, Waltham, USA	
Lichtmikroskop DMI 3000B	Leica, Solms	
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	
Nitrocellulosemembran: Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel	
PCR System Thermal Cycler C1000	BioRad, Dreieich	
Plattenreader Nanoquant infinite M200 pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz	
Real time PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	
RNA 6000 Nano Chip (On- Chip- Electrophoresis), Recorder Nr. 5067-1511	Agilent Technologies, Waldbronn	
RNA 6000 Nano Reagents Part 1	Agilent Technologies, Waldbronn	
Spannungsquelle für Kammer Power Pac Basic, Power Pac HC	BioRad, Dreieich	
Trans-Blot Semi-Dry	BioRad, Dreieich	
Ultraschallgerät Vial Tweeter mit UIS250L Prozessor	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow	
Western Blot System Mini Protean Tetra System (Glasplatten klein: 10,1 x 7,3 cm)	BioRad, Dreieich	
Western Blot Protean 2 Cell (Glasplatten groß: 16x16cm)	BioRad, Dreieich	
Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Mini plate spinner MPS1000	Labnet, New Jersey, USA
	Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Spezielle Geräte und Materialien am Standort Marburg

Am Standort Marburg wurden folgende spezielle Geräte und Materialien verwendet:

Geräte und Materialien		Hersteller
Durchflusszytometer	LSR 2 Flow Cytometer	BD Bioscience
Gelkammer	PerfectBlue™	peqlab Technologies
	Doppelgelsystem Twin ExW S	GmbH, Erlangen
Inkubatoren	HERACell	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	INCO2 153	Memmert, Schwabach
Kamera	Hamamatsu Orca-03G	Nikon, Japan
Linearbeschleuniger in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie	Elekta Supernova, Fokus-Objekt-Abstand (FSD): 100cm. Bestrahlt wurde bei 6 MeV mit einer Dosisleistung von 4Gy/min.	Elekta, Stockholm, Schweden
Mikroskop	Motorised research microscope IX81	Olympus, Hamburg
Photometer	Smart Spec Plus	BioRad, Dreieich
Plattenreader	Mithras LB 940 Microplate Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Röntgenröhre XRad320iX	Filter 8: 0,5mm Kupfer + 0,5mm Aluminium, Fokus-Objekt-Abstand (FSD): 60cm. Bestrahlt wurde bei 320kV und 10mA mit einer Dosisleistung von 1,04Gy/min.	Precision X-ray Inc., North Bradford, UK
Zentrifugen	Heraeus Fresco 21 Centrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.2 Chemikalien und Reagenzien

In der Arbeit wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet:

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsquelle
Acrylamid-Lösung (40 %) - Mix 37,5 : 1 für die Molekularbiologie	Appllichem, Darmstadt
Agarose, low melt	Appllichem, Darmstadt
AllPrep Kit	QIAgen, Hilden

Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem, Darmstadt
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt
BSA, bovine serum albumin powder, ≥98%, Essentially fatty acid free, essentially globulin free	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chlorophorm:Isoamylalkohol (24:1)	Applichem, Darmstadt
ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB, Frankfurt am Main
DNA-Ladder, 2 log (0,1-10 kbp)	NEB, Frankfurt am Main
DNeasy Blood&Tissue Kit	QIAgen, Hilden
DyeEx 2.0 Spin Kit	QIAgen, Hilden
Gel Loading Dye, Blue (6x)	NEB, Frankfurt am Main
Glycin	Applichem, Darmstadt
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Life Technologies, Darmstadt
Human p53 Signaling, RT ² Profiler PCR Array, Format C (PAHS-027Z)	QIAgen, Hilden
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore, Darmstadt
Immun-Star Western Chemiluminescence Kit (luminol/enhancer, peroxide solution)	BioRad, Dreieich
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Midori Green Advence	Biozym, Hessisch Oldendorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Paraformaldehyd	Applichem, Darmstadt
Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol (25:24:1)	Applichem, Darmstadt
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid	PromoCell GmbH, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNeasy Mini Kit	QIAgen, Hilden
RT ² First Strand Kit	QIAgen, Hilden
SYBR Select Master Mix	Applied Biosystems, Life Technologies,

	Darmstadt
SYBR Green ROX qPCR Mastermix	QIAGEN, Hilden
50x TAE	Applichem, Darmstadt
Tris Base	Applichem, Darmstadt
Tris HCl	Applichem, Darmstadt
TritonX-100	Applichem, Darmstadt
Tween20	Applichem, Darmstadt
Wasser, Chromasolv Plus (für HPLC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.3 Antikörper und Enzyme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Primär-Antikörper angewandt:

Antikörper	Klon	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
β -Tubulin	TUB 2.1	Maus, monoklonal	1: 10 000	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Cyclin D1	SP4	Kaninchen, monoklonal	1:500 2%BSA/TBST	in DAKO, Dänemark
E2F-1	KH95	Maus, monoklonal	1:1000 BSA/TBST	in 2% BD Pharmingen
p16 ^{INK4}	G175- 405	Maus, monoklonal	1:1500 MTBST	in 5% BD Biosciences
p53	7F5	Kaninchen, monoklonal	1:800 BSA/TBST	in 2% Cell Signalling Techn., NEB, Frankfurt/Main
p53	DO-7	Maus, monoklonal	1:1000 BSA/TBST	in 2% BD Biosciences
Phospho p53 (Ser15)		Kaninchen, monoklonal	1:3000 BSA/TBST	in 2% Cell Signalling Techn., NEB, Frankfurt/M.
Retinoblastom	4H1	Maus, monoklonal	1:2000 MTBST	in 5% Cell Signalling Techn., NEB, Frankfurt/Main

Retinoblastom	G3-245 (aa 332-344)	Maus, monoklonal	1:800 in BSA/TBST	2%	BD Biosciences
---------------	------------------------	---------------------	----------------------	----	----------------

Des Weiteren wurden folgende Sekundär-Antikörper benutzt:

Antikörper		Eingesetzte Verdünnung		Hersteller
Anti-Hase-IgG	HRP- konjugiert	1:1000 in BSA/TBST	0,5%	Cell Signalling Techn., NEB, Frankfurt/Main
Anti-Maus-IgG	HRP- konjugiert	1:1000 in BSA/TBST	0,5%	Cell Signalling Techn., NEB, Frankfurt/Main

Außerdem wurden folgende Enzyme verwendet:

Enzym	Hersteller
DNase I, RNase-frei	QIAGEN, Hilden
RNase A	
Phusion Hot Start Flex DNA Polymerase	Cell Signalling Techn., NEB, Frankfurt/Main

2.4 Primer

Die verwendeten Primersequenzen der HPV-PCR, der HPV16 E6-E7-Sequenzierung, sowie der qPCR mit P0, E6 und E7 wurden von Dr. Steffen Wagner (Gießen) erstellt bzw. aus Literaturquellen übernommen. Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, (Ebersberg) bezogen. Die Primersequenzen sind in 5'→3' Richtung und mit zugehöriger Schmelztemperatur in nachfolgender Tabelle angegeben:

Primer	Sequenz		Schmelztemperatur [°C]	Quelle
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	fwd	45	de Roda Husman, A M et al. 1995
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	rev		
HPV16 E6	AGCGACCCAGAAAGTTACCA	fwd	57	Wald et al. 2011
	GCATAAATCCCGAAAAGCAA	rev		
HPV16 E7	CAGCTCAGAGGAGGAGGATG	fwd	57	
	GCACAACCGAAGCGTAGAGT	rev		
HPV16_E 6-E7-Seq	GCCAACGCCTTACATACCG	fwd	58	Steffen Wagner
	CGTACCCTCTTCCCCATTG	rev		
P0	TCGACAATGGCAGCATCTAC	fwd	57	Korrespondenz mit Dr. J. Wagner, Institut für Kardiovaskuläre Regeneration, Goethe-Universität Frankfurt/M.
	ATCCGTCTCCACAGACAAGG	rev		

2.5 Zellkulturen

2.5.2 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden acht Plattenepithel-Karzinom-Zelllinien verwendet (Tabelle 1). Alle wachsen adhärent als Monolayer. Die HPV-negativen Zelllinien UM-SCC6 und UM-SCC11b, sowie die HPV-positiven Zelllinien UM-SCC-104 und UM-SCC-47 wurden von Dr. Thomas E. Carey, Universität Michigan, USA, primär kultiviert (Lin et al. 2007; Zhao et al. 2011); (Lansford et al. 1999). Die Zelllinie UT-SCC-33 (HPV-negativ) wurde von Dr. Reidar A. Grenman, Universität Turku, Finnland, etabliert (Lansford et al. 1999), und die HPV-negative Zelllinie UD-SCC-1 wurde durch Dr. Thomas Hoffmann, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt (Balló et al. 1999). Die HPV-positive Zelllinie UPCI:SCC152 wurde von Dr. Susanne M. Gollin, Universität Pittsburgh, USA, etabliert (White et al. 2007). Die HPV16-positive 93-VU-147T wurde durch Dr. Hans Joenje, VU Medical Center Amsterdam, Niederlande, zur Verfügung gestellt (Friedman et al. 2007).

Tabelle 1: Zelllinien-Informationen

Alter und Geschlecht der Patienten, sowie detaillierte Angaben zu HPV-, p53-Status und Tumorgeweben, aus denen die verwendeten Zelllinien etabliert wurden.

Zelllinie	Alter / Geschlecht	Vorbe- handlung	Ursprungs- gewebe	HPV	p53	Ref.
UD-SCC-1	64/m	keine	Oropharynx	Neg	FS/Wt	Balló et al. (1999)
UM-SCC-6	37/m	keine	Zunge	neg	Wt	Grénman et al. (1991)
UM-SCC-11b	65/m	Chemoth.	Larynx	neg	C242S	Lin et al. (2007)
UT-SCC-33	86/w	keine	Mundhöhle	neg	R282W	Lansford et al. (1999)
UM-SCC-47	53/m	unbekannt	Mundhöhle/ Zunge	HPV16	Wt	Lansford et al. (1999)
UM-SCC-104	56/m	Radio+ Chemoth.	Mundhöhle	HPV16	Wt	Tang et al. (2012)
UPCI:SCC152	47/m	Radioth.	Hypopharynx	HPV16	Wt	White et al. (2007)
93-VU-147T	58/m	keine	Mundhöhle	HPV16	L257R/ Wt	Steenbergen et al. (1995)

UD = Universität Düsseldorf; UM = Universität Michigan; UPCI = Universität Pittsburgh; UT = Universität Turku; m = männlich, w = weiblich; Wt = Wildtyp; FS = Frame-Shift-Mutation (aus: Arenz et al. 2014)

2.5.3 Kultivierung der verwendeten Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in nachfolgend beschriebenem Medium mit den aufgeführten Zusätzen kultiviert.

Roswell-Park-Memorial-Institute 1640 (RPMI) ohne L-Glutamine	PAA, Pasching, Österreich
2mM L-Glutamin	
1% Nicht-essentielle Aminosäuren	
0,1mg/ml Gentamicin	
10% Fötale Kälberserum (April 2011 bis Juli 2012)	Biochrom, Berlin
10% Fötale Kälberserum (ab August 2012)	

Sofern nicht anders angegeben wurden für die Passagierung und die Versuche folgende Reagenzien verwendet:

1x Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Accutase	
1x PBS (steril, ohne Mg, ohne Ca)	

Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C mit 5% CO₂-Begasung und wassergesättigter Atmosphäre in verschiedenen Zellkulturgefäßen kultiviert. Die Passagierung erfolgte alle vier bis fünf Tage unter sterilen Bedingungen, wobei die Zelldichte maßgeblich war. Ab einer Konfluenz von ca. 70-80% wurden die Zellen je nach Wachstumseigenschaften im vorgewärmten Medium verdünnt und in neue Kulturgefäße ausgesät. Zum Ablösen der Zellen wurde der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und daraufhin mit ca. 1ml vorgewärmtem Trypsin/EDTA pro 20cm² überschichtet (Inkubation: 5min bei 37°C). Durch seine proteolytische Eigenschaft wird Trypsin zur Spaltung von Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Verbindungen eingesetzt. Nach längerer Inkubationszeit kann die Substanz allerdings einen toxischen Effekt auf die Zellen haben, weshalb die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt wird. Accutase wird in der Zellkultur ebenfalls zum Ablösen von Zellen eingesetzt, wirkt jedoch auch bei längerer Inkubation nicht toxisch. Zum Ablösen der Zellen mit Accutase wurde ca. 1ml pro 20cm² verwendet und die Zellen anschließend bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt, für 4min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Medium durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vorsichtig resuspendiert und die Zellen vereinzelt.

Für die jeweiligen Versuche wurde die Zellzahl der Suspension mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellsuspension entsprechend den Versuchsbedingungen auf Kulturgefäße verteilt.

2.6 Methoden

Die nachfolgend beschriebenen Daten wurden im Rahmen einer Forschungskoooperation zwischen der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen und der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Phillips-Universität Marburg erhoben. Die Experimente zur Erstellung der Wachstumskurven (s. Abschnitt 2.6.3 und Tabelle 2) wurden Frau Roth und den Doktoranden Frank Ziemann und Christina Mayer gemeinsam durchgeführt. Die Versuche zur Plattierungseffizienz als Vorversuch für die Dosis-Effekt-Kurven (s. Abschnitt 2.6.5 und Abbildung 6) wurden von Andrea Arenz, Maike Roth und den Doktoranden gemeinsam erstellt. Die Experimente zum klonogenen Überleben der Zelllinien wurden

schwerpunktmäßig von Frank Ziemann und Andrea Arenz geplant, generiert und ausgewertet. Bei der Erstellung der Dosis-Effekt-Kurven entfiel der größere Anteil auf Frank Ziemann und Andrea Arenz, Maike Roth und Christina Mayer arbeiteten bei einigen Versuchen mit. Die Abbildung 6 wurde von Frank Ziemann erstellt und zur Verfügung gestellt.

Die durchflusszytometrischen Messungen für die Zellzyklus-Analysen (s. Abschnitt 2.6.6 und Abbildung 7) wurden von Andrea Arenz geplant, durchgeführt und ausgewertet, wobei die Doktoranden bei einzelnen Zeitpunkten die Zellen ausgesät und geerntet haben. Die Rohdaten der Abbildung 8 und Abbildung 9 sind schwerpunktmäßig von Andrea Arenz generiert und zur Verfügung gestellt worden.

Die Experimente zur Analyse der Gen-Expression (qPCR) sowie die Western Blot Analysen wurden im HNO-Forschungslabor in Gießen durchgeführt.

Ein Teil der in dieser Arbeit dargestellten Daten ist in Arenz et al. 2014 bereits publiziert.

2.6.1 HPV-PCR

Der in der Literatur angegebene HPV-Status der verwendeten Zelllinien wurde experimentell mit Hilfe der Primer GP5+ und GP6+ überprüft. Diese amplifizieren in einer PCR-Reaktion die DNA in der L1-Region im HPV16-Genom, sowie in anderen HPV-Typen, und bilden ein Produkt von 141 Basenpaaren. Zur Untersuchung des HPV-Status wurden die Zellen geerntet und je ca. 50 000 Zellen in PBS verdünnt. Die Suspension wurde 8 min bei 95°C denaturiert und anschließend am Vial Tweeter sonifiziert (Cycle 0,5 50%). Anschließend wurden 1,5µl der Suspension für die PCR-Reaktion weiterverwendet. Für die Herstellung eines Mastermix wurden Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase mit zugehörigem 5x Puffer, dNTP Set und Wasser (Chromasolv Plus) verwendet. Der Mastermix setzt sich für ein Standard-Reaktionsvolumen wie folgt zusammen, für mehrere Reaktionen erfolgt eine entsprechende Anpassung der Volumen:

Reagenz	Menge für eine Reaktion [μl]
Wasser, Chromosolv Plus	8,1
5x Phusion Puffer	4
dNTP Mix 10mM	0,4
Primer GP5+ (10pM/ μ l)	0,4
Primer GP6+ (10pM/ μ l)	0,4
Phusion Hot Start II Polymerase	0,2
Zell-PBS-Suspension	1,5
Gesamtvolumen	15

In jedem Versuchsansatz wurden eine Negativ-Kontrolle (mit Wasser anstatt der DNA-Probe), sowie eine Positiv-Kontrolle (mit DNA einer bereits HPV-positiv getesteten Zelllinie) angesetzt. Alle Reagenzien wurden in entsprechende Reaktionsgefäße pipettiert und im PCR-Cycler mit folgendem Programm prozessiert:

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	98	45 sec	1
Denaturierung	98	12 sec	40
Primer-Hybridisierung	45	40 sec	40
Elongation	72	15 sec	40
Finale Elongation	72	4 min	1
Abkühlen	8	∞	-

Die PCR-Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Hierzu wurden 10%ige Polyacrylamid-Gele verwendet, die nach der folgenden Zusammensetzung angefertigt wurden:

Reagenz	Menge für ein Gel [ml]
50x TAE	0,4
Acrylamid-Lösung (40%)	5
TEMED	0,016
6% APS	0,160
ddH ₂ O	14,4
Gesamtvolumen	20

Von den PCR-Proben wurden 10 μ l mit 2 μ l 6x Gel Loading Dye Blue versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurden 4 μ l DNA-Marker (Low Molecular Weight DNA Ladder) in eine Gelspur gegeben. Die

Elektrophorese erfolgte bei 150 Volt konstant für 60min in 1x TAE Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel für 30min in Midori-Green-Lösung inkubiert, kurz (5-10min) in Wasser gewaschen und unter UV-Licht dokumentiert.

2.6.2 Sequenzierung der HPV E6 und E7-Genregion

Zur Überprüfung der Sequenz der viralen Onkogene E6 und E7 wurde die entsprechende virale Genregion einer Sequenzierung unterzogen. Dazu erfolgte eine DNA-Gewinnung mittels DNeasy Blood&Tissue Kit gemäß Herstellerprotokoll. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt und 50ng der isolierten DNA für die PCR-Reaktion verwendet. Folgende Reagenzien wurden für den Mastermix eingesetzt:

Reagenz	Menge für eine Reaktion [µl]
Wasser, Chromosolv Plus	5,95
5x Phusion Puffer	3
dNTP Mix 10mM	0,3
Primer HPV16_E6E7_seq_fwd (10pM/µl)	0,3
Primer HPV16_E6E7_seq_rev (10pM/µl)	0,3
Phusion Hot Start II Polymerase	0,147
Chromosomale DNA [50ng]	5
Gesamtvolumen	15

Wie in Abschnitt 2.6.1 wurden in jedem Versuchsansatz eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle angesetzt. Das Programm für die PCR-Reaktion enthielt folgende Schritte:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30 sec	1
Denaturierung	98	12 sec	
Primer-Hybridisierung	58	40 sec	40
Elongation	72	30 sec	
Finale Elongation	72	4 min	1
Kühlung	8	∞	-

Um die Fragmentlänge der PCR-Produkte zu ermitteln wurden Aliquots von 10µl der Proben gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend auf einem 1%igen Agarose-Gel in 1x TAE aufgetrennt. Die Proben wurden mit 6x Gel Loading Dye Blue versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienten 4µl 2log DNA-Ladder. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 65mA 1x TAE

Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel für 30min in Midori-Green-Lösung inkubiert, kurz (5-10min) in Wasser gewaschen und unter UV-Licht dokumentiert.

Diejenigen PCR-Produkte, die die gewünschte Größe von 1000 Basenpaaren hatten, wurden über organische Extraktion wie in folgendem Protokoll beschrieben aufgereinigt: Zu jeder Probe wurden 15µl 3M Natrium-Acetat gegeben und das Gemisch auf 150µl mit ddH₂O aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150µl Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol (25:24:1). Die Probe wurde geschüttelt und bei maximaler Geschwindigkeit für 10min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 150µl Chlorophorm:Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach erneutem Schütteln wurde für 10min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand mit enthaltener DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde je das 2,5x Volumen an 100% Ethanol zugegeben, die Probe gemischt und für 30min bei Raumtemperatur und anschließend für mindestens 30min bei -20°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 10min bei Raumtemperatur wurde die gefällte DNA sedimentiert, und jeglicher Überstand entfernt. Das Pellet wurde Luftgetrocknet, die DNA in 20µl ddH₂O gelöst und ihre Konzentration am Nanodrop gemessen.

Die DNA-Sequenzierung erfolgte daraufhin mit Hilfe des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits. Es beinhaltet einen Reaction PreMix, der eine Polymerase und Nukleotide mit und ohne Fluorochrom-Kopplung enthält. Nach dem Prinzip der Basenspezifischen Kettenabbruch-Reaktion kann die Polymerase nach Einbau eines markierten Nukleotids an den komplementären Strang kein weiteres Nukleotid einbauen, weshalb DNA-Fragmente mit Fluorochrom-gekoppelten Nukleotid-Enden entstehen. Die Reaktionen wurden separat für beide Primer angesetzt, da die Sequenzierungs-Reaktion nur in 3'-Richtung erfolgt und somit ein Gemisch aus beiden Primern die Sequenzierung in jeweils entgegengesetzte Richtung bewirken würde:

Reagenz	Volumen für eine Reaktion [µl]
PCR-Produkt (20ng)	1-3
Primer (10pmol): HPV16_E6E7_seq_fwd bzw rev	0,75
BigDye Terminator: Sequencing Puffer (5x)	1,5
BigDye Terminator: Reaction PreMix (2,5x)	1
Wasser, Chromosolv Plus	ad 10
Gesamt	10

Das Programm für die PCR-Reaktion enthielt folgende Schritte:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	96	1min	1
Denaturierung	96	10 sec	
Primer-Hybridisierung	50	5 sec	25
Elongation	60	1min 15sec	
Kühlung	8	∞	-

Um Salze und überschüssige Fluorochrome, die in der Sequenzierungs-PCR nicht an DNA-Fragmente gebunden worden sind, zu entfernen, wurden die Proben durch Gel-Filtration aufgereinigt. Hierfür wurde entsprechend der Herstellerangaben des DyeEx 2.0 Spin Kits die Gel-Matrix vorbereitet und die Probe darauf pipettiert. Die markierten PCR-Produkte gelangen durch die Matrix hindurch, Salze und überschüssige Moleküle verbleiben dagegen in den Gel-Poren. Nach Zentrifugation wurde das Eluat an das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen zur Sequenzierung geschickt, wo die DNA-Moleküle elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und die fluoreszierenden End-Nukleotide detektiert wurden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software GeneStudio Professional v. 2.2.0.0, NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool) und ClustalW2 analysiert und mit Referenzgenomen von HPV16-Virustypen der NCBI-Datenbank verglichen.

2.6.3 Wachstumskurven und Koloniebildungseffizienz

Um Zellen strahlenbiologisch charakterisieren zu können mussten die Wachstumsgeschwindigkeit sowie die Koloniebildungseffizienz (sog. Plattierungseffizienz) ermittelt werden. Für die Messung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen wie unter 2.5.3 beschrieben in Suspension gebracht und mit einer Dichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 in 3,5cm Kulturgefäßen ausgesät. Über einen Zeitraum von 8 Tagen wurde in regelmäßigen Abständen die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Am vierten Tag wurde das Medium in den Zellkulturgefäßen erneuert um keine Wachstumsstagnation aufgrund verbrauchten Mediums zu erzeugen. Die Ergebnisse der Zellzahlen pro cm^2 wurden grafisch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgetragen. Anhand der Steigung im exponentiellen Bereich der Wachstumskurve wurde die Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt.

Die Fähigkeit zur Koloniebildung der Zelllinien wurde untersucht, indem jeweils 100, 200, 300, 400 und 500 Zellen in 6cm Kulturgefäße ausgesät wurden. Etwa 14 Tage nach der Aussaat wurde das Medium der Kulturschalen abgenommen, der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und für 15min mit Kristallviolett-Lösung (s.u.) fixiert und gefärbt. Die Anzahl der Kolonien mit mehr als 50 Tochterzellen wurde unter dem Mikroskop ermittelt. Das Verhältnis der gezählten Kolonien zur Menge der ausgesäten Zellen ergibt die Plattierungseffizienz (PE).

0,1% Kristallviolett	Applichem, Darmstadt
10% Paraformaldehyd	Applichem, Darmstadt

$$PE = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen}}$$

2.6.4 Bestrahlung

Für die Erstellung der Dosiseffektcurven wurden die Zellen in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Universitätsklinikum Marburg bei Raumtemperatur an einem Linearbeschleuniger (Elekta Supernova) mit einer Dosisleistung von 4Gy/min mit Einzeldosen von 1Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy oder 8Gy bestrahlt. Die Beschleunigungsspannung der Photonen betrug 6 MeV. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte als Monolayer in einem PMMA Phantom, was garantierte, dass sich das Dosismaximum im Bereich der Zellmonolayer befand. Der Gantrywinkel betrug 180°, der Fokus-Objekt-Abstand 100 cm. Die Dosis wurde mittels Absolutdosimetrie verifiziert.

Für die Versuche zur RNA- und Proteinexpression wurden die Zellen als Monolayer im Biomedizinischen Forschungszentrum bei Raumtemperatur mit einer Röntgenröhre (XRad320iX) für Zellkulturexperimente mit einer Dosisleistung von 1Gy/min mit einer Einzeldosis von 6Gy bestrahlt. Die Beschleunigungsspannung betrug 320kV und der Kathodenstrom 10mA. Während der Bestrahlung wurde ein Filter aus 0,5mm Kupfer und 0,5mm Aluminium verwendet. Der Fokus-Objekt-Abstand betrug 60cm.

2.6.5 Klonogenes Überleben (Dosis-Effekt-Kurven)

Das klonogene Überleben beschreibt die Fähigkeit von Einzelzellen, sich zu teilen und Kolonien von Tochterzellen zu bilden. Um den Effekt ionisierender Strahlung auf das Wachstum der verwendeten Zellen zu untersuchen wurde deren klonogenes Überleben mittels Dosis-Effekt-Analysen ermittelt. Dazu wurden exponentiell

wachsende Zellen in 6cm Kulturgefäße mit unterschiedlichen Dichten (200 - 24000 Zellen) ausgesät. Die initial eingesäte Zelldichte musste der individuellen Plattierungseffizienz jeder Zelllinie und dem erwarteten letalen Effekt der Bestrahlung angepasst werden. Es wurde angestrebt, ein Wachstum von ca. 50 Kolonien pro Kulturgefäß unabhängig von der Bestrahlungsdosis gewährleisten zu können.

Die Zellen wurden 24h nach ihrer Aussaat mit Dosen von 1 bis 8Gy in der Klinik für Strahlentherapie am Linearbeschleuniger Elekta Supernova bestrahlt und für 14 bis 18 Tagen bei 37°C ohne Mediumwechsel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter Abschnitt 2.6.3 beschrieben fixiert und mit 0,1% Kristallviolett angefärbt. Die Überlebensfraktion (*surviving fraction*, SF) wird als Quotient der Anzahl von Kolonien nach Bestrahlung zur Menge ausgesäter Zellen und der Plattierungseffizienz definiert:

$$SF = \frac{\text{Anzahl der Kolonien nach Bestrahlung}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen} \cdot PE}$$

Die Ergebnisse des klonogenen Zellüberlebens (*survival*, S) nach Bestrahlung (*radiation dose*, D) wurden halblogarithmisch aufgetragen und anhand des linearquadratischen Modells gefittet (Franken, Nicolaas A P et al. 2006):

$$S(D) / S(0) = \exp(\alpha D + \beta D^2)$$

2.6.6 Durchflusszytometrie zur Zellzyklus-Analyse

Durch die strahleninduzierte Schädigung der DNA wird u. a. die Reproduktion der Zellen beeinflusst. Über einen Zellzyklusarrest werden Reparatur-Maschinerien in Gang gesetzt, die die genomischen Schäden beseitigen sollen. Sind diese Schäden irreparabel oder ist die Funktion der Reparatur-Mechanismen beeinträchtigt, so werden die Zellen über den Mechanismus des programmierten Zelltods (Apoptose) gezielt abgetötet. Mit Hilfe des LSR 2 Flow Cytometers (BD Biosciences, Standort: Uniklinik Marburg) wurden Zellzyklus-Analysen durchgeführt, die die Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffs Propidiumiodid untersuchten. Da sich die Fluoreszenzintensität des Propidiumiodids proportional zum DNA-Gehalt der Zelle verhält kann über eine Intensitäts-Änderung zwischen G1- (einfacher DNA-Gehalt), S- (ein- bis zweifacher DNA-Gehalt) und G2-Phase (zweifacher DNA-Gehalt) unterschieden werden. DNA-haltige Zellfragmente, wie sie etwa bei Apoptose entstehen, werden vor der G1-Phase gemessen (sog. subG1-Phase). Polyploide Zellen werden zwar auch erfasst, jedoch ist keine Unterscheidung zwischen „normalen“

G2-arretierten Zelle (DNA-Gehalt: 4N) und polyploiden G1-arretierten Zellen (DNA-Gehalt: 2x 2N = 4N) möglich.

Methodisch wurden Zellen in 6cm Kulturgefäße mit unterschiedlichen Dichten ausgesät und während ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit 2 oder 6Gy bestrahlt. Die Zellen wurden zu definierten Zeitpunkten geerntet, wobei die im Kulturüberstand und Waschschrift befindlichen Zellen in 15ml Reaktionsgefäßen aufgefangen wurden, um zu gewährleisten, dass abgeschwommene, apoptotische Zellen in die Messung eingingen. Der adhärenente Zellrasen wurde mittels Accutase abgelöst (siehe 2.5.3), durch auf- und abpipettieren vereinzelt und mit eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert. Die Suspension wurde über Nacht bei -20°C inkubiert. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, und schließlich mit 500µl 1xPBS und 500µl DNA-Extraktions-Puffer versetzt, der die Zellmembranen permeabilisiert:

192ml 0,2mM Na ₂ HPO ₄	pH 7,8
8ml 0,1% TritonX-100	
In H ₂ O	

Nach Inkubation für 5min bei Raumtemperatur wurde die Suspension zentrifugiert und die Zellen in 400µl DNA-Färbe-Lösung resuspendiert:

20µg/ml Propidiumiodid	PromoCell GmbH, Heidelberg
200µg RNase A (Stock: 2,5mg/ml)	QIAGEN, Hilden
In PBS	PAA, Pasching, Österreich

Die Proben wurden für 30min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend der zelluläre DNA-Gehalt am LSR 2 analysiert. Pro Probe wurden mindestens 20 000 Zellen gemessen, und die Daten mittels FlowJo 7.6 Software (Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA) von Frau Dr. Arenz ausgewertet. Die Anzahl der gemessenen Zellen wurde in Histogrammen gegen den DNA-Gehalt aufgetragen.

2.6.7 Proteinbiochemie

2.6.7.1 Protein-Isolation aus Gesamt-Zell-Extrakten

Um den Effekt der Bestrahlung auf ausgewählte Proteine, die an der intrinsischen Strahlenantwort beteiligt sind, zu analysieren wurden die verwendeten Zellen in Zellkulturgefäße ausgesät und bei einer Konfluenz von 70-80% mit 6Gy bestrahlt und im Inkubator bis zur weiteren Analyse inkubiert, um externe Stressfaktoren auszuschließen und so ausschließlich den Bestrahlungseffekt untersuchen zu können.

Die unbestrahlte Kontrollgruppe sowie die bestrahlten Zellen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt mittels Trypsin von dem Boden der Kulturgefäße abgelöst, die Zellzahl bestimmt und die Zellen pelletiert. Sofern nicht anders angegeben wurden alle folgenden Schritte mit gekühlten Substanzen und auf Eis durchgeführt. Zur Protein-Isolation wurde – abhängig von der Zellzahl – eine Lösung aus RIPA-Puffer und Protease-Inhibitor-Cocktail auf das Zellpellet pipettiert:

150µl RIPA-Puffer pro $5 \cdot 10^6$ Zellen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
15µl Protease Inhibitor Cocktail pro 150µl RIPA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Die Zellsuspension wurde gemischt und anschließend für 10min bei maximaler Geschwindigkeit bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Protein-Konzentrations-Bestimmung und Western Blot Analyse verwendet.

Die Western Blot Analyse der Retinoblastom-Proteine erfolgte zusätzlich auch mit Zellpellets, die mit SDS-Ladepuffer (Rezept siehe Abschnitt 2.6.7.3) versetzt wurden. Die Proteine der Probe wurden anschließend für 5min bei 95°C denaturiert und je 20µl des Lysats zur Analyse eingesetzt.

2.6.7.2 Protein-Konzentrations-Messung mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration des Gesamtzelllysats wurde das Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit verwendet. Diesem Kit liegt ein biochemisches Verfahren zugrunde, bei dem die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ temperaturabhängig durch Aminosäurereste und Peptidbindungen erfolgt. Bicinchoninsäure bildet mit den reduzierten Kupferionen Chelatkomplexe, die einen Farbumschlag der Lösung herbeiführen, der bei einer Absorption von 562nm gemessen werden kann. Die in den Proben enthaltene Proteinmenge ist hierbei proportional zur gebildeten Menge der Chelatkomplexe. Die zu untersuchenden Proben wurden verdünnt und entsprechend der Herstellerangaben mit Reagent A und B versetzt. Die Protein-Konzentration der Proben wurde anhand einer Verdünnungsreihe von BSA mit bekannter Protein-Konzentration berechnet.

Pierce® BCA Protein Assay Reagent A: Bicinchoninsäure	Thermo-Fisher Scientific,
Pierce® BCA Protein Assay Reagent B: Kupfersulfat	Langensfeld

2.6.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine werden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Polyacrylamid-Matrix besteht aus quervernetzten Acrylamid- und N´N´-Methylen-Bisacrylamid-Polymeren, deren Polymerisation mit Hilfe

von Ammoniumersulfat-Ionen (APS) gestartet und von Tetramethylethylen-diamin (TEMED) katalysiert wird. In Abhängig von der eingesetzten Menge des Acrylamids entstehen engmaschigere (hohe Konzentration) Gele zur besseren Auftrennung kleinerer Proteine, oder weitmaschige Gele (geringe Konzentration) zur besseren Auftrennung größerer Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurden diskontinuierliche Gele verwendet, bestehend aus einem Sammelgel (4%) und einem Trenngel (12% oder 6%) mit jeweils unterschiedlichen Puffersystemen. Folgende Puffer wurden für die SDS-Page verwendet:

10x Laemmli-Laufpuffer:	250 mM Tris Base 1,92 M Glycin 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) in ddH ₂ O	1x Laufpuffer als 10x Konzentrat angesetzt.
4x Sammelgelpuffer:	15,14g Tris-base (0,5M) 10ml 10%iges SDS (0,4%) in ddH ₂ O	pH 6,8 mit HCl einstellen
4x SDS-Ladepuffer:	15% Glycerin 4% Natriumdodecylsulfat (SDS) 20% β-Mercaptoethanol 25% 4x Sammelgelpuffer 4% Bromphenolblau in ddH ₂ O	
4x Trenngelpuffer:	1,5M Tris Base 0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS) in ddH ₂ O	pH 8,8

Für die Standard-SDS-Gele (Größe 10,1cm x 7,8cm x 1mm) wurden folgende Mengen eingesetzt:

Trenngel (12%)	Menge pro Gel	Sammelgel (4%)	Menge pro Gel
4x Trenngelpuffer	5 ml	4x Sammelgelpuffer	2,5ml
ddH ₂ O	8,8ml	ddH ₂ O	6,4ml
40% Acrylamid-Lösung	6ml	40% Acrylamid-Lösung	1ml
6% APS	160µl	6% APS	90µl
TEMED	16µl	TEMED	9µl

Zur besseren Protein-Banden-Auftrennung wurden längere Gelplatten verwendet (Größe 20cm x 20cm x 1mm) und 12%igen SDS-Gele wurden folgendermaßen hergestellt:

Trenngel (12%)	Menge pro Gel	Sammelgel (4%)	Menge pro Gel
4x Trenngelpuffer	10ml	4s Sammelgelpuffer	5ml
ddH ₂ O	17,6ml	ddH ₂ O	12,8ml
40% Acrylamid-Lösung	12ml	40% Acrylamid-Lösung	2ml
6% APS	320µl	6% APS	180µl
TEMED	32µl	TEMED	18µl

Weiterhin wurden 6%igen SDS-Gele mit den größeren Gelplatten hergestellt:

Trenngel (6%)	Menge pro Gel	Sammelgel (4%)	Menge pro Gel
4x Trenngelpuffer	10ml	4s Sammelgelpuffer	5ml
ddH ₂ O	23,6ml	ddH ₂ O	12,8ml
40% Acrylamid-Lösung	6ml	40% Acrylamid-Lösung	2ml
6% APS	320µl	6% APS	180µl
TEMED	32µl	TEMED	18µl

Der 4x Sammelgelpuffer hat einen pH-Wert von 6,8, weshalb das im Laemmli-Laufpuffer enthaltene Glycin vermehrt ungeladen vorliegt und langsam zur Anode wandert. Die Chlorid-Ionen wandern dagegen schneller und agieren somit als „Leit“-Ionen, wohingegen Glycin als „Folge“-Ionen fungieren. Zwischen beiden Molekülen entsteht ein Feldstärkegradient, innerhalb dessen sich die Proteine in Abhängigkeit ihrer Mobilität auf der jeweiligen Höhe ansammeln (Stapeleffekt). Der pH-Wert von 8,8 im Trenngel bewirkt, dass das niedermolekulare Glycin überwiegend geladen vorliegt und daher die Proteine im Trenngel überholt. Die Proteine werden also im Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert, im Trenngel dagegen wandern sie im Wesentlichen ihrer Molekülgröße entsprechend zur Anode. Dies wird durch die Vorbehandlung der Proben mit 4x SDS-Ladepuffer ermöglicht. Das darin enthaltene β-Mercaptoethanol führt die Reduktion von Disulfidbrücken und unterstützt damit die Entfaltung der Proteinkomplexe durch SDS und aufkochen der Probe, sodass alle Proteine in mehr oder weniger gleichförmigen, ungefalteten Strukturen vorliegen. Gleichzeitig überdeckt das im Ladepuffer enthaltene SDS die Eigenladung der Proteine

und ermöglicht so die Auftrennung der denaturierten Proteine im Wesentlichen entsprechend ihrer Molekülgröße.

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt, sodass dieser in 1-facher Endkonzentration vorlag. Anschließend wurden die Proben für 5min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei den Standard-Gelen für ca. 60min bei 200V bis die Lauffront das untere Ende der Gelplatte erreichte. Bei den größeren SDS-Gelen variierten Dauer und Stromstärke, sodass sich die zu analysierenden Proteine im gewünschten Bereich des Trenngels befanden.

2.6.7.4 Western Blot

Der Western Blot dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen, die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) ihrer Größe entsprechend aufgetrennt wurden. Während des Western Blottings erfolgt die elektrophoretische Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Transfermembran (Nitrocellulose). Die Proteine können auf der Membran anschließend direkt über Ponceau oder indirekt über Antikörper-Färbung nachgewiesen werden. Dem Transferpuffer wurde erst kurz vor Gebrauch das Methanol zugesetzt.

	31,25 mM Tris Base
Transferpuffer:	240 mM Glycin
	10% Methanol (direkt vor Anwendung frisch zugegeben)

Die Nitrozellulose-Membran für ca. 5min vor Aufbau des Blotting Sandwichs im Transferpuffer äquilibriert. Die Filterpapiere wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Die Blotkammer wurde in aufsteigender Reihenfolge aufgebaut:

Anode – Filterpapier – Membran – Gel – Filterpapier – Kathode

Der Transfer erfolgte 50min bei 10V konstant. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit ddH₂O gewaschen, die Proteine für 10min mit Ponceau-Lösung angefärbt und die Färbung im ChemiDoc detektiert. Die Auswertung der Western Blot-Banden erfolgte über densitometrische Quantifizierung mit Hilfe der Image Lab Software Version 3.0 (BioRad, Hercules, CA). Zur Normierung diente das Signal des Haushaltsgens β -Tubulin.

2.6.7.5 Immundetektion

Die auf Nitrozellulosemembranen gebundenen Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die Membran wurde zunächst für 1h in Milch-TBST

geblockt, anschließend folgten Waschschritte mit 1x MTBST für je 5min. Eine Inkubation mit dem Protein-spezifischen Primärantikörper erfolgte in der jeweiligen Verdünnung (s. Abschnitt 2.3) entweder in 2% BSA/TBST oder in 5% MTBST. Je nach Qualität des Primärantikörpers wurde dieser entweder über Nacht bei 4°C oder für 1h bei Raumtemperatur auf der Membran belassen. Nach erneutem Waschen für 3x 5min in TBST erfolgte die Inkubation mit dem Spezies-spezifischen Sekundärantikörper, der mit einem Nachweisenzym (*Horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist. Über eine chemische Reaktion kann dieses Enzym das in der Substratlösung enthaltene Luminol umsetzen, wodurch ein detektierbares Chemilumineszenz-Signal entsteht. Dieses wurde mit dem ChemiDoc XRS System detektiert. Folgende Lösungen wurden verwendet:

2% BSA/TBST:	2% Bovine Serum Albumin 1x TBST
5% Milch-TBST (MTBST):	1x TBST 5% Milchpulver
10x <i>Tris buffered Saline</i> (TBS): pH 7,4	46 mM Tris Base 150 mM NaCl in H ₂ O
1x TBS + Tween20 (TBST):	1x TBS 0,1% Tween20

Die Western Blot Substratlösungen wurden jeweils direkt vor Verwendung nach Herstellerangaben frisch angesetzt.

2.6.7.6 Stripping und erneute Immun-Markierung

Um nacheinander unterschiedliche Proteine auf einer Membran nachweisen zu können, müssen die jeweiligen Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden. Dafür wurde die Membran für 15min in Stripping Lösung 1 inkubiert, anschließend mit Wasser gewaschen und wiederum für 15min in Stripping Lösung 2 inkubiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Blockierung der freien Bindestellen der Membran mit 5% MTBST für 1h bei Raumtemperatur. Anschließend wiederholt sich die Behandlung mit Primär- und Sekundärantikörper wie in 2.6.7.5 beschrieben. Die Zusammensetzung der Stripping-Lösungen ist nachfolgend angegeben:

Stripping Lösung 1 (pH 2)	Stripping Lösung 2
25mM Glycin	100mM NaOH
10% SDS	10% SDS
In ddH ₂ O	In ddH ₂ O

2.7 RNA-Isolation

Für die Genexpressions-Analyse der HPV-Onkogene E6 und E7 wurden Zellpellets von HPV-positiven Zelllinien hergestellt (siehe Abschnitt 2.5.3). Aus den Pellets wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers die gesamte zelluläre RNA isoliert, wobei zusätzlich ein DNase-Verdau nach Herstellerprotokoll durchgeführt wurde. Die Konzentration der isolierten RNA wurde im Nanodrop gemessen.

Für die *Human p53 Signaling Pathway* RT² Profiler PCR Arrays wurde die isolierte RNA zusätzlich über einen RNA 6000 Nano Chip nach dem Herstellerprotokoll auf ihre Integrität überprüft. Hierbei wird über Kapillar-Gelelektrophorese die Größenverteilung der RNA-Probe überprüft. Die sog. RNA-Integritäts-Nummer (RIN) wird aus dieser Verteilung berechnet und gibt Aufschluss über die Qualität der RNA-Präparation. Das System weist der Probe nach der Analyse einen RIN-Wert zwischen 1 und 10 zu, wobei ein RIN-Wert von 10 für eine komplett intakte und 1 für eine völlig degradierte RNA steht. Diese Skala stellt seit einigen Jahren einen international gängigen RNA-Qualitätsstandard dar (Pfaffl 2004).

2.8 cDNA-Synthese

Für die Expressionsanalyse wurden die RNA-Moleküle unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA, sog. komplementäre DNA (cDNA), umgeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde zur cDNA-Synthese 1µg der isolierten RNA für die Verwendung des High Capacity RNA-to-cDNA Kits benutzt. Die Reaktionen wurden nach Angaben der Hersteller angesetzt und im PCR System Thermal Cycler ebenfalls nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Für die *Human p53 Signaling Pathway* RT² Profiler PCR Arrays wurden 0,5µg der isolierten Gesamt-Zell-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt und mit Hilfe des RT² First Strand Kits nach Herstellerangaben die cDNA synthetisiert.

2.9 Quantitative *real time* PCR

Zur quantitativen Genexpressions-Analyse wird die *real time* PCR (qPCR) angewandt. Hierbei erfolgt in jedem Zyklus der PCR-Reaktion der Einbau eines DNA-

interkalierenden Farbstoffs. Theoretisch werden pro Zyklus die eingesetzten cDNA-Moleküle verdoppelt, sodass auch das Fluoreszenz-Signal exponentiell ansteigt. Dabei ist der Schwellenwert entscheidend, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet und ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz messbar ist (*Threshold-Cycle*, CT). Gegen Ende erreicht die Reaktion mangels Primer und Nukleotide ein Plateau, bei dem die Amplifikationen nach und nach zum Stillstand kommen und die Signalstärke unverändert bleibt. Die qPCR erfolgte mit den in Abschnitt 2.4 beschriebenen Primern. Für die Reaktionsansätze wurde der DNA-interkalierende Farbstoff SYBR Green verwendet. Weiterhin wurden 5ng cDNA pro PCR-Reaktion eingesetzt. Ein Reaktions-Ansatz enthielt 15µl und umfasste:

Reagenz	Volumen pro Probe [µl]
SYBR Select Master Mix	8,1
Wasser	3,3
Primer fwd (10 pmol)	1,3
Primer rev (10 pmol)	1,3
cDNA (5 ng/µl)	1,0

Die Reaktionsgefäße wurden im PCR-Gerät StepOne Plus platziert. Das Gerät durchlief folgende Zyklen:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 sec	40
Primer-Hybridisierung	57	60 sec	
Finale Elongation	95	15 sec	1
Abkühlen	70	1 min	1
Schmelzkurve	70-90		71
Kühlung	8	∞	-

Nach der initialen Denaturierung wurde nach jedem weiteren Zyklus die Fluoreszenz-Änderung gemessen und eine Schmelzkurvenanalyse nach der finalen Elongation und Abkühlung vollzogen. Hierbei wurde während eines Temperaturanstiegs alle 0,2°C das Fluoreszenz-Signal gemessen und die Schmelztemperatur anhand einer abrupten Fluoreszenz-Minderung bestimmt. Diese entsteht durch freigesetzte Farbstoff-Moleküle beim Schmelzen der PCR-Produkte. Die Schmelztemperatur gibt Aufschluss über die

Spezifität des gebildeten PCR-Produkts, denn unspezifische Primerdimere schmelzen bereits bei niedrigeren Temperaturen als spezifische PCR-Produkte.

Die Effizienz der qPCR wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (5ng bis 0,078ng cDNA) mit cDNA als Matrize ermittelt. Die eingesetzte cDNA-Menge wurde in einer logarithmischen Funktion gegen die CT-Werte aufgetragen und so die PCR-Effizienz nach der Formel $E=10^{[-1/\text{Steigung}]}$ berechnet.

Als Negativ-Kontrollen wurden Reaktionsansätze mit Wasser bzw. RNA anstatt cDNA verwendet. Zur Normalisierung der qPCR Ergebnisse wurde die RNA des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens humanes ribosomales Protein P0 verwendet.

2.10 p53 Signaling Pathway RT-PCR Array

Um Komponenten von Signalwegen zu identifizieren, die einerseits durch die p53-vermittelte Strahlenantwort verändert, andererseits von HPV beeinflusst sind, wurde die Genexpression von p53-abhängigen Genen mit Hilfe von *Human p53 Signaling Pathway* RT2 Profiler PCR Arrays analysiert. Mit einem Array können 84 Zielgene untersucht werden. Sie sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet und kodieren für Apoptose-, Zellzyklus-, Zellwachstums-, Proliferations-, Differenzierungs-, sowie DNA-Reparatur-induzierte Gene, die in der Literatur bereits hinreichend beschrieben sind.

Symbol	Bezeichnung	Symbol	Bezeichnung
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	JUN	Jun proto-oncogene
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	KAT2B	K(lysine) acetyltransferase 2B
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
BAX	BCL2-associated X protein	MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)
BBC3	BCL2 binding component 3	MDM4	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
BCL2A1	BCL2-related protein A1	MSH2	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
BID	BH3 interacting domain death agonist	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	MYOD1	Myogenic differentiation 1
BRCA1	Breast cancer 1, early onset	NF1	Neurofibromin 1
BRCA2	Breast cancer 2, early onset	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1

BTG2	BTG family, member 2	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	PIDD	P53-induced death domain protein
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	PPM1D	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D
CCNB1	Cyclin B1	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
CCNE1	Cyclin E1	PRKCA	Protein kinase C, alpha
CCNG1	Cyclin G1	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
CCNH	Cyclin H	PTTG1	Pituitary tumor-transforming 1
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	RB1	Retinoblastoma 1
CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	RPRM	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	SESN2	Sestrin 2
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	SIAH1	Seven in absentia homolog 1 (Drosophila)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	SIRT1	Sirtuin 1
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	TADA3	Transcriptional adaptor 3
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	TNF	Tumor necrosis factor
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
E2F1	E2F transcription factor 1	TNFRSF10D	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain
E2F3	E2F transcription factor 3	TP53	Tumor protein p53
EGFR	Epidermal growth factor receptor	TP53AIP1	Tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1
EGR1	Early growth response 1	TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
EI24	Etoposide induced 2.4 mRNA	TP63	Tumor protein p63
ESR1	Estrogen receptor 1	TP73	Tumor protein p73
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	TSC1	Tuberous sclerosis 1
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	WT1	Wilms tumor 1
FOXO3	Forkhead box O3	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	ACTB	Actin, beta

GML	Glycosylphosphatidylinositol anchored molecule like protein	B2M	Beta-2-microglobulin
HDAC1	Histone deacetylase 1	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HK2	Hexokinase 2	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)		

Für die Versuche wurden vier HPV-positive Zelllinien (VU-147T, UM-SCC47, UM-SCC104 und UPCI:SCC152) und zwei HPV-negative Zelllinien (UM-SCC11b und UT-SCC33) je 4h nach Bestrahlung mit 6Gy untersucht. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die cDNA nach den Herstellerangaben mit SYBR Green ROX qPCR Mastermix versetzt und auf die Array-Platte gegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte im StepOnePlus und umfasste folgende Zyklen:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 sec	40
Primer-Hybridisierung	60	60 sec	
Finale Elongation	95	15 sec	1
Abkühlen	60	1 min	1
Schmelzkurve	60-95		
Kühlung	8	∞	-

2.11 qPCR Auswertung

Für die Auswertung der qPCR müssen einerseits die Effizienz der PCR-Reaktionen an sich, andererseits die Expression von Kontrollgenen berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde für die E6 und E7-Expressionsanalyse die relative Quantifizierung nach Livak und Schmittgen (2001) gewählt. Dabei wird der Expressionsunterschied anhand der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ dargestellt. Die Expression des Zielgens wird auf die eines nicht regulierten Gens normalisiert und der CT-Wert (*Cycle Threshold*) des Zielgens vom CT-Wert des Referenzgens subtrahiert ($\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$). Der Vorteil hierbei liegt in der Reduktion der Varianz der Expressionen. Da unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen und Matrixeffekte sowie Fehler bei der reversen Transkription aller Proben auftreten können werden sie bei der relativen Quantifizierung „herausgerechnet“ (Pfaffl 2004). Anschließend wurde die relative Expression des Zielgens in den bestrahlten Proben auf die Expression der

Kontrollproben bezogen und die jeweiligen Δ CT-Werte voneinander abgezogen ($\Delta\Delta$ CT).

Die *p53 Signaling Pathway* RT2 PCR Arrays wurden ebenfalls anhand der relativen Quantifizierung nach Livak und Schmittgen (2001) ausgewertet, die Expressions-Änderung wird ebenfalls mit der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ dargestellt.

2.12 Statistik

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Zur Auswertung der qPCR-Ergebnisse wurde die StepOne Software Version 2.2.2 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) benutzt.

Die statistische Analyse der Dosis-Effekt-Kurven wurden mit Hilfe von GraphPad Prism Version 5 durchgeführt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei im Triplikate durchgeführten Experimenten (Abschnitt 3.2.2).

Für die Analysen der Dosis-Effekt-Kurven und der qPCR Expressionsanalysen wurden *Students T-Tests* (Fehlerindex * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 HPV-Nachweis

Die vier Zelllinien UM-SCC47, UM-SCC104, UPCI:SCC152 und 93-VU-147T sind laut Literatur durch eine Infektion mit HPV Typ 16 charakterisiert (Lansford et al. 1999; Steenbergen et al. 1995; Tang et al. 2012; White et al. 2007), die anderen vier Zelllinien UD-SCC1, UM-SCC6, UM-SCC11b und UT-SCC33 enthalten keine virale DNA (Lansford et al. 1999; Zhao et al. 2011). Um den HPV-Status aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien zu überprüfen, wurde mittels PCR-Reaktion die DNA der viralen L1-Gen-Region über die Primer GP5+ und GP6+ amplifiziert (de Roda Husman, A M et al. 1995) und die Amplifikate über nachfolgende Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 5). Die DNA-Banden haben eine Größe von 150 Basenpaaren. Die Zelllinien UD-SCC1, UM-SCC6 und UT-SCC33 sowie die Negativ-Kontrolle weisen keine DNA-Bande auf. Somit konnte der HPV-Status aller Zelllinien entsprechend dem in der Literatur angegebenen Status bestätigt werden. Der HPV-Status wurde in Marburg zusätzlich anhand des Expressions-Nachweises viraler HPV-E6 und E7-mRNA bestätigt (Arenz et al. 2014).

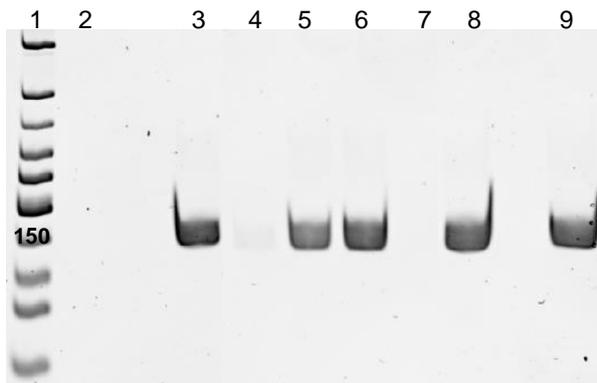


Abbildung 5: HPV-PCR

HPV-PCR mit Primern GP5+ und GP6+. Die Größe des erwarteten PCR-Produkts liegt bei 150 Basenpaaren. 1: Größenstandard, 2: Negativ-Kontrolle, 3: UD-SCC2, 4: UT-SCC33, 5: UM-SCC104, 6: UPCI:SCC152, 7: UM-SCC6, 8: VU-147T, 9: Positiv-Kontrolle: bereits HPV-positiv getestete Zelllinien

3.2 Dosis-Effekt-Beziehung

3.2.1 Wachstumskurven

Für eine strahlenbiologische Charakterisierung ist die Kenntnis über die Wachstumseigenschaften der zu untersuchenden Zelllinien notwendig. Daher wurden die Verdopplungszeiten der Zelllinien experimentell ermittelt (Tabelle 2). Die Vermehrung einer definiert ausgesäten Zellmenge wurde zu bestimmten Zeitpunkten gemessen.

Tabelle 2: Verdopplungszeiten

Ermittelte Verdopplungszeiten der untersuchten Zelllinien in Stunden.

Zelllinien	HPV Typ 16	Verdopplungszeit [h]
UD-SCC1	negativ	17,7
UT-SCC33	negativ	32,3
UM-SCC6	negativ	33,9
UM-SCC11b	negativ	20,6
UM-SCC47	positiv	24,1
UM-SCC104	positiv	35,9
93-VU-147T	positiv	36,3
UPCI:SCC152	positiv	42,6

3.2.2 Klonogenes Überleben

Das klonogene Überleben beschreibt die Möglichkeit von Zellen, sich nach Bestrahlung zu teilen und dabei Kolonien von mindestens 50 Tochterzellen zu bilden (PUCK und MARCUS 1956). Um das klonogene Überleben nach Exposition mit ionisierender Strahlung untersuchen zu können, wurde in Vorversuchen die Koloniebildungseffizienz (sog. Plattierungseffizienz) jeder Zelllinie ermittelt. Anhand der Koloniebildungseffizienz konnten definierte Zellzahlen ausgesät, bestrahlt und das klonogene Überleben untersucht werden. Unsere Überlebenskurven zeigen, dass im Bereich geringer Dosen bis zu 2Gy alle Zelllinien ähnlich viele überlebende Kolonien aufweisen (Abbildung 6 A) (Arenz et al. 2014). Die HPV-negative Zelllinie UM-SCC6 zeigt die meisten überlebenden Kolonien im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien, wohingegen die HPV-positive Zelllinie UM-SCC-47 nach Inkubation mit mehr als 6Gy keine Kolonien mehr bildete. Der Anteil (Fraktion) der überlebenden Zellen (SF) nach einer Dosis von 2Gy ist jedoch bei den HPV-positiven Zelllinien im Mittel signifikant geringer ($p=0,01$) als bei den HPV-negativen (Abbildung 6 B) (Arenz et al. 2014).

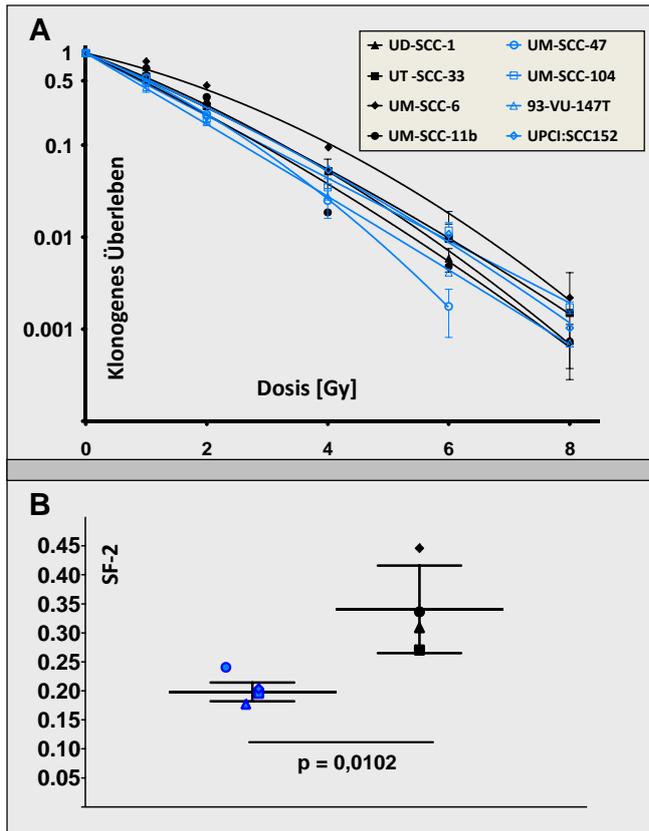


Abbildung 6: Überleben nach Bestrahlung

- A) Klonogenes Überleben der untersuchten HPV-positiven (blau) und HPV-negativen Zelllinien (schwarz). Aufgetragen sind Mittelwerte mit Standardabweichung.
- B) Anteile überlebender Zellen (SF-2 = *surviving fraction* nach 2Gy). Aufgetragen sind Mittelwerte mit Median und Standardabweichung nach statistischer Analyse mit *Students T-Test*. (Arenz et al. 2014)

3.3 Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung

Exposition mit ionisierender Strahlung bewirkt in gesunden Zellen einen Zellzyklus-Arrest. Dieser ermöglicht die Reparatur der beschädigten DNA. Bei irreparablen Schäden wird Apoptose eingeleitet. Die gefundene Strahlensensitivität der vier untersuchten HPV-positiven Zelllinien wurde im Hinblick auf das Zellzyklus-Verhalten mit dem der vier HPV-negativen Zellen verglichen.

Die Häufigkeit der DNA-Verteilung (x-Achse) ist in Histogrammen gegen die DNA-Menge (y-Achse) exemplarisch für zwei Zelllinien aufgetragen (Abbildung 7). Die Zellen der HPV-positiven Zelllinie UPCI:SCC152, sowie der HPV-negativen UM-SCC11b zeigen bereits 10h nach Bestrahlung mit 2 bzw. 6Gy einen veränderten DNA-Gehalt im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, da mehr Zellen einen doppelten DNA-Gehalt (türkiser Peak) aufweisen (Arenz et al. 2014). In den unbestrahlten Kontrollen bleibt die Verteilung des DNA-Gehalts unabhängig vom HPV-Status in den Kontrollen ähnlich. 20h nach Bestrahlung mit 2Gy werden bei der HPV-positiven Zelllinie vermehrt Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt gemessen, bei der HPV-negative Zelllinie dagegen nicht. Nach 6Gy enthält die Probe der Zelllinie UPCI:SCC152 zum Zeitpunkt 20h kaum Zellen mit einfachem DNA-Gehalt, zum Zeitpunkt 96h tragen dagegen mehr Zellen einen

einfachen DNA-Gehalt (grüner Peak), und die Häufigkeit der Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt ist zu beiden Zeitpunkten vergleichbar. Die DNA-Verteilung der HPV-negativen Zelllinie nähert sich 96h nach 6Gy wieder der Kontrolle an. Die Zell-Fraktion, die 96h nach einer Dosis von 6Gy DNA-Fragmente enthielt (siehe Pfeil: SubG1), tritt bei der Probe der HPV-positiven Zelllinie verstärkt auf.

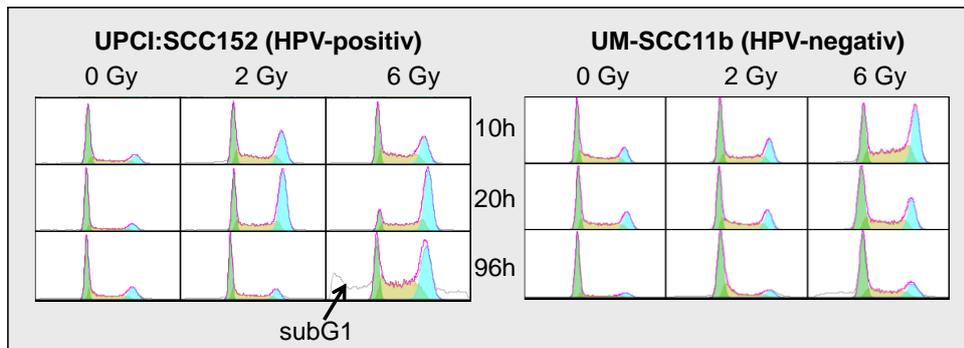


Abbildung 7: Verteilung der DNA-Gehalte der HPV-positiven Zelllinie UPCI:SCC152 und der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC11b nach Bestrahlung mit 2Gy und 6Gy

In dem Histogramm ist die Häufigkeitsverteilung der DNA-Gehalte einer HPV-positiven Zelllinie UPCI:SCC152 (links) und einer HPV-negativen Zelllinie UM-SCC11b (rechts) nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 2Gy und 6Gy abgebildet. Der DNA-Gehalt (x-Achse) gibt Aufschluss über die Zellzyklus-Phase: Grün: Zellen in G1-Phase, Gelb: Zellen in S-Phase, Türkis: Zellen in G2/M-Phase. HPV-positive Zellen arretieren mit steigender Strahlungsintensität in der G2-Phase, und weisen verstärkt fragmentierte DNA auf (subG1-Phase, Pfeil).

Die prozentuale Verteilung der mittleren DNA-Gehalte je nach Bestrahlung ist entsprechend ihrer Zellzyklus-Phasen in [Abbildung 8](#) zusammengefasst. Die G1-Phasen-Verteilung zeigt mit steigender Dosis weniger HPV-positive Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (Arenz et al. 2014). Die DNA-Verteilung der HPV-negativen Zelllinien ähnelt der Verteilung der Kontrollproben und auch 6Gy bewirken nur eine kurzfristige Abnahme der Zellen mit einfachem DNA-Gehalt. Alle HPV-negativen Proben wiesen nach 48h einen wachsenden Anteil G1-Phase-Zellen auf.

Die DNA-Gehalte der HPV-positiven und -negativen Zellen zeigen bis 10h eine ähnliche S-Phase-Verteilung (Arenz et al. 2014). Nach diesem Zeitpunkt besitzen die HPV-positiven Zelllinien stark fluktuierende Mengen an S-Phase-Zellen, die HPV-negativen Zelllinien enthalten nach 48h annähernd ähnlich viele Zellen in der S-Phase wie die Kontrollproben. Entsprechend des wachsenden Anteils HPV-negativer G1-Phase-Zellen verringerte sich der Anteil dieser S-Phase-Fraktion 48h nach Bestrahlung.

Entsprechend der DNA-Verteilung der G1-Phase verursacht eine Dosis von 2Gy in beiden Entitäten einen Anstieg der G2-Phase-Zellen, in den HPV-negativen Zellen flaut dieser schneller ab (Arenz et al. 2014). Bestrahlung mit 6Gy resultiert in den HPV-positiven Zelllinien mit einem verstärkten und länger andauernden G2-Phasen-Arrest, verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien. Auch hier ist nach 48h ein verminderter Anteil G2-Phase-Zellen zu verzeichnen, entsprechend der wachsenden Fraktion an HPV-negativen G1-Phase-Zellen. Insgesamt zeigen HPV-positive Zelllinien mit steigender Dosis einen verstärkten G2-Arrest, der länger andauert als bei HPV-negativen Zelllinien.

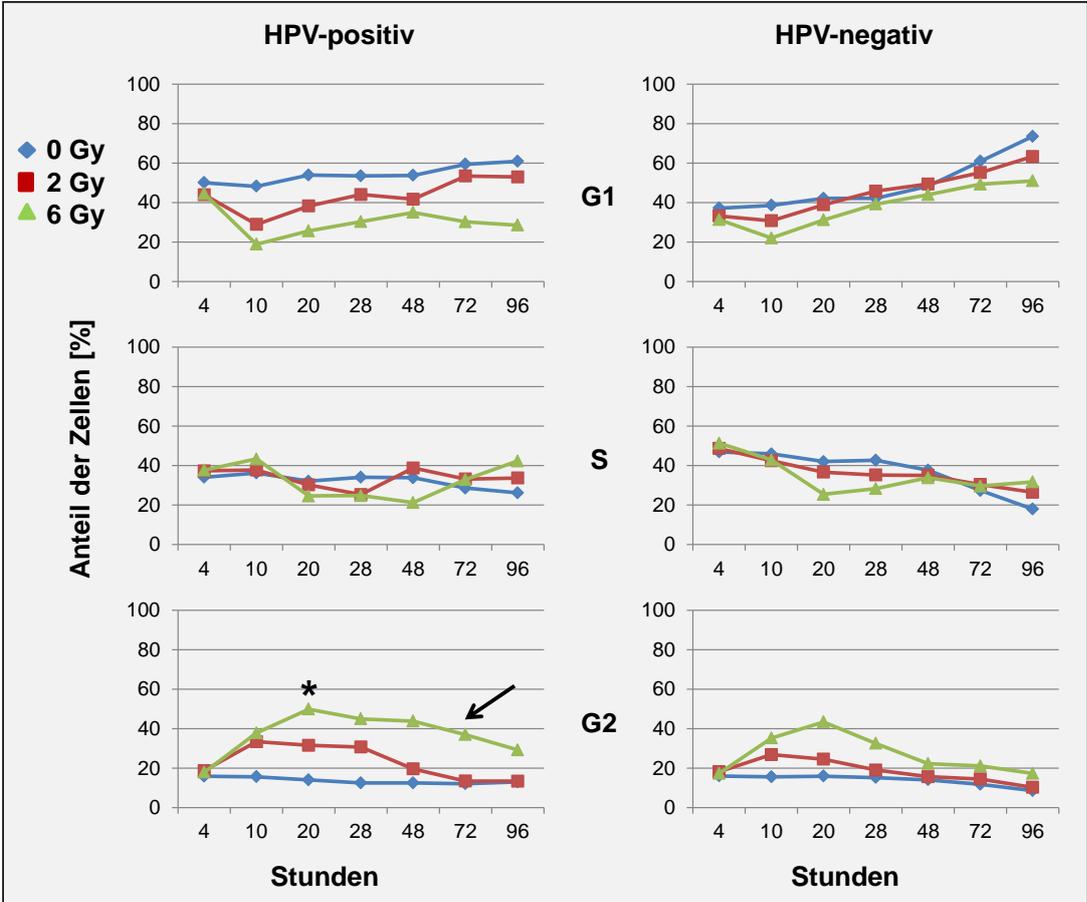


Abbildung 8: Prozentuale Häufigkeits-Verteilung der DNA-Gehalte bestrahlter Zellen in den Zellzyklus-Phasen

Der DNA-Gehalt HPV-positiver (UM-SCC47, UPCI:SCC152 links) und HPV-negativer (UD-SCC1, UM-SCC6, UM-SCC11b, UT-SCC33 rechts) Zellen in den Zellzyklus-Phasen G1, S und G2 wurde durchflusszytometrisch nach Bestrahlung bestimmt und die Mittelwerte aufgetragen. HPV-positive Zellen arretieren mit steigender Strahlenintensität häufiger (*) und zeitlich länger (Pfeil) in der G2-Phase.

Die prozentuale Häufigkeitsverteilung der DNA-Gehalte lässt Zellen mit DNA-Fragmenten erkennen, die in der Zellzyklus-Analyse als SubG1-Phase auftreten (Abbildung 9) (Arenz et al. 2014). Diese Fraktion nimmt bei den HPV-negativen Zelllinien 28h nach Bestrahlung und bei den HPV-positiven Zelllinien erst 48h nach Bestrahlung dosisabhängig zu. Eine Dosis von 6Gy bewirkt dabei häufiger in den HPV-positiven Zelllinien eine Akkumulation von Zellen mit DNA-Fragmenten als bei den HPV-negativen Zelllinien.

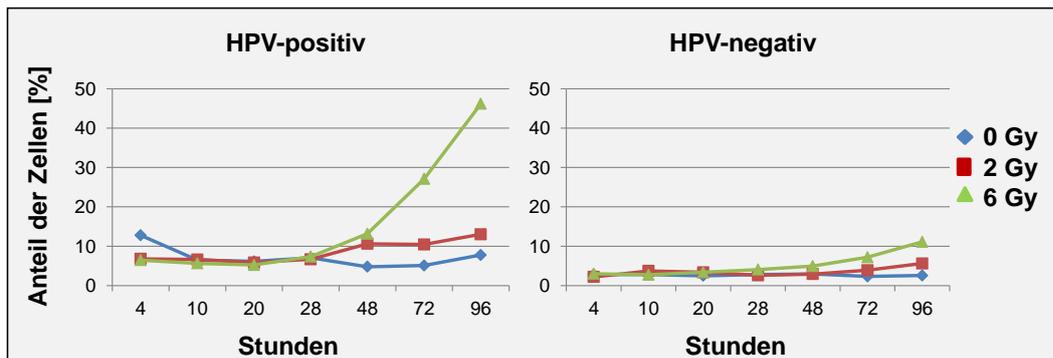


Abbildung 9: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Zellen mit DNA-Fragmenten nach Bestrahlung (SubG1-Phase)

Der DNA-Gehalt HPV-positiver (UM-SCC47, UPCI:SCC152 links) und HPV-negativer Zellen (UD-SCC1, UM-SCC6, UM-SCC11b, UT-SCC33 rechts) wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Mittelwerte der SubG1-Fractionen mit DNA-Fragmenten aufgetragen. Mit steigender Strahlendosis enthalten HPV-positive Zellen vermehrt DNA-Fragmente.

3.4 Proteinexpressions-Änderung nach Bestrahlung

Die molekularen Ursachen der verstärkten Strahlensensitivität HPV-assoziiierter Tumorzelllinien sind weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund sollten molekulare Marker identifiziert werden, die nach Bestrahlung in HPV-positiven und -negativen Zellen verändert reguliert sind. Dazu wurden die HPV-negativen Zelllinien UD-SCC1, UM-SCC6, UM-SCC11b, UT-SCC33, sowie die HPV-positiven Zelllinien UM-SCC47, UM-SCC104, VU-147T, UPCI:SCC152 mit 6Gy bestrahlt, pelletiert, die Proteine isoliert, Gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und über Antikörper-Färbung sichtbar gemacht.

3.4.1 Proteinexpression von p16^{INK4A} nach Bestrahlung

Der Tumorsuppressor p16^{INK4A} gilt klinisch als molekularer Marker für eine aktive HPV-Infektion (Klussmann et al. 2003). Dabei wird das virale Onkoprotein E7 verstärkt exprimiert und markiert das Retinoblastom-Protein (Rb), ein p16-Regulator-Protein, zum Abbau, woraufhin das p16-Protein akkumuliert. Alle untersuchten HPV-positiven

Zelllinien weisen ein p16-Proteinsignal auf, die HPV-negativen Zelllinien dagegen nicht (Abbildung 10). Die Exposition mit ionisierender Strahlung hatte in den hier durchgeführten Experimenten keinen sichtbaren Effekt auf die Expression. Somit bestätigt die p16-Proteinexpression lediglich den bestehenden HPV-Status der Zelllinien.

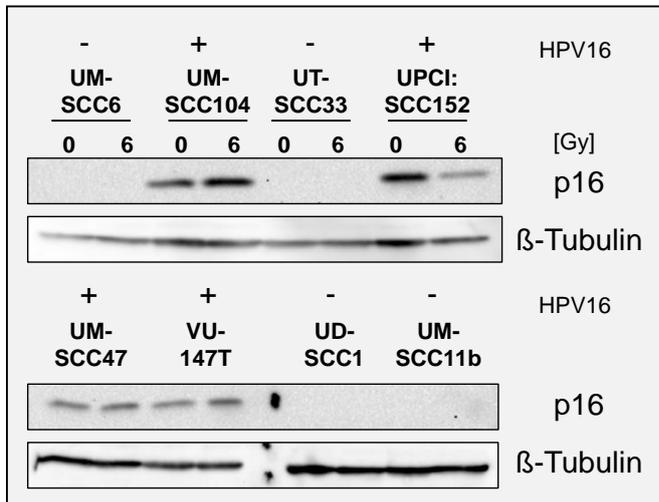


Abbildung 10: p16^{INK4A}-Protein-Expression in vier HPV-positiven und vier HPV-negativen Zelllinien 24h nach Bestrahlung mit 6Gy

Immunoblot von Gesamt-Zellextrakten der HPV-positiven Zelllinien UM-SCC104, UPCI-SCC152, UM-SCC47 und VU-147T und der HPV-negativen Zelllinien UM-SCC6, UT-SCC33, UD-SCC1 und UM-SCC11b. Die Proben wurden 24h nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 6Gy genommen. Die p16-Protein-Expression der bestrahlten Zellen wurde mit der der unbestrahlten Zellen (0Gy) verglichen. Die HPV-positiven Zelllinien zeigen unabhängig von der Bestrahlung ein p16-Protein-Signal, die HPV-negativen Zelllinien nicht. Als Lade-Kontrolle diente β-Tubulin.

3.4.2 Proteinexpression von Retinoblastom nach Bestrahlung

Das HPV16-Onkoprotein E7 bindet an den Tumorsuppressor Rb (Dyson et al. 1989), und bewirkt über Ubiquitin-vermittelte Degradation so den Abbau der Rb-Proteine (Boyer et al. 1996). Die HPV-positiven Zelllinien zeigen 24h nach Bestrahlung tendenziell ein stärkeres Proteinsignal als die unbestrahlten Kontrollen (Abbildung 11). Die HPV-negativen Zelllinien zeigen ähnliche Proteinmengen ohne und mit Bestrahlung.

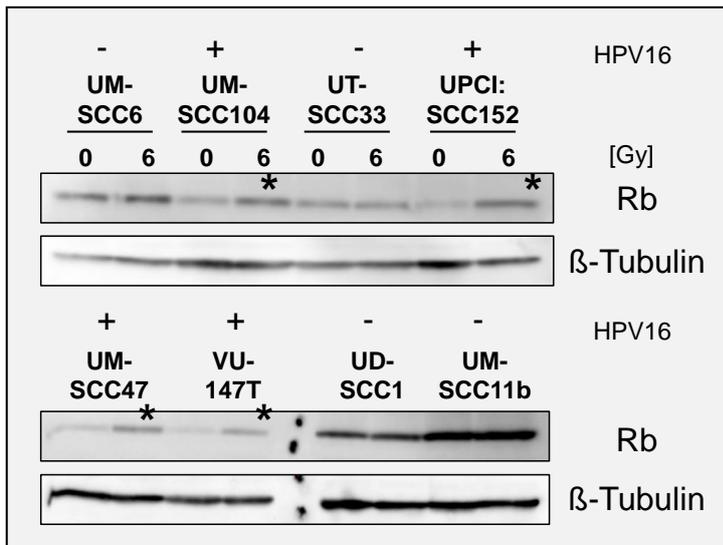


Abbildung 11: Rb-Protein-Expression in vier HPV-positiven und vier HPV-negativen Zelllinien 24h nach Bestrahlung mit 6Gy

Immunoblot von Gesamt-Zellextrakten der HPV-positiven Zelllinien UM-SCC104, UPCI:SCC152, UM-SCC47, VU-147T und der HPV-negativen Zelllinien UM-SCC6, UT-SCC33, UD-SCC1 und UM-SCC11b. Die Proben wurden 24h nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 6Gy genommen. Die Rb-Protein-Expression der bestrahlten Zellen wurde mit der der unbestrahlten Zellen (0Gy) verglichen. Die HPV-positiven Zelllinien zeigen nach Bestrahlung ein verstärktes Rb-Protein-Signal (*). Als Lade-Kontrolle diente β -Tubulin.

Die Rb-Proteinexpression gibt Aufschluss über die Zellzyklus-Progression nach DNA-Schaden, wobei der G1-Arrest in E7-exprimierenden Zellen ausbleibt (Slebos et al. 1994), was vermutlich mit verminderten Rb-Protein-Mengen zusammenhängt (Lindel et al. 2012). Um einen möglichen Bestrahlungseffekt auf die Rb-Protein-Expression genauer zu untersuchen wurden anschließend frühe Zeitpunkte von 30min bis 6h nach Bestrahlung betrachtet (Abbildung 12). Die Rb-Protein-Expression wird in der HPV-positiven Zelllinie UM-SCC47 durch Bestrahlung mit 6Gy induziert, wenngleich kein kontinuierlicher Anstieg zu verzeichnen ist. Die anderen drei HPV-positiven Zelllinien zeigen keine Veränderung des Rb-Signals nach Bestrahlung in dieser frühen Phase. Die Western Blots der HPV-negativen Zelllinien weisen ebenfalls keine kontinuierliche Induktion nach Bestrahlung auf, wobei die Protein-Signale der Zelllinien UM-SCC11b und UM-SCC47 auffallend ähnlich sind.

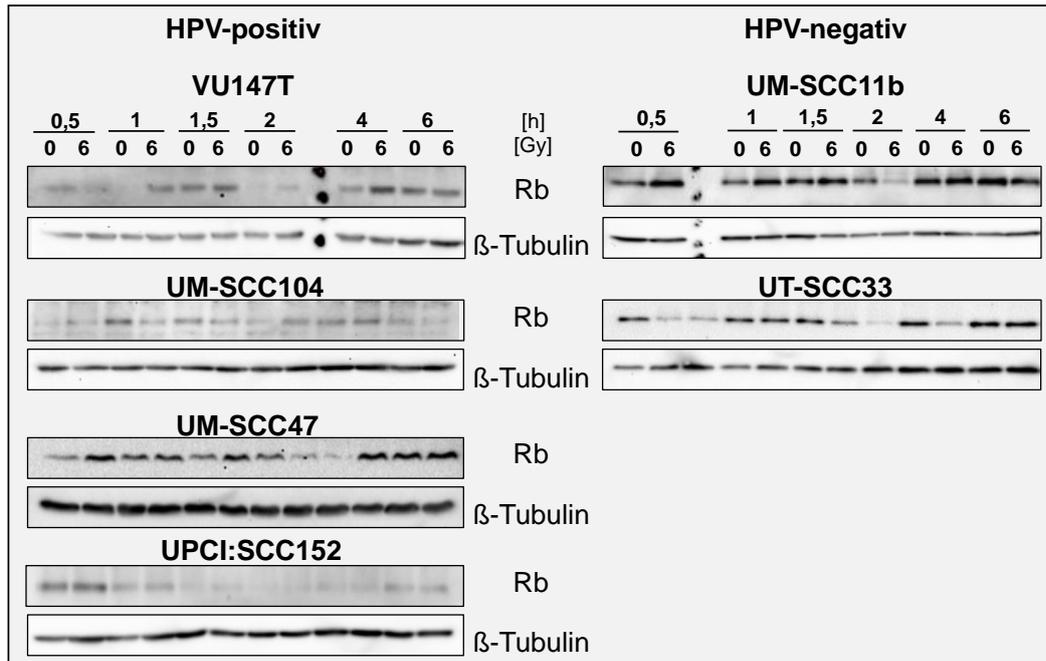


Abbildung 12: Rb-Protein-Expression in vier HPV-positiven und zwei HPV-negativen Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 6Gy

Immunoblot von Gesamt-Zellextrakten der HPV-positiven Zelllinien VU-147T, UM-SCC104, UM-SCC47, UPCI:SCC152 und der HPV-negativen Zelllinien UM-SCC11b und UT-SCC33. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 4h und 6h nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 6Gy genommen. Die Protein-Expression von Retinoblastom (Rb) in den bestrahlten Zellen wurde mit der der unbestrahlten Zellen (0Gy) verglichen. Die Rb-Protein-Expression wird nur in den Zelllinien UM-SCC47 und UM-SCC11b nach Bestrahlung induziert, alle anderen Zelllinien zeigen keine Expressionsunterschiede. Als Lade-Kontrolle diente β -Tubulin.

Im Laufe des Zellzyklus wird das Phosphoprotein Rb posttranslational modifiziert (Buchkovich et al. 1989), was sich anhand von verschiedenen großen Banden im Western Blot nachweisen lässt (Brugarolas et al. 1999). So ist das hyperphosphorylierte Rb (pRbp), das die aktive Molekülform darstellt, wegen vieler Phosphat-Reste größer und läuft langsamer als das inaktive hypophosphorylierte (pRb) Protein. Für eine höhere Auflösung der Rb-Protein-Banden wurden ausgewählte Protein-Lysate mit längeren SDS-Gelen analysiert und ein anderer Puffer (s. 2.6.7.1) zur Protein-Isolation verwendet. Bestrahlung bewirkt bei der HPV-positiven Zelllinie VU-147T 24h nach 6Gy eine stärker ausgeprägte obere pRbp-Bande im Vergleich zur Kontrolle, Rb wird folglich phosphoryliert und aktiviert (Abbildung 13). Die HPV-positive Zelllinie UM-SCC47 zeigt 24h nach 6Gy innerhalb der drei pRbp-Banden eine stärker ausgeprägte mittlere Bande im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollprobe, Rb wird hier

folglich ebenfalls aktiviert. Da verschiedene posttranslationale Phosphat-Modifikationen von verschiedenen Funktionen des Rb-Proteins zeugen (Buchkovich et al. 1989), lassen die verschieden starken pRbp-Banden auf unterschiedliche Rb-Funktionen in den beiden HPV-positiven Zelllinien schließen. In der Zelllinie UM-SCC11b führt die Bestrahlung keine Änderung des Phosphorylierungsgrades herbei, Rb wird somit nicht aktiviert.

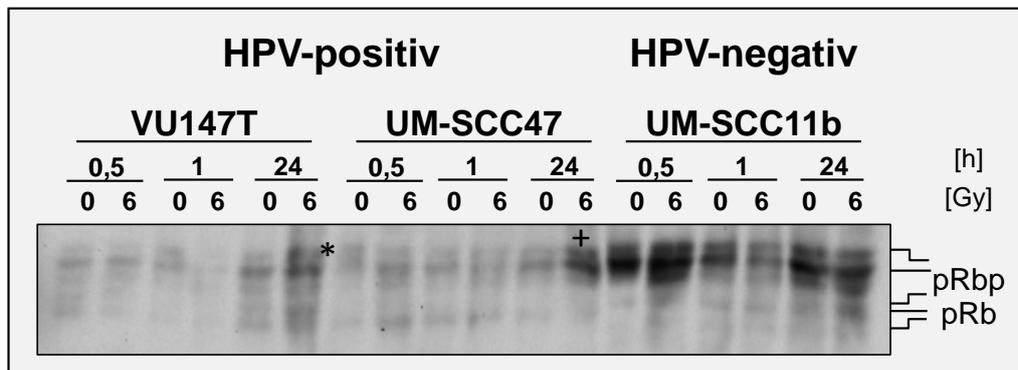


Abbildung 13: Protein-Expression von hyper- (pRbp) und hypo-phosphoryliertem Rb (pRb) in zwei HPV-positiven und einer HPV-negativen Zelllinie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 6Gy

Immunoblot von Gesamt-Zellextrakten der HPV-positiven Zelllinien VU-147T und UM-SCC47, sowie der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC11b. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten 0,5h, 1h, 1,5h und 24h nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 6Gy genommen. Die Rb-Protein-Expression der bestrahlten Zellen wurde mit der der unbestrahlten Zellen (0Gy) verglichen. Durch ein längeres Gel werden einzelne Rb-Banden erkennbar. Die HPV-positive Zelllinie VU-147T enthält 24h nach 6Gy mehr pRbp (*), ebenso UM-SCC47 (+), die HPV-negative Zelllinie UM-SCC11b zeigt keinen Unterschied. Als Lade-Kontrolle diente β -Tubulin. pRb: hypophosphoryliertes Rb; pRbp: hyperphosphoryliertes Rb (n=1)

3.4.3 Proteinexpression von p53 und phospho p53 (Ser15) nach Bestrahlung

Der Tumorsuppressor p53 ist einer der wichtigsten Faktoren der zellulären Strahlenantwort und wird nach strahleninduziertem DNA-Schaden durch Phosphorylierung am Serin 15 aktiviert (Banin et al. 1998). In HPV-assoziierten Zellen wird das p53-Protein vom viralen Onkoprotein E6 zum Abbau markiert (Scheffner et al. 1990; Werness et al. 1990), jedoch ist die Beteiligung von HPV an der Strahlensensitivität HPV-assoziiierter Tumoren umstritten. Daher wurde die Expression des gesamten, zellulären p53 und seiner aktivierten Form (phospho p53) nach Bestrahlung in HPV-positiven und -negativen Zelllinien untersucht (Abbildung 14). Unter den HPV-positiven Zelllinien weist 24h nach Bestrahlung nur VU-147T ein schwaches p53-Signal auf. Alle anderen HPV-positiven Zelllinien lassen kein bzw. ein

gerade noch nachweisbares Protein-Signal erkennen, die Bestrahlung hat also eher keinen Einfluss auf die p53-Proteinexpression. Unter den HPV-negativen Zelllinien zeigen nur UM-SCC11b und UT-SCC33 ein p53-Protein-Signal. Die anderen HPV-negativen Zelllinien weisen kein bzw. ein gerade noch nachweisbares Protein-Signal auf. Auch hier hat die Bestrahlung möglicherweise keinerlei Einfluss auf die Proteinexpression.

Die Proteinexpression des aktivierten, phosphorylierten p53 an der Stelle Serin15 zeigt nur bei der HPV-positiven Zelllinien VU-147T ein sehr schwaches Protein-Signal nahe der Nachweisgrenze. Die HPV-negativen Zelllinien UM-SCC11b und UT-SCC33 weisen eine klar erkennbare Aktivierung nach Bestrahlung auf, die anderen HPV-negativen Zelllinien nicht.

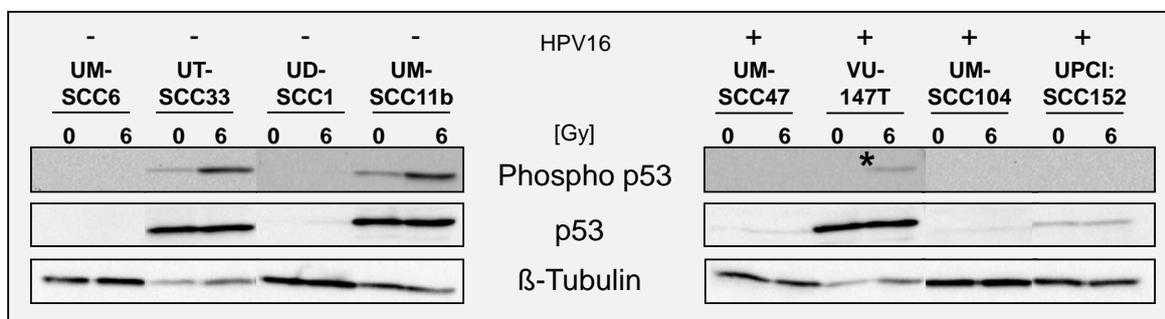


Abbildung 14: Protein-Expression von p53 und phosphoryliertem p53 an Serin15 in vier HPV-negativen und vier HPV-positiven Zelllinien 24h nach Bestrahlung mit 6Gy

Immunoblot von Gesamt-Zellextrakten der HPV-negativen Zelllinien UM-SCC6, UT-SCC33, UD-SCC1, UM-SCC11 und der HPV-positiven Zelllinien UM-SCC47, VU-147T, UM-SCC104 und UPCI:SCC152. Die Proben wurden 24h nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 6Gy genommen. Die Proteinexpression der bestrahlten Zellen wurde mit der der unbestrahlten Zellen (0Gy) verglichen. Die HPV-negativen Zelllinien UT-SCC33 und UM-SCC11b, sowie die HPV-positiven VU-147T (*) zeigen ohne und mit Bestrahlung ein p53-Signal, und jeweils nach Bestrahlung eine verstärkte Phosphorylierung von p53. Als Lade-Kontrolle diente β-Tubulin.

Die strahleninduzierte Aktivierung von p53 findet bereits wenige Minuten nach Exposition mit ionisierender Strahlung statt (Shieh et al. 1997), weshalb die Proteinexpression nach Bestrahlung mit 6Gy anschließend noch zu früheren Zeitpunkten als 24h untersucht wurde. Abbildung 15 zeigt in der HPV-positiven Gruppe insgesamt keine Veränderung bei der p53-Proteinexpression zwischen 0,5h und 6h nach Bestrahlung mit 6Gy. Das p53-Signal erscheint in diesen Zelllinien als Doppelbande. Da die Zelllinie VU-147T sowohl ein WT-p53-Gen als auch mutiertes p53-Gen enthält (Rieckmann et al. 2013) werden möglicherweise beide p53-Formen im

Western Blot als p53-Protein detektiert. Bei der Zelllinie UM-SCC47 liegen möglicherweise unterschiedliche Phosphorylierungs-Zustände oder p53-Splice-Varianten vor. In den untersuchten HPV-negativen Zelllinien hat Exposition mit ionisierender Strahlung ebenfalls keinen Einfluss auf das p53-Proteinlevel.

Die aktive Form von p53 (phospho p53) ist sowohl in den HPV-positiven als auch HPV-negativen Zellen bereits 0,5h nach Bestrahlung durch eine erhöhte Proteinexpression nachweisbar (Arenz et al. 2014). Die Signalstärke nimmt bei den HPV-positiven, sowie der HPV-negativen Zelllinie UT-SCC33 über den gesamten Zeitraum hin ab, wohingegen die HPV-negative Zelllinie UM-SCC11b ähnliche Expressionsmengen bis 6h nach Bestrahlung aufweist.

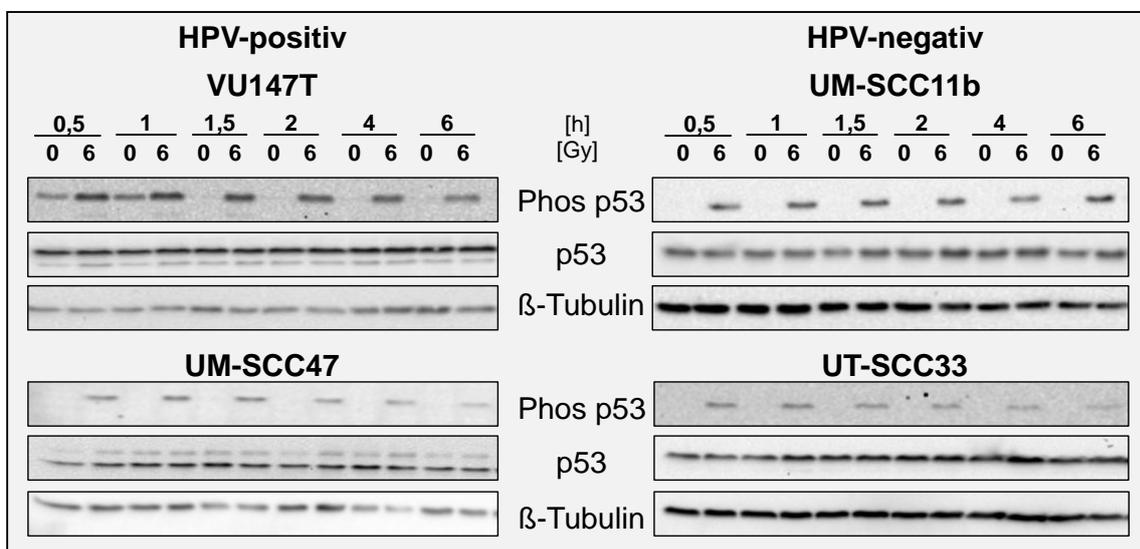


Abbildung 15: Protein-Expression von p53- und phospho- p53 in zwei HPV-positiven und zwei HPV-negativen Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 6Gy

Immunoblot von Gesamt-Zellextrakten der HPV-positiven Zelllinien VU-147T und UM-SCC47 sowie der HPV-negativen Zelllinien UM-SCC11b und UT-SCC33. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 4h und 6h nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 6Gy genommen. Die p53- und phospho p53-Proteinexpression der bestrahlten Zellen wurde mit der der unbestrahlten Zellen (0Gy) verglichen. Die Alle Zelllinien zeigen bereits 0,5h nach 6Gy ein phospho p53-Signal, das über die Zeit hin abnimmt und nur bei UM-SCC11b tendenziell unverändert bleibt. Als Lade-Kontrolle diente β-Tubulin.

3.5 qPCR: mRNA-Expression von viralen Onkogenen E6 und E7

Die Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 beeinflusst die zentralen Tumorregulatoren p53 und Rb. Um den Gehalt der viralen Proteine anhand der mRNA-Expression abschätzen zu können und gleichzeitig einen möglichen Einfluss ionisierender Strahlung auf die Expression dieser viralen Onkogene zu untersuchen

wurden bestrahlte und unbestrahlte HPV-positive Zellen mittels quantitativer *real time* PCR analysiert. Anhand der gemittelten CT-Werte sind bei den E6 und E7-Expressionsleveln nach Bestrahlung keine nennenswerten Unterschiede zu verzeichnen (Tabelle 3). In den untersuchten Zelllinien ist prinzipiell mehr E7- als E6-mRNA vorhanden mit Ausnahme der Zelllinie UM-SCC104, bei der vergleichbare Mengen E6- und E7-mRNA exprimiert werden.

Tabelle 3: mRNA-Expression von E6 und E7 in den HPV-positiven Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 6Gy

Die HPV-positiven Zelllinien VU-147T, UM-SCC47, UM-SCC104 und UPCI:SCC152 wurden 30min, 60min und 6h nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 6Gy genommen, mittels quantitativer *real time* PCR auf den mRNA-Gehalt der Onkogene E6 und E7 hin untersucht und mit dem mRNA-Gehalt unbestrahlter Zellen (0Gy) verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen CT-Werte. (n=1 bei UM-SCC104 und UPCI:SCC152).

CT-Werte (Mittelwerte)			93-VU-147T	UM-SCC47	UM-SCC104	UPCI:SCC152
E6	0 Gy		24,9	23,4	23,9	24,7
	6Gy	30min	25	23,6	24,3	24,3
		60min	24,9	23,9	23,9	24,1
		6h	25,1	24	24	24,6
E7	0 Gy		20,5	18,5	24	22,8
	6Gy	30min	21,1	18,6	24,3	22,7
		60min	20,9	18,8	24,2	22,3
		6h	20,8	19	24	22,8

Die relative Quantifizierung nach Livak und Schmittgen (2001) ergab, dass die prozentuale E6-mRNA-Expression in allen verwendeten Zelllinien 30min nach Bestrahlung mit 6Gy unterschiedlich ist und innerhalb 6h nach Bestrahlung in den Zelllinien UM-SCC47, UM-SCC104 und UPCI:SCC152 um 40% im Vergleich zum Kontrollwert reduziert ist (Abbildung 16). Die Zelllinie VU-147T weist dagegen eine Expressions-Zunahme um 40% auf. Die prozentuale E7-mRNA-Expression stellt sich 30min und 60min nach Bestrahlung im Vergleich zum Kontrollwert bei allen Zelllinien als reduziert dar. 6h nach 6Gy wird jedoch in der Zelllinie VU-147T 40% mehr E7-mRNA gebildet, wobei die E7-mRNA in den Zelllinien UM-SCC47, UM-SCC104 und UPCI:SCC152 um 40% reduziert exprimiert wird.

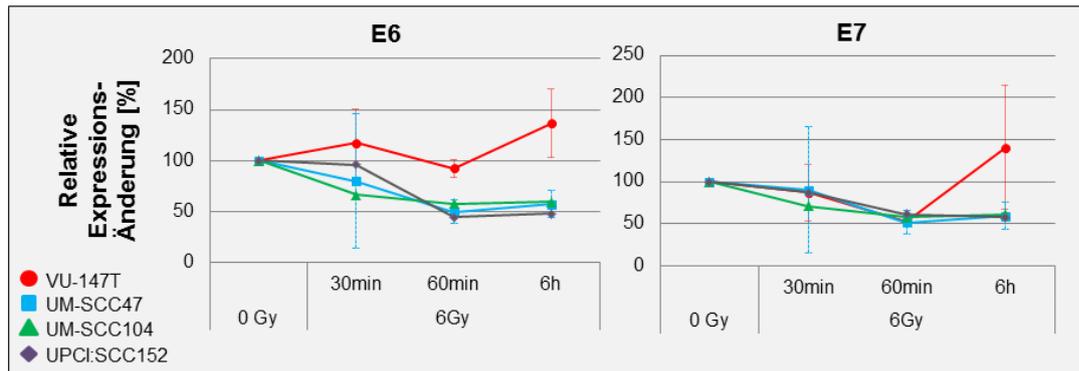


Abbildung 16: Relative E6- und E7-mRNA-Expressionsänderung nach Bestrahlung mit 6Gy

Mittels quantitativer *real time* PCR wurde die E6- und E7-mRNA-Expression in den HPV-positiven Zelllinien VU-147T, UM-SCC47, UM-SCC104 und UPCI:SCC152 zu den Zeitpunkten 30min, 60min, 6h nach Bestrahlung mit 6Gy festgestellt. Die mRNA-Expression der bestrahlten Zellen wurde auf die der unbestrahlten Zellen und die Expression des Referenzgens relativiert. Dargestellt ist die relative Expressionsänderung ($2^{-\Delta\Delta CT}$) der E6- und E7-mRNA nach Bestrahlung. E6 und E7 steigen bei VU-147T nach 6h an, in den anderen Zelllinien sinkt die Expression.

3.6 Sequenzierung der E6 und E7-Gen-Region der HPV-positiven Zelllinien

Sobald die virale DNA in das Wirts-Genom integriert gehen Teile der Virus-DNA verloren bzw. werden transkriptionell beeinträchtigt (Olthof et al. 2012). Aufgrund der detektierten p53- und Rb-Protein-Expression in den HPV-positiven Zelllinien (siehe Abschnitte 3.4.2 und 3.4.3) wurden die Sequenzen der E6- und E7-Gene experimentell überprüft. Isolierte Gesamt-DNA der HPV-positiven Zelllinien wurde dafür amplifiziert (siehe 2.4), im Institut für Pathologie des Uniklinikums Gießen sequenziert und die Basenfolgen der E6- und E7-Genregion auf Mutationen und Vollständigkeit mit der HPV16-Genomsequenz der NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*) verglichen. Da in dieser Datenbank derzeit zwei identische HPV16-Referenzsequenzen (NC_001526.2 (Kennedy et al. 1991) und K02718 (Seedorf et al. 1985)) zu finden sind, wurde für die Analyse die Sequenz mit der Identifikationsnummer NC_001526.2 verwendet. Ein Ausschnitt der vergleichenden Analyse zwischen dem sequenzierten Genbereich der Zelllinie UM-SCC47 und der HPV16-Referenzsequenz zeigt kurz hinter dem Start-Codon des E6-Gens (blauer Kasten, ATG) vier Basen-Austausche (rote Kästen, [Abbildung 17](#)): 1) Austausch von Thymin durch Cytosin, 2) Austausch von Guanin durch Thymin, 3) Austausch von Cytosin durch Guanin, 4) Austausch von Guanin durch Thymin. Diese Austausche

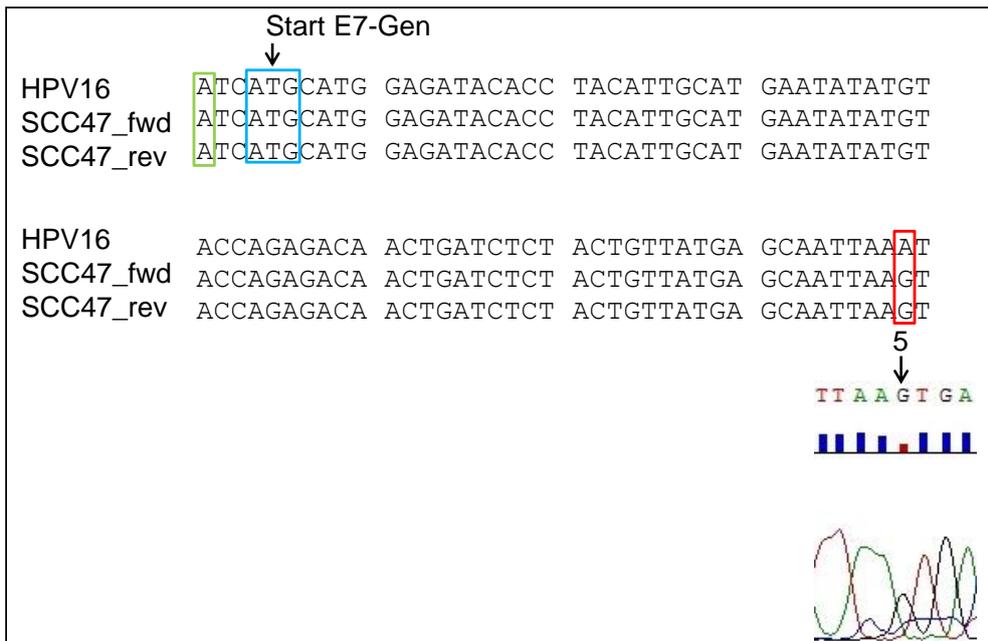


Abbildung 18: E7-Sequenzvergleich der Zelllinie UM-SCC47 mit der HPV16-Referenzsequenz

HPV16: Ausschnitt der HPV16-Referenzsequenz (NCBI Accession number: NC_001526.2, (Kennedy et al. 1991)), SCC47_fwd und _rev: Sequenzierte DNA von UM-SCC47 (Primer HPV16_E6_E7-Seq fwd und rev). Eine Abweichung in der E7-Basenfolge der Zelllinie von der Referenzsequenz ist rot eingerahmt (5), der Austausch ist auf ein technisches Problem zurückzuführen.

Basen-Substitutionen in der DNA-Sequenz können mitunter schwerwiegende Folgen für die Aminosäuresequenz der Proteine haben, wie beispielsweise *missense*-Mutationen (entstandenes Codon kodiert eine andere Aminosäure) oder *silent*-Mutationen (entstandenes Codon kodiert für die gleiche Aminosäure). Daher wurden die sequenzierten HPV16-Genbereiche der Zelllinien in ihre Aminosäuresequenz übersetzt und mit der Aminosäure-Sequenz des HPV16-Referenz-Genoms verglichen. Alle detektierten Punktmutationen in den untersuchten HPV16-Gen-Bereichen kodieren entweder für *missense*- oder *silent*- Mutationen (Tabelle 4). Die Zelllinie UM-SCC47 weist die meisten Basen-Austausche auf, die Zelllinien UM-SCC104 und UPCI:SCC152 tragen deutlich weniger Basen-Austausche. Die Zelllinie VU-147T enthält keinerlei Punktmutationen in den sequenzierten HPV-Genbereichen. Ob diese Mutationen die Funktionen der Onkoproteine E6 und E7 beeinträchtigen, kann hier nicht geklärt werden. Jedoch ist die in Abschnitt 3.4.3 gefundene verstärkte p53-Aktivierung der Zelllinie VU-147T wahrscheinlich nicht auf Gen-Mutationen in der E6-Gensequenz zurückzuführen.

Tabelle 4: Basensequenz-Analyse der untersuchten HPV-E6 und E7-Gen-Regionen und Konsequenz für die Aminosäure-Sequenz.

Zelllinie	E6-Region		E7-Region	
	Basenmutation	Aminosäure-Code	Basenmutation	Aminosäure-Code
UM-SCC47	Missense: T50: ATA =I	R17I	Missense: C707: TCC =S	F229S
	Missence: G61 und T63: GAT =D	Q21D	Missense: G713: CGT =R	L231R
	Missense: C105: CAA =Q	E35Q	Missense: G565: GTA =V	M184V
	Missense: G202 und A203: GGA =G	A68G	-	
	Missense: T253: TAT =Y	H84Y	-	
	Silent: C27: TTC =F	F	-	
	Silent: G203: GTG =V	V	-	
	Silent: G320: TTG =L	L	-	
	UM-SCC104	Missense: G268: GTG =V	L89V	-
UPCI:SCC152	Missense: G49: GGA =G	R17G	-	
	Missense: G277: GTG =V	L89V	-	
VU-147T	-		-	

Basenmutation: Mutierte Base ausgehend von Start-Codon (Fett kennzeichnet Substitution). Aminosäure-Code: Referenz-Aminosäure, Stelle in Protein-Sequenz, in HPV-Aminosäure-Sequenz der Zelllinie mutierte Aminosäure.

Es existieren Varianten des HPV16-Genoms, deren Basen-Austausche bekanntermaßen geographisch regional bedingt sind (Chan et al. 1992), zumal spezielle Bereiche des E6-Gens einem hohen Selektionsdruck zu unterliegen scheinen (Chen et al. 2005). Um zu überprüfen, ob es sich bei den vorliegenden Austauschen um bereits bekannte, regionale HPV16-Varianten handelt wurde in der NCBI-Datenbank nach übereinstimmenden HPV16-Sequenz-Bereichen mit den sequenzierten Basenfolgen der Zelllinien gesucht und die gefundenen HPV16-Gen-Bereiche verglichen. Ein repräsentativer Ausschnitt eines Sequenz-Vergleichs zeigt, dass die Basenfolge der Zelllinie UM-SCC47 eine Übereinstimmung mit der *African*

Type 2-Variante aufweist (Abbildung 19). Weiterhin treten konservierte Bereiche auf (rot), die offensichtlich in den meisten Varianten identisch sind, nicht jedoch mit der HPV16-Referenzsequenz (NC_001526.2). Die Basenfolgen *African Type 1*, *African Type 2*, *Asian-American* und *Amazonian* stellen Varianten des HPV16-Genoms dar, die als übereinstimmend mit der eingegebenen Sequenz der Zelllinie in der NCBI-Datenbank gefunden wurden.

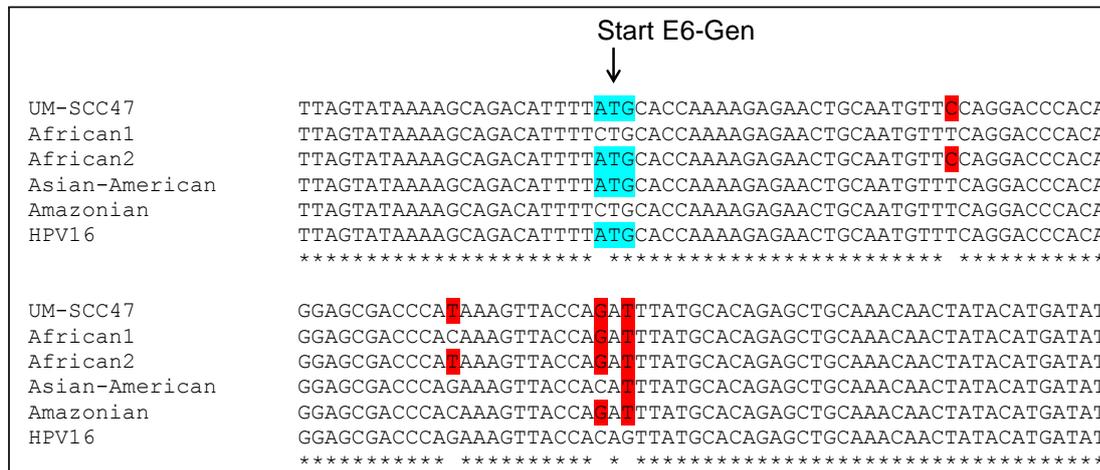


Abbildung 19: Sequenz-Vergleich von verschiedenen HPV16-Stämmen mit der Zelllinie UM-SCC47 und der HPV16-Referenzsequenz

UM-SCC47: Ausschnitt des Genbereichs um das Start-Codon des E6-Gens der Zelllinie.
 HPV16: Ausschnitt der HPV16-Referenzsequenz (NCBI Accession number: NC_001526.2, (Kennedy et al. 1991)). HPV16-Varianten der NCBI-Datenbank: *African Type 1* (*African1*), *African Type 2* (*African2*), *Asian-American* und *Amazonian*. Rot markiert sind übereinstimmende Basenaustausche zwischen Zelllinie und einzelnen HPV16-Varianten, die von der Referenzsequenz abweichen.

Unter allen getesteten Zelllinien zeigt der untersuchte HPV-Genabschnitt der Zelllinie VU-147T aufgrund keinerlei Basensubstitutionen die größte Übereinstimmung mit der HPV16-Referenzsequenz (Tabelle 5). Die Zelllinie UM-SCC47 beinhaltet eine veränderte Aminosäure in der HPV16-E6-Sequenz, die nicht mit der HPV16-Variante *African Type 2* übereinstimmt (Aminosäure G202). Alle anderen Aminosäure-Austausche bei der Zelllinie UM-SCC47 entsprechen den Aminosäure-Austauschen der HPV16-Variante *African Type 2*. Zusammenfassend beinhalten alle untersuchten HPV-positiven Zelllinien mit Ausnahme der Zelllinie VU-147T bereits bekannte HPV16-Varianten, die nicht mit der HPV16-Referenzsequenz übereinstimmen. Wenngleich verschiedene HPV16-Varianten unterschiedliche p53-Degradations-Aktivität besitzen (Stöppler et al. 1996; Mesplède et al. 2012) ist dennoch keine Aussage über die

Funktionalität der in den Zelllinien gefundenen, viralen HPV16-Gen-Varianten bei der p53-Degradation möglich.

Tabelle 5: Zusammenfassung des NCBI-Datenbank-Vergleichs mit den sequenzierten HPV-positiven Zelllinien

Die den Basensubstitutionen der HPV16-Gen-Bereiche entsprechenden Aminosäure-Sequenz-Mutationen stimmen mit bekannten HPV16-Gen-Varianten überein.

Zelllinie	Identifizierte Varianten	NCBI-Identifikations-Nummer	Mutationen entsprechen HPV16 Variante
UM-SCC47	Asian-American Variant	AF402678.1	African Type 2
	African Type 1	AF472508.1	(außer G202 (Missense A68G);
	African Type 2	AF472509.1	African Type 2 und Referenz NC_001526 haben A68)
	Amazonian	HM057182.1	
UM-SCC104	East Asian Type	AF534061.1	European German 131 Type,
	integrated SiHa Variant	AF001599.1	HPV16 variant,
	HPV16 variant	U89348	integrated SiHa Variant
	European German 131Type	AF536179	
UPCI:SCC152	East Asian Type	AF534061.1	European German 131 Type,
	integrated SiHa Variant	AF001599.1	HPV16 variant
	HPV16 Variant	U89348.1	
	European German 131Type	AF536179	
	Asian American Variant	AF402678.1	
VU-147T	East Asian Type	AF534061.1	(keine Mutationen, entspricht Referenz NC_001526)
	integrated SiHa variant	AF001599.1	
	HPV16 variant	U89348	
	European German 131Type	AF536179.1	

3.7 p53 Signaling Pathway RT-PCR Array

Das Tumorsuppressor-Protein p53 übt durch seine Eigenschaft als Transkriptionsfaktor entscheidenden Einfluss auf Zell-Proliferation und Apoptose nach strahleninduziertem DNA-Schaden aus. Das HPV-E6-Protein sorgt für eine Degradation von p53, weshalb postuliert wurde, dass die p53-vermittelte Strahlenantwort in Virus-infizierten Zellen verändert ist (Gupta et al. 2009; Kimple et al. 2013). Um diese These zu untersuchen wurde die Expression p53-abhängiger Gene nach strahleninduzierten DNA-Schaden

bei HPV-assoziierten Tumorzelllinien untersucht und mit nicht HPV-assoziierten verglichen. Hierzu wurde mRNA der HPV-positiven Zelllinien UM-SCC47, UPCI:SCC152 und VU-147T, sowie der HPV-negativen Zelllinien UM-SCC11b und UT-SCC33 4h nach Bestrahlung mit 6Gy isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe von *Human p53 Signaling Pathway* RT2 Profiler PCR Arrays wurde die Expressionsänderung ausgewählter mRNAs von Komponenten des p53-Signalwegs analysiert. Die CT-Werte der bestrahlten Proben wurden rechnerisch auf die Werte von nicht regulierten Haushaltsgenen normiert und auf die Werte der Kontroll-Proben relativiert (siehe Abschnitt 2.11) (Livak und Schmittgen 2001). Dieser Wert ($2^{-\Delta\Delta CT}$) bezeichnet die Expressionsänderung und seine Abweichung vom Faktor 1 wurde als „verändert exprimiert“ definiert, wobei Werte unter 0,66 als vermindert und über 1,5 als verstärkt exprimiert betrachtet werden.

Die meisten der untersuchten Gene werden zellspezifisch reguliert (Tabelle 6), das heißt ihre CT-Werte verändern sich nach Bestrahlung unabhängig vom HPV-Status der Zelllinie und teilweise nur geringfügig (siehe *Fold Change*). Lediglich drei Gene waren in mindestens drei von fünf Zelllinien durch Bestrahlung verändert exprimiert. 4h nach Bestrahlung mit 6Gy war in der Gruppe der HPV-positiven Zelllinien das Gen BIRC5 (Baculoviral IAP repeat containing 5) (Tabelle 6, blauer Kasten) herunterreguliert. Es kodiert für das Anti-Apoptotische Protein Survivin, das nach p53-Induktion durch Bestrahlung herunterreguliert wird (Stauber et al. 2007; Hoffman et al. 2002). Dieses Ergebnis stimmt mit der gefundenen Zellzyklus-Progression und der verstärkten SubG1-Phase der HPV-positiven Zelllinien überein (Abbildung 9). Im Gegensatz dazu konnten Preuss et al. (2008) zeigen, dass eine Akkumulation von Survivin-Protein mit einer HPV-unabhängigen Karzinogenese korreliert, was der hier detektierten, verminderten mRNA-Expression des BIRC5-Gens in HPV-positiven Zellen entspricht.

Das Gen CCNB1 (Cyclin B1) (Tabelle 6, roter Kasten) ist in allen untersuchten Zelllinien durch Bestrahlung vermindert exprimiert. Es kodiert für das Protein Cyclin B1, welches für die Zellzyklus-Progression während der späten G2- und M-Phase mitverantwortlich ist und durch seine onkogene Eigenschaft in den meisten humanen Tumoren überexprimiert wird. Zwar fanden Santana et al. (2002) in HPV18-positiven Zervix-Karzinomzellen (HeLa) nach Transfektion mit onkogenem H-Ras-Protein eine gesteigerte, p53-unabhängige Cyclin B1-mRNA-Expression, aber Innocente et al. (1999) detektierten eine durch p53 verminderte CCNB1-Promotor-Aktivität und die verminderte Expression von CCNB1. Die Herunterregulation der CCNB1-Genexpression entspricht somit der Zellzyklus-Progression der HPV-positiven Zellen,

jedoch nicht dem gefundenen strahleninduzierten G1-Arrest der HPV-negativen Zelllinien, die mutiertes p53 exprimieren.

Das Gen CDC25C (*Cell division Cycle 25 homolog C*) (Tabelle 6, grüner Kasten) ist in den zwei HPV-positiven Zelllinien UM-SCC47 und UPCI:SCC152 und der HPV-negativen UT-SCC33 nach Bestrahlung vermindert exprimiert. Es kodiert für eine Phosphatase, die nach strahleninduzierter Induktion von p53 runterreguliert wird, um den G2-M-Arrest einzuleiten. Durch sequenzspezifische p53-Bindung an die CDC25C-Promotor-Region wird die Repression von CDC25C herbeigeführt (St Clair et al. 2004). Die verminderten mRNA-Expressionen der HPV-positiven Zelllinien entsprechen deren G2-Arrest nach Bestrahlung.

Tabelle 6: Gen-Expressions-Änderung auf p53 Signaling Array 4h nach Bestrahlung mit 6Gy in den HPV-negativen und -positiven Zelllinien

Genexpression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) der HPV-negativen UM-SCC11b und UT-SCC33, sowie der HPV-positiven UM-SCC47, UPCI:SCC152 und VU-147T 4h nach Bestrahlung mit 6Gy nach qPCR mit dem p53 Signaling Array.

Gen	Name	Fold Change				
		HPV-negativ		HPV-positiv		
		UM-SCC11b	UT-SCC33	UM-SCC47	UPCI:SCC152	VU-147T
BCL2A1	BCL2-related protein A1	1,02	1,03	0,62	-	-
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	0,73	0,7	0,57	0,56	0,6
CCNB1	Cyclin B1	0,62	0,57	0,63	0,4	0,62
CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (<i>S. pombe</i>)	0,73	0,61	0,66	0,53	0,82
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	0,86	1,5	1,12	1,12	0,96
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	0,7	0,71	0,61	0,54	0,86
RPRM	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	1,45	1,85	-	1,18	1,13
TNF	Tumor necrosis factor	0,95	-	0,94	1,09	0,46
TP73	Tumor protein p73	1,14	1,59	0,71	1,2	0,83
WT1	Wilms tumor 1	1,09	-	0,84	0,43	0,92

Fold Change bezeichnet die Änderung der CT-Werte nach Relativierung auf die unbestrahlte Kontrolle und die Haushaltsgene. Ein Wert von 1,00 entspricht keiner Veränderung, <1 einer Runterregulation, >1 einer Hochregulation. „-“: Gen wird nicht exprimiert. Fett gedruckt: veränderte Gen-Expression bei einem „Cut off“ von <0,66 und >1,5. Bunte Kästen: veränderte Expression in mindestens drei der untersuchten Zelllinien.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der p53 Signaling Array Analyse, dass nach Bestrahlung sechs Gene (BCL2A1, FAS, PRC1, RPRM, TNF, TP73) in HPV-positiven

Zelllinien anders als nach Bestrahlung erwartet reguliert werden, dagegen sind es nur vier Gene (BCL2A1, BIRC5, PRC1, TNF) in den HPV-negativen Zelllinien (Tabelle 7). Diese Gene haben im weitesten Sinne eine Apoptose-induzierende Funktion. Sie werden in den hier untersuchten HPV-positiven Zelllinien nach Bestrahlung vermindert, in den HPV-negativen Zelllinien jedoch nicht vermindert exprimiert.

Tabelle 7: Eigenschaften und Funktionen der Gene mit stark veränderter Expression in der p53 Signaling Array Analyse der HPV-negativen und -positiven Zelllinien.

Gen	Protein	Merkmale	Funktionen	erwartete Änderung nach Bestrahlung	mRNA-Expression in bestrahlten Zelllinien	
					HPV-positiv	HPV-negativ
BCL2A1	BCL2-related protein A1	B-Zell-Lymphom-Protein-Familie	Anti- und Pro-Apoptotischer Regulator, reduziert Cytochrom C-Freisetzung, blockt Caspase-Aktivierung, hochreguliert durch extrazelluläre Signale (TNF, Zytokine, etc.)	hochreguliert	wird weniger/nicht exprimiert	gleichbleibend
BIRC5	Survivin	Protein enthält 1 Baculovirus IAP Repeat	Fördert Proliferation und verhindert Apoptose, Beteiligung bei Chromosom-Anlagerung und -Trennung; inhibiert Caspase 9	reprimiert	wird weniger	gleichbleibend
CCNB1	Cyclin B1	Heterodimer aus Cdc2 und Cyclin B1	Fördert Proliferation, wird zwischen G2-M-Phase exprimiert	reprimiert	wird weniger	wird weniger
CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C	Tyrosin-Phosphatase	Induziert Mitose durch Dephosphorylierung von Cyclin B1-Cdc2-Komplex	degradiert	wird weniger	wird weniger
FAS	Fas-Rezeptor	TNF Receptor, Transmembran-Domäne	Induziert Apoptose nach Fas-Ligand-Bindung	hochreguliert	gleichbleibend	gleichbleibend/wird mehr
PRC1	Proteinregulator der Zytokinese 1	Phosphoprotein mit 10 Untereinheiten	Substrat verschiedener CDKs, bewirkt Histon-Ubiquitylierung für Gen-Silencing	akkumuliert	wird weniger	wird weniger
RPRM	Reprimo	G2 Arrest Mediator, integrales Membranprotein	Induktion von G2-M-Arrest, Inhibierung der CDK1-Aktivität, bewirkt Translokation des CDC2-CyclB1 Komplexes	hochreguliert	gleichbleibend	wird mehr
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor	Zytokin, löslich, Trimer	regelt Aktivität verschiedener Immunzellen, löst Apoptose oder Proliferation aus	hochreguliert	gleichbleibend/wird weniger	gleichbleibend
TP73	Tumor Protein p73	Strukturverwand mit p53	Tumorsuppressor oder Onkoprotein, ähnliche Funktion wie p53 (proapoptische Funktion beschrieben)	hochreguliert	wird weniger	wird mehr
WT1	Wilms tumor 1	Transkriptionsfaktor, u. a. für Bcl2	Tumorsuppressor oder Onkoprotein, stabilisiert p53 und verhindert p53-abhängige Apoptose	gleichbleibend	gleichbleibend/wird weniger	gleichbleibend

4 Diskussion

Obwohl zwei abgrenzbare Entitäten bei HNSCC-Tumoren vorliegen (konventionelle und HPV-getriebene Karzinogenese) besteht für beide Patientengruppen die gängige Therapie aus Operation und/oder Radiotherapie ohne Unterschied. Es wird also keine zielgerichtete Therapie durchgeführt. Erhalten Patienten mit HNSCC-Tumoren eine Strahlentherapie, so ist die Prognose bei HPV-Assoziation erheblich besser als bei HNSCC-Tumoren, die durch konventionelle Noxen hervorgerufen wurden (Ang et al. 2010). Es ergibt sich die Frage, ob die HPV-getriebene Karzinogenese bei HNSCC ein prädikativer Faktor für die Strahlentherapie ist. Andere biologische Effekte, wie die Aktivierung des Immunsystems (Tobita et al. 2010), könnten gleichsam für die gute Prognose der Patienten verantwortlich sein.

Es liegen aktuell nur wenige experimentelle Studien zur Strahlensensitivität von HNSCC-Tumorzellen vor und die Ergebnisse sind widersprüchlich. So fanden Spanos et al. (2009), dass HPV-assoziierte HNSCC-Zelllinien radioresistenter seien, Nagel et al. (2013) konnten keinen Unterschied in der Strahlenresistenz HPV-positiver und HPV-negativer Zelllinien feststellen. Weiterhin existieren derzeit drei Veröffentlichungen, die eine erhöhte Strahlensensitivität HPV-positiver HNSCC-Zelllinien nachweisen konnten (Rieckmann et al. 2013; Gupta et al. 2009; Kimple et al. 2013). Die Aufdeckung einer möglichen erhöhten Strahlensensitivität HPV-assoziiierter HNSCC-Zelllinien *in vitro* war Ziel dieser Arbeit.

4.1 Einfluss ionisierender Strahlung auf HNSCC-Tumorzelllinien

4.1.1 Strahlenempfindlichkeit

Untersuchungen zum klonogenen Überleben HPV-positiver und -negativer Zelllinien zeigten, dass die HPV-positiven Zelllinien ein signifikant schlechteres Überleben nach Bestrahlung mit 2Gy als die HPV-negativen Zelllinien aufwiesen. Dies entspricht dem berichteten guten Gesamt-Überleben von Patienten mit HPV-assoziierten HNSCC nach Radiotherapie (Gillison et al. 2000). Gupta et al. (2009) und Rieckmann et al. (2013) fanden ebenfalls eine verstärkte Strahlenempfindlichkeit bei HPV-assoziierten HNSCC-Tumorzellen. In einer aktuellen Studie wurden alle derzeit verfügbaren HPV-assoziierten Tumorzelllinien auf intrinsische Strahlensensitivität getestet (Kimple et al. 2013). Bei Zellen mit HPV-getriebener Karzinogenese wurde hier gleichfalls eine signifikant erhöhte Strahlensensitivität festgestellt. Diese Studien untermauern somit

das Ergebnis der hier gefundenen erhöhten Radiosensitivität HPV-assoziiierter HNSCC-Tumorzelllinien.

4.1.2 Zellzyklus

Die hohe Strahlensensitivität HPV-positiver Tumorzellen kann möglicherweise durch eine veränderte Zellzyklus-Progression nach Exposition mit ionisierender Strahlung erklärt werden. Gesunde Zellen reagieren auf Bestrahlung mit einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase, der die Reparatur geschädigter DNA vor der nächsten Mitose gewährleistet. Tumorzellen können dagegen trotz geschädigter DNA keinen G1-Arrest durchführen, meistens bedingt durch Mutationen im Tumorsuppressor-Protein p53, das u. a. für die DNA-Schadenserkennung verantwortlich ist (Dahm-Daphi 2000). In HPV-positiven HNSCC-Tumorzellen liegt das p53-Protein zwar in WT-Form vor (Andl et al. 1998; Gillison et al. 2000; Hafkamp et al. 2003; Wiest et al. 2002), wird jedoch durch das virale E6-Protein inhibiert, weshalb auch in HPV-positiven HNSCC-Tumorzellen trotz DNA-Schaden möglicherweise kein G1-Arrest durchgeführt wird. Durch den ausbleibenden G1-Arrest erfolgt in Tumorzellen vermutlich eine Zellzyklus-Progression, die in die Mitose mündet, ohne dass die Zellen die Möglichkeit zur DNA-Schadensreparatur hatten. Um nach der DNA-Synthese die Zellteilung einleiten zu können, vollziehen die Zellen weiterhin einen G2-Checkpoint, bei dem wiederum eine DNA-Schadenskontrolle durchgeführt wird. Beschädigte DNA führt hier erneut zu einem Zellzyklus-Arrest in der G2-Phase. Die untersuchten HPV-positiven Zelllinien reagieren auf Bestrahlung mit einem verstärkten und zeitlich länger andauernden G2-Arrest im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien. Die DNA-Synthese in HPV-positiven Tumorzellen scheint somit auch nach strahleninduziertem DNA-Schaden nicht angehalten zu werden und führt zur Akkumulation fehlerhafter DNA. Auf irreparable DNA-Schäden reagieren gesunde Zellen mit der Induktion von Apoptose. Dabei spielen Regulator-Proteine wie p53 und Rb eine zentrale Rolle. Der mitotische Zelltod ist eine weitere Form der Apoptose, bei der Zellen mit akkumulierten DNA-Schäden während der Mitose zerstört werden. Gleichzeitig kann die Induktion von Zelltod auch über vielfältige biologische Effekte wie beispielsweise die Freisetzung von mitochondrialen Cytochrom C als Mediatoren der Apoptose-Induktion nach Bestrahlung herbeiführt werden.

Bei bestrahlten HPV-positiven Tumorzellen wurden vermehrt Zellen mit DNA-Fragmenten (SubG1-Phase) nachgewiesen, was auf eine gesteigerte Apoptose-Rate hinweist. Da diese subG1-Zell-Fraktion in HPV-positiven Zellen jedoch erst ca. 28h nach Bestrahlung gemessen wurde, scheint ein sekundärer Effekt vorzuliegen, der

nicht direkt durch die Bestrahlung hervorgerufen wurde. Diese Beobachtung untermauern Rieckmann et al. (2013) durch die Hypothese, es existiere kein direkter Zusammenhang zwischen Bestrahlung und Strahleninduzierter Apoptose. Andererseits könnten die unterschiedlichen experimentellen Methoden wie die Colcemid-basierte Durchflusszytometrie ausschlaggebend für die abweichenden Ergebnisse und die daraus resultierende These sein. Konträr zu Rieckmann et al. (2013) beobachteten Kimple et al. (2013) eine gesteigerte Apoptose-Aktivität in bestrahlten HPV-positiven Zellen, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt.

Die ungebremste Zellzyklus-Progression kombiniert mit der Anhäufung fragmentierter DNA korrelieren daher möglicherweise mit dem guten Ansprechen von Radiotherapie bei Patienten mit HNSCC- und HPV-getriebener Karzinogenese. Diese Empfindlichkeit der Zellen kann am ehesten erklärt werden durch das Auftreten mitotischen Zelltodes, bedingt durch die fortlaufende Zellzyklus-Progression und Akkumulation von DNA-Schäden.

4.1.3 Markerproteine bei der primären Strahlenantwort

Die molekulare Grundlage einer erhöhten Strahlensensitivität von Patienten mit HNSCC-Tumoren, bedingt durch HPV-getriebene Karzinogenese, ist bislang nicht hinreichend bekannt. Daher wurde die Expression von denjenigen Proteinen nach Bestrahlung untersucht, welchen eine entscheidende Rolle bei der primären Strahlenantwort zugeschrieben wird.

Das Tumorsuppressor-Protein p16^{INK4A} ist an der Zellzyklus-Regulation beteiligt, indem er bei DNA-Schaden die Phosphorylierung von Rb durch die Cyclin-abhängige Kinasen 4 und 6 inhibiert. In HPV-positiven Zellen bewirkt die E7-vermittelte Rb-Inhibierung durch den fehlenden Rückkopplungs-Mechanismus eine Akkumulation von p16-Proteinen (Sano et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Protein-Expression von p16^{INK4A} durch Bestrahlung nicht wesentlich verändert. Ionisierende Strahlung bewirkt zwar bei Mäusen einen Anstieg der p16-Expression in hämatopoetischen Zellen (Wang et al. 2006), allerdings sind diese Zellen nicht mit den hier verwendeten HPV-positiven HNSCC-Tumorzellen vergleichbar. Somit bestätigt das Ergebnis dieser Arbeit lediglich den HPV-Status der untersuchten Zelllinien.

Das Tumorsuppressor-Protein Rb bewirkt durch die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F die Aktivierung der S-Phase-Gene und so die Zellzyklus-

Progression. Voraussetzung dafür sind Phosphorylierungen von Rb im Laufe des Zellzyklus (Buchkovich et al. 1989). Bestrahlung bewirkt dagegen eine Inhibierung der Rb-Phosphorylierung. In HPV-positiven Zellen wird Rb durch das virale E7-Onkoprotein inhibiert und für den Abbau markiert (Dyson 1998; Münger et al. 2001; Boyer et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte 24h nach Bestrahlung in HPV-positiven Zelllinien ein stärkeres Rb-Proteinsignal als in unbestrahlten Zellen detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Rb in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien reduziert exprimiert wird und nach Bestrahlung aufgrund des kontinuierlichen Abbaus durch das HPV-E7-Onkoprotein (Dyson 1998; Münger et al. 2001; Boyer et al. 1996) den Zellzyklus nicht arretieren kann. Insofern untermauern die Ergebnisse der Rb-Protein-Expression die Zellzyklus-Analysen der HPV-positiven HNSCC-Zelllinien. Im Gegensatz dazu postulieren Lindel et al. (2012) bei bestrahlten HPV-positiven Zellen eine verminderte Rb-Proteinexpression und begründen diese mit der Regulation durch das virale E2-Gen. Nach Integration der HPV-DNA in das Wirtsgenom wird das E2-Gen deletiert und infolgedessen die viralen Onkoproteine E6 und E7 verstärkt exprimiert (Olthof et al. 2012). In allen HPV-positiven Zelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, ist die HPV-DNA in das zelluläre Genom integriert (interne Kommunikation mit Olthof, N.; Huebbers, C.), sodass wahrscheinlich in jeder Zelllinie ein komplett oder teilweise deletiertes E2-Gen vorliegt. Die gefundene Veränderung des Rb-Proteinsignals nach Bestrahlung widerspricht somit der Hypothese von Lindel et al. (2012) laut der bestrahlte HPV-positive Zellen mit integrierter DNA verstärkt HPV-E7-Protein exprimieren und somit die Rb-Proteinexpression vermindert wird. Da die Autoren jedoch ausschließlich Zellen mit episomal bzw. integriertem HPV-Genom untersuchten, kann die Beteiligung von HPV an der Strahlensensitivität von Tumoren mit HPV-getriebener Karzinogenese nicht näher definiert werden. Es fehlen sowohl Untersuchungen mit bestrahlten, gesunden Keratinozyten, sowie mit bestrahlten HNSCC-Tumorzellen ohne HPV-Assoziation.

Das Tumorsuppressor-Protein p53 übernimmt in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor die Regulation von Apoptose-Induktion, Zellzyklus-Arrest und Wachstumskontrolle, sowie DNA-Reparatur und Replikation. Nach Strahleninduziertem DNA-Schaden erfolgt die Aktivierung des p53-Proteins in Form von Phosphorylierungen (Banin et al. 1998). In HPV-positiven Tumorzellen wird p53 allerdings durch HPV-E6 inhibiert und zum Abbau markiert (Scheffner et al. 1990; Werness et al. 1990), wobei die Beteiligung von HPV an der Strahlensensitivität HPV-assoziiierter Tumoren kontrovers diskutiert wird. In den HPV-negativen Zelllinien konnte 24h nach Bestrahlung UM-SCC11b und UT-SCC33, sowie in der HPV-positiven VU-

147T ein p53-Signal detektiert werden. Das Fehlen eines p53-Proteinsignals bei der HPV-negativen Zelllinie UD-SCC1 ist am ehesten auf experimentelle Bedingungen zurückzuführen. Am Standort Marburg erfolgt der Proteinnachweis mit veränderten Puffersystemen und einer anderen Western Blot Membran (Arenz et al. 2014). In den HPV-positiven Zelllinien UM-SCC47, UM-SCC104 und UPCI:SCC152 ist 24h nach 6Gy kaum p53-Protein nachweisbar. Die HPV-positive Zelllinie VU-147T verfügt sowohl über ein WT-p53- und als auch ein mutiertes p53-Gen, weshalb das p53-Proteinsignal wahrscheinlich durch Aggregation von mutiertem p53-Protein entstand, da WT-p53 der Degradation von E6 unterworfen ist. Bestrahlung bewirkt jedoch bereits 0,5h später in den HPV-positiven Zelllinien UM-SCC47 und VU-147T, sowie den HPV-negativen Zelllinien UM-SCC11b und UT-SCC33 eine messbare Aktivierung von p53 in Form von Phosphorylierung an Serin15. Diese Aktivierung nimmt in den HPV-positiven Zelllinien über die Zeit ab, folglich ist 24h nach Bestrahlung fast kein Phospho-p53-Protein mehr nachzuweisen. Das starke und lang anhaltende phospho p53-Signal der HPV-positiven Zelllinie VU-147T widerspricht zwar der Theorie, dass das onkogene E6 die Degradation des Tumorsuppressors p53 herbeiführt (Scheffner et al. 1990; Werness et al. 1990). Es scheint jedoch eine p53-vermittelte Strahlenantwort in den HPV-positiven Tumorzellen zu erfolgen, die zeitabhängig durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu postulieren Ahmed et al. (2009) eine ATM-vermittelte (*Ataxia telangiectasia mutated kinase*) Strahlenantwort in humanen Keratinozyten, die bereits 0,5h nach nur 1Gy aktiviert wird. Leider überprüften die Autoren die p53-Expression weder auf RNA noch Proteinebene, sodass ein Vergleich mit der p53-abhängigen primären Strahlenantwort nicht hergestellt werden kann.

In wie weit die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene Aktivierung der HPV-negativen Tumorzellen auf die p53-Funktionalität aufgrund der postulierten Mutationen schließen lässt kann hier nicht abschließend geklärt werden. Im Vergleich zu HNSCC-Zellen mit p53-Mutation konnten Niemantsverdriet et al. (2005) bei Zellen mit konditioneller Überexpression von p53 zeigen, dass diese Zellen nach Bestrahlung einen Zellzyklus-Arrest-Shift von G1 zu G2 durchführen. Dies bekräftigt sowohl den in dieser Arbeit gefundenen strahleninduzierten G2-Arrest HPV-positiver und den G1-Arrest HPV-negativer Zellen, als auch die These einer p53-abhängigen Strahlenantwort, die in HPV-positiven Zelllinien zum erhöhten Zellsterben führen könnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung die Rb- und p53-Proteinexpression unterschiedlich beeinflusst. Der länger andauernde G2-Arrest

und die verspätete Akkumulation von HPV-positiven Zellen mit DNA-Fragmenten weisen zusammen mit den Western Blot Ergebnissen darauf hin, dass die erhöhte Strahlensensitivität HPV-positiver HNSCC-Tumorzellen durch p53-unabhängige Formen des Zellsterbens zustande kommen könnte. Einen solchen p53-unabhängigen Weg beschrieben bereits Patel et al. (2000) als Schlussfolgerung auf die gefundene verstärkte Apoptose-Rate 96h nach Bestrahlung in p53-defizienten im Vergleich zu bestrahlten WT-p53 HNSCC-Tumorzellen. Einerseits stärkt die tendenziell schwache und uneinheitliche Reaktion auf Protein-Ebene in bestrahlten HPV-positiven Zellen den Verdacht eines p53- und Rb-unabhängigen Signalwegs. Andererseits sichern sowohl p53 als auch Rb in ihrer antiapoptotischen Funktion das Zellüberleben und sorgen primär für DNA-Reparatur. Es liegt der Verdacht nahe, dass andere Proteine wie beispielsweise ATM bei Ahmed et al. (2009) die Strahlensensitivität bei Tumoren bedingen, die durch HPV-getriebene Karzinogenese entstanden. Die verspätete SubG1-Phasen-Akkumulation könnte als Hinweis auf mitotischen Zelltod aufgrund von chromosomalen Aberrationen gelten und somit entgegen der p53-vermittelten Apoptose stehen.

4.2 Einfluss ionisierender Strahlung auf virale Onkoproteine

In wie weit ionisierende Strahlung einen Einfluss auf die Genexpression von HPV16-E6 und -E7 hat ist weitestgehend unbekannt. Daher wurde die mRNA-Expression dieser Gene in den HPV-positiven Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der Zelllinien 6h nach Bestrahlung eine um 40% verminderte E6- und E7-mRNA-Expression aufwies. Durch Bestrahlung scheinen also die Onkogene E6 und E7 insofern beeinflusst zu werden, als dass ionisierende Strahlung möglicherweise die Transkription hemmt.

Die Zelllinie VU-147T stellt eine Ausnahme dar, denn sie weist 6h nach Bestrahlung einen gesteigerten E6- und E7-mRNA-Gehalt auf. Dies könnte mit der verstärkt exprimierten E6-Splice-Variante E6*I zusammenhängen (Steenbergen et al. 1995). Es existieren Hinweise, dass das E6*I-Variantenprotein das E6-Protein binden und so die E6-vermittelte p53-Degradation inhibieren kann (Pim et al. 1997). Weiterhin wird vermutet, dass die Variante E6*I über Promotor-Aktivierung die Transkription von E6- und E7 bewirkt (Shirasawa et al. 1994). In einer jüngeren Studie konnte über stabile Transfektion mit der E6-Splice-Variante E6*I eine verstärkte Strahlensensitivität im Vergleich zum normalen E6-Transkript nachgewiesen werden (Pang et al. 2011). Außerdem postulieren Pang et al. (2011), dass die Isoform E6*I (im Gegensatz zum

vollständigen E6-Transkript) keinen Effekt auf WT-p53 hat. Diese These bekräftigt die in der vorliegenden Arbeit gefundene p53-Aktivierung 24h nach Bestrahlung, während die anderen HPV-positiven Zelllinien zu diesem Zeitpunkt bereits kein phosphoryliertes p53 mehr aufwiesen. Anhand der in der vorliegenden Arbeit verwendeten E6-PCR-Primer (Abschnitt 2.4) kann allerdings nicht unterschieden werden, ob es sich beim entstandenen E6-PCR-Produkt um die E6*I Splice-Variante oder das vollständige E6-Transkript handelt. Deshalb bleibt unklar, ob die gesteigerte E6-Expressions bei VU-147T durch die amplifizierte E6*I-Splice-Variante oder durch einen Bestrahlungseffekt entstand. Aufgrund der E6- und E7-Expressionsminderung aller anderen HPV-positiven Zelllinien ist jedoch ein E6-Splice-Varianten-Amplifikat wahrscheinlich.

Weiterhin wurden in den HPV-positiven Zelllinien die E6- und E7-Genbereiche auf Sequenzmodifikationen überprüft. Zwar weisen die meisten HPV-positiven Zelllinien Modifikationen auf, diese wurden aber als HPV16-Varianten identifiziert, die in der Referenz-Datenbank bereits beschrieben sind. Wie auch bei der E6- und E7-Genexpression zeigte eine Zelllinie ein anderes Sequenzierungs-Ergebnis: Die Zelllinie VU-147T verfügt über E6- und E7-Genbereiche, die keine Sequenzmodifikationen aufweisen und mit der Referenzsequenz (NCBI-Datenbank, Identifikationsnummer NC_001526.2 (Kennedy et al. 1991)) übereinstimmen. Folglich können selbst HPV16-Genomvarianten mit Sequenzmodifikationen in humanen Zellen eine Karzinogenese herbeiführen. In wie weit die HPV16-Genomvarianten Onkoproteine bilden, die in ihrer Funktion den Proteinen der HPV16-Referenzsequenz gleichen, ist jedoch nicht klar. Experimentelle Studien belegen, dass die Onkogene E6 und E7 je nach Variante in unterschiedlichen Mengen exprimiert werden und auch die p53-Degradations-Aktivität der einzelnen Varianten unterschiedlich ist (Mesplède et al. 2012; Foster et al. 1994; Stöppler et al. 1996). Die Vermutung, dass das in den Zellen enthaltene HPV16-Genom das p53-Protein-Signal beeinflusst, liegt nahe.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die meisten HPV-positiven Zelllinien nach Exposition mit ionisierender Strahlung die Genexpression der Onkogene E6 und E7 vermindern. Allerdings liegen selbst innerhalb der Entität der HPV-positiven Zelllinien Unterschiede in Bezug auf E6- und E7-Genexpression sowie die HPV16-Genomsequenz vor. Ob ein Zusammenhang zwischen den gefundenen Sequenz-Modifikationen, den unterschiedlichen Protein-Signalen und dem Ansprechen auf Bestrahlung besteht, kann hier nicht geklärt werden.

4.3 Einfluss ionisierender Strahlung auf die p53-abhängige Genexpression

Der Tumorsuppressor p53 spielt eine zentrale Rolle bei der primären, zellulären Strahlenantwort. In der Mehrheit der HNSCC-Tumoren liegen Mutationen oder Deletionen im p53-Genbereich vor (Dahm-Daphi 2000), wohingegen HNSCC-Tumore, deren Karzinogenese durch HPV getrieben ist, meist über ein WT-p53-Gen verfügen (Andl et al. 1998; Gillison et al. 2000; Hafkamp et al. 2003; Wiest et al. 2002). Dies wird jedoch durch das virale Onkoprotein E6 inhibiert und zum Abbau markiert (Scheffner et al. 1990; Werness et al. 1990), wobei eine Beteiligung von HPV an der Strahlensensitivität HPV-positiver HNSCC-Tumoren kontrovers diskutiert wird. Daher wurde die Expression von p53-regulierten Genen in bestrahlten HPV-positiven Zellen untersucht und mit der Expression der HPV-negativen Zellen verglichen. Die Gene gelten als verändert reguliert, wenn die Expressionsänderung ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Livak und Schmittgen 2001) den gewählten „cut off“ ($<0,66$ bzw. $>1,5$) unter- bzw. überschreiten. Insgesamt werden die analysierten Gene allerdings größtenteils schwach exprimiert, weshalb eine detektierte Expressionsänderung bei geringen mRNA-Mengen als sehr sensitiv angesehen wird. Drei Gene werden nach Bestrahlung mit 6Gy im Verhältnis stärker verändert exprimiert: Das Gen BIRC5, welches für das antiapoptotische Protein Survivin kodiert, das Gen CCNB1, welches für das Protein Cyclin B1 kodiert, und das Gen CDC25C, welches für das gleichnamige Protein *cdc25c* (*Cell Division Cycle 25C*) kodiert.

Das Gen BIRC5 wird nach p53-Induktion durch Bestrahlung vermindert (Stauber et al. 2007; Hoffman et al. 2002). Es kodiert für das Protein Survivin, das einerseits an der Chromosomen-Segregation während der Zytokinese, andererseits bei der Inhibierung der Caspase-9 beteiligt ist. In allen HPV-positiven Zelllinien wird das Gen BIRC5 nach Bestrahlung vermindert exprimiert, in den HPV-negativen Zellen bleibt es unverändert. Diese BIRC5-mRNA-Minderung der HPV-positiven Tumorzellen bekräftigt sowohl ihren strahleninduzierten, länger andauernden G2-Arrest als auch ihre p53-Aktivierung und kann als Indiz für eine p53-abhängige Strahlenantwort geltend gemacht werden. Diese These wird durch eine Studie von Hoffman et al. (2002) untermauert, bei der nicht nur die Bindung von p53 *in vivo* an die Survivin-Promotor-Region gezeigt wurde, sondern auch die Verminderung der BIRC5-mRNA nach p53-Induktion detektiert wurde. Im Gegensatz dazu postulieren Preuss et al. (2008), dass die Expression von Survivin-Protein unabhängig von der HPV-getriebenen Karzinogenese abläuft und folglich auch p53-unabhängig ist. Da der Nachweis von Survivin in dieser Studie jedoch ausschließlich über Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe und über

immunohistochemische Färbung erfolgte, ist eine Vergleichbarkeit mit der mRNA-Expression der vorliegenden Arbeit – isoliert aus frischem Zellmaterial – nicht gegeben.

Das Gen CCNB1 kodiert für das Protein Cyclin B1, das die Zellzyklus-Progression während der späten G2- und M-Phase fördert. Nach strahleninduziertem DNA-Schaden wird die Genexpression von CCNB1 vermindert (Badie et al. 2000). In allen getesteten HNSCC-Zelllinien ist nach Bestrahlung die mRNA-Expression des CCNB1-Gens vermindert. Da das kodierte Protein Cyclin B1 für die G2-M-Phasen-Progression benötigt wird, entspricht die CCNB1-mRNA-Minderung der HPV-negativen Zellen dem gefundenen strahleninduzierten G1-Arrest. Da diese Zellen jedoch nur mutiertes p53-Protein exprimieren muss eine weitere p53-unabhängige Cyclin B1-Regulation vorliegen. Chen et al. (2002) fanden in mit HPV18 immortalisierten humanen Keratinozyten (HK18) eine p53-unabhängige Strahlenantwort, vermittelt durch NFκB (*nuclear factor kappa B*). Die Autoren postulieren, dass unter anderem CCNB1 transkriptionell durch NFκB reguliert werde. Anders als nach einmaliger Bestrahlung mit 6Gy detektieren Chen et al. (2002) nach fraktionierter Bestrahlung allerdings eine gesteigerte mRNA-Expression in bestrahlten, immortalisierten Keratinozyten. In HPV18-positiven HeLa-Zellen (Zervix-Karzinom) konnten Santana et al. (2002) durch die Transfektion mit onkogenem H-Ras-Protein eine gesteigerte, CCNB1-mRNA-Expression feststellen. Sowohl bei Chen et al. (2002) als auch bei Santana et al. (2002) wurde die CCNB1-mRNA-Expression p53-unabhängig gesteuert. Obwohl in beiden Studien eine CCNB1-Expressions-Minderung detektiert wurde verfügen die von Chen et al. (2002), Santana et al. (2002), wie auch die hier verwendeten HPV-positiven Zelllinien über WT-p53. Somit bleibt die Frage nach einer p53-abhängigen Strahlenantwort, die möglicherweise verspätet angetrieben wird, bestehen.

Das Gen CDC25C kodiert für das Protein cdc25c, welches als Phosphatase die strahleninduzierte Expression von p53 vermindert und nach Strahleninduziertem DNA-Schaden reprimiert (Badie et al. 2000). In den untersuchten HPV-positiven Zelllinien UM-SCC47 und UPCI:SCC152, sowie in der HPV-negativen Zelllinie wird nach Bestrahlung die CDC25C-Expression vermindert. Da CDC25C durch die sequenzspezifische p53-Bindung an die CDC25C-Promotor-Region reprimiert wird (St Clair et al. 2004) stützt die CDC25C-mRNA-Minderung in den HPV-positiven Zelllinien die gefundene Strahleninduzierte p53-Aktivierung. Die unveränderte CDC25C-Expression in der HPV-positiven Zelllinie VU-147T könnte auf das mutierte p53-Allel zurückgeführt werden. Dieses ruft möglicherweise eine veränderte Transkription hervor. Die gefundene CDC25C-RNA-Minderung der bestrahlten HPV-negativen UT-

SCC33 Zellen lässt jedoch vermuten, dass es noch einen weiteren p53-unabhängigen Weg zur Expressionskontrolle gibt.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse der p53 Signaling Array-Analyse, dass in Abhängigkeit vom gewählten „cut off“ nach Bestrahlung sechs Gene (BCL2A1, FAS, PRC1, RPRM, TNF und TP73) in HPV-positiven und vier Gene (BCL2A1, BIRC5, PRC1, TNF) in HPV-negativen Zelllinien anders als erwartet reguliert werden. Diese Gene leiten in gesunden Zellen entweder den p53-abhängigen Zellzyklus-Arrest oder die p53-abhängige Apoptose ein. Da in beiden Entitäten diese Gene verändert exprimiert werden wird der Verdacht von p53-unabhängigen Mechanismen, die nach DNA-Schaden aktiviert werden, bestärkt. In der Literatur wird diese These kontrovers diskutiert: Koike et al. (2005) zeigten beispielsweise in einer Genexpressions-Analyse mit bestrahlten, gesunden Keratinozyten, dass die primäre Strahlenantwort nicht von p53 gesteuert wird. Dagegen fanden Wartens et al. (2009) in primären humanen Keratinozyten nach Bestrahlung hauptsächlich p53-abhängige, transkriptionelle Zielgene als verändert exprimiert. Weitere Genexpressions-Analysen mit bestrahlten gesunden Keratinozyten sowie Zellen mit siRNA-vermitteltem p53-Knockdown sind erforderlich, um den Einfluss von p53 bei der Strahlenantwort zu definieren. Andere biologische Mechanismen wie beispielsweise die Hochregulation von Entzündungsfaktoren (z. B. Zytokine) sind bei der Strahlenantwort denkbar und könnten entscheidenden Einfluss auf zelluläres Überleben nach Bestrahlung haben (Tobita et al. 2010).

4.4 Ausblick

Bestrahlung vermindert das klonogene Überleben HPV-positiver HNSCC-Tumorzelllinien signifikant im Vergleich zu HNSCC-Tumorzellen ohne HPV-getriebene Karzinogenese. Gleichzeitig wurden bei dieser Entität verstärkt Zellen mit DNA-Fragmenten sowie ein ausbleibender G1-Phasen-Arrest nach Bestrahlung festgestellt. Welche molekularen Ursachen die höhere Strahlensensitivität HPV-positiver HNSCC-Tumorzellen bedingen kann hier nicht abschließend dargelegt werden. Ein Hinweis auf die Beteiligung des p53-Proteins bei der primären Strahlenantwort ist durch dessen Aktivierung in Form der Phosphorylierung am Serinrest 15 gegeben, wobei die strahleninduzierte Aktivierung noch eine weitere Phosphorylierung an Serin20 bewirkt, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Die These des kompletten p53-Abbaus durch das virale E6-Protein könnte weiterhin durch einen fehlerhaften oder funktionslosen Abbau-Komplex entkräftet werden. In manchen HPV-assoziierten

Tumoren könnte das E6-AP-Protein nicht vorhanden bzw. funktionsuntüchtig sein und mit dem viralen E6-Protein nicht komplexieren (Talis et al. 1998; Huibregtse et al. 1991). Über Western Blot Experimente sowie Co-Immünpräzipitationen mit E6 und p53 könnte diese Hypothese bei den hier verwendeten Zelllinien näher analysiert werden. Gleichzeitig gäbe der Nachweis von E6 und E7-Protein über Western Blots Aufschluss über den postulierten p53- und Rb-Abbau in HPV-positiven Zellen. Die Überprüfung der mRNA- und Protein-Expression der E6*I Splice Variante in der Zelllinie VU-147T könnte ebenfalls wichtige Informationen über den postulierten Abbau des viralen E6-Proteins durch E6*I liefern (Steenbergen et al. 1995).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene, verstärkte Rb-Proteinexpression nach Bestrahlung könnte auf eine unzureichende Bindung des viralen HPV16E7 hindeuten. Ob es sich bei der Steigerung der Rb-Proteinexpression tatsächlich um eine Aktivierung handelt, kann durch Co-Immünpräzipitation von Rb mit dem Transkriptionsfaktor E2F untersucht werden. Zellfraktionierung mit anschließender Western Blot Analyse von bestrahlten HPV-positiven Tumorzellen kann weiterhin Aufschluss über die Lokalisation von E2F und dessen transkriptionelle Aktivität geben. Generell gibt es bei den in dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Tumorzelllinien keine Informationen bezüglich eventueller Mutationen im Rb-Gen und -Protein. Somit würden Sequenzierung von Gen und Protein hilfreiche Antworten zum detektierten Rb-Proteinsignal liefern.

Neben den hier untersuchten Proteinen ist beispielsweise das ATM-Protein an der DNA-Schadenserkenung beteiligt (Mirzayans et al. 2012). Experimente zur ATM-Aktivierung in gesunden Keratinozyten, p53-defizienten (HPV-negativen HNSCC-Tumorzellen) und p53-WT-Zellen (HPV-positive HNSCC-Tumorzellen) könnten somit Hinweise für eine mögliche p53-unabhängige Strahlenantwort geben, zumal Ahmed et al. (2009) bereits eine ATM-Aktivierung in HPV18-positiven Keratinozyten nachweisen konnten. Inwieweit p53-unabhängige Signalwege in der Zelllinie VU-147T durch viralen Einfluss zur Hochregulation von p53 (ohne Bestrahlung) führen, bleibt indes noch ungeklärt.

Zur Überprüfung der Ergebnisse des *Human p53 Signaling Pathway* RT2 Profiler PCR Arrays sollten einerseits gesunde Keratinozyten, andererseits Zelllinien mit p53-unabhängiger Onkogenese – wie beispielsweise Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen, die CML (chronische myeloischer Leukämie) verursachen – nach Bestrahlung untersucht werden. So könnte die These der p53-unabhängigen,

veränderten Genexpression nach Bestrahlung in den untersuchten HNSCC-Tumorzelllinien untersucht werden.

Klinisch könnte der Ansatz, das Immunsystem als Therapiemodalität in Kombination mit Radiation mit einzubeziehen (Tobita et al. 2010), künftig einen wichtigen Schritt hin zur effektiveren Tumorthherapie sein, nicht nur bei HPV-assoziierten HNSCC-Tumoren.

5 Zusammenfassung

Die gängige, klinische Therapie bei HNSCC-Tumoren erfolgt derzeit mittels radikaler Resektion und adjuvanter Radio- und/oder Chemotherapie. Noxen-assoziierte HNSCC-Tumore stellen allerdings eine distinkte Entität im Vergleich zu HNSCC-Tumoren mit HPV-getriebener Karzinogenese dar, wenngleich die Patienten mit HPV-Assoziation ein besseres Gesamtüberleben aufweisen. Ob alleinige Radiotherapie bzw. Radiochemotherapie den gleichen Therapieerfolg wie Resektion mit anschließender Radio-Chemotherapie bringen würde ist derzeit nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit HNSCC-Tumorzellen mit und ohne HPV-Assoziation *in vitro* bestrahlt und anschließend molekularbiologisch anhand von Zellzyklus-Analysen, Protein- und mRNA-Expression untersucht. Des Weiteren wurde die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 in den HPV-positiven Tumorzelllinien nach Bestrahlung analysiert.

Die bessere Prognose bei Patienten mit Tumoren aus HPV-getriebener Karzinogenese wird durch eine erhöhte Strahlensensitivität begründet, was das gefundene, signifikant verminderte Überleben HPV-positiver HNSCC-Tumorzelllinien erklären könnte ($p=0,01$) (Arenz et al. 2014). *In vitro* reagieren die bestrahlten HPV-positiven Tumorzelllinien verstärkt mit einem zeitlich länger andauernden G2-Arrest im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien und akkumulieren DNA-Fragmente, die als Hinweis auf eine gesteigerte Apoptose-Rate gelten. Die zelluläre Expressions-Analyse der Marker-Proteine Retinoblastom und p53 zeigte, dass Bestrahlung zwar die Proteinexpression verändert, jedoch selbst innerhalb der Entitäten Unterschiede vorliegen. Die Überprüfung der p53-abhängigen Genprodukte zeigte, dass – unabhängig von der Entität – Gene reguliert werden, die einen strahleninduzierten Zellzyklus-Arrest oder Apoptose herbeiführen. Die Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 war außerdem in der Mehrheit der untersuchten HPV-positiven Tumorzelllinien nach Bestrahlung vermindert.

Die klinische Heterogenität von HNSCC-Tumoren konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, wenngleich eine erhöhte Radiosensitivität HPV-positiver Tumorzelllinien vorliegt. Molekulare Mechanismen, die nach Bestrahlung das verstärkte Zellsterben herbeiführen und so das bessere Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren sichern, werden wahrscheinlich p53-unabhängig aktiviert. Vermutlich wird die veränderte virale Genexpression mit der Aktivierung verschiedener Zelltod-Mechanismen kombiniert.

6 Summary

Currently, prevalent clinical treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is resection with adjuvant radio- and/or chemotherapy. Noxa-induced HNSCC represent a distinct entity compared to HNSCC with a human papilloma virus (HPV) driven carcinogenesis, however patients with HPV association have a better overall survival. It is unknown whether exclusive radiotherapy reveals the same successful outcome as resection with adjuvant therapy. In the present work HNSCC tumor cell lines with and without HPV association have been irradiated *in vitro* and were subsequently molecular biologically analysed for cell cycle behavior, protein and mRNA expression. In addition, the expression of viral oncogenes E6 and E7 in HPV-positive tumor cell lines after irradiation has been tested.

Improved prognosis of patients with HPV-driven HNSCC is correlated by higher radiation sensitivity, which was shown by the detected significant decrease of surviving HPV associated HNSCC tumor cell lines ($p=0,01$) (Arenz et al. 2014). *In vitro* irradiated HPV-positive tumor cell lines react with a prolonged G2 phase arrest compared to HPV-negative tumor cells, and HPV-positive cells accumulate DNA fragments, which indicate an increased apoptosis. Cellular expression analysis for marker proteins Retinoblastoma and p53 revealed that irradiation changes protein expression, however, differences within entities exist. Examination of p53-dependending gene products demonstrated that genes independent of cellular entity have been regulated, which promote radiation induced cell cycle arrest or apoptosis. Besides expression of viral oncogenes E6 and E7 was reduced after irradiation in the majority of tested HPV-positive tumor cell lines.

This work could confirm the clinical heterogeneity of HNSCC, even though an increased radiation sensitivity of HPV-positive tumor cell lines exists. Molecular mechanisms, which cause the increased cell death after irradiation and therefore ensure the improved overall survival of patients with HPV-associated tumors, are most probably p53 independently activated. There is a strong likelihood that altered viral gene expression and activation of different cell death mechanisms act in combination.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ATG	Startcodon auf mRNA, das für Protein kodiert
ATP	Adenosintriphosphat
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated kinase</i>
β	beta
BIRC5	Gen, das für das Protein Survivin kodiert
BSA	Rinderserum-Albumin (engl. <i>Bovine serum albumine</i>)
°C	Grad Zelsius
CCNB1	Gen, das für das Protein Cyclin B1 kodiert
CDC25C	Gen und Protein (engl. <i>Cell division Cycle 25 C</i>)
c	Zenti
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>Complementary DNA</i>)
CT	<i>Cycle Threshold</i>
Cu	Kupfer
D	Dosis
Δ	Delta
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoyiribonuklein-Säure (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Nukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eV	Elektronenvolt
γ	gamma
Gy	Gray
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
HNSCC	Kopf-Hals-Karzinome (engl. <i>Head neck squamous cell carcinoma</i>)
HPV	Humanes Papilloma Virus
keV	Kilo-Elektronenvolt
μ	Mikro
MeV	Mega-Elektronenvolt
min	Minute (engl. <i>minute</i>)
n	Nano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFκB	Nuklear factor kappa B
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)

pm	Piko
pRbp	Hyperphosphoryliertes Retinoblastomprotein
pRb	Hypophosphoryliertes Retinoblastomprotein
qPCR	Quantitative <i>real time</i> PCR
Rb	Retinoblastomprotein
RIN	RNA-Integritäts-Nummer
RNA	Ribonuklein-Säure (engl. <i>Ribonucleic acid</i>)
SDS	<i>Sodium dodecylsulfat</i>
SF	Überlebensfraktion (engl. <i>Surviving fraction</i>)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
γH2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Infektion mit HPV16 in mehrschichtigem Plattenepithel der <i>Zervix uteri</i> und der Tonsillenkrypte	2
Abbildung 2: HPV16-Genom	3
Abbildung 3: Integration des HPV16-Genoms	6
Abbildung 4: Zellzyklus-Phasen.....	11
Abbildung 5: HPV-PCR	43
Abbildung 6: Überleben nach Bestrahlung	45
Abbildung 7: Verteilung der DNA-Gehalte der HPV-positiven Zelllinie UPCI:SCC152 und der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC11b nach Bestrahlung mit 2Gy und 6Gy	46
Abbildung 8: Prozentuale Häufigkeits-Verteilung der DNA-Gehalte bestrahlter Zellen in den Zellzyklus-Phasen	47
Abbildung 9: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Zellen mit DNA-Fragmenten nach Bestrahlung (SubG1-Phase).....	48
Abbildung 10: p16 ^{INK4A} -Protein-Expression in vier HPV-positiven und vier HPV-negativen Zelllinien 24h nach Bestrahlung mit 6Gy	49
Abbildung 11: Rb-Protein-Expression in vier HPV-positiven und vier HPV-negativen Zelllinien 24h nach Bestrahlung mit 6Gy	50
Abbildung 12: Rb-Protein-Expression in vier HPV-positiven und zwei HPV-negativen Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 6Gy	51
Abbildung 13: Protein-Expression von hyper- (pRbp) und hypo-phosphoryliertem Rb (pRb) in zwei HPV-positiven und einer HPV-negativen Zelllinie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 6Gy.....	52
Abbildung 14: Protein-Expression von p53 und phosphoryliertem p53 an Serin15 in vier HPV-negativen und vier HPV-positiven Zelllinien 24h nach Bestrahlung mit 6Gy.....	53
Abbildung 15: Protein-Expression von p53- und phospho- p53 in zwei HPV-positiven und zwei HPV-negativen Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 6Gy	54
Abbildung 16: Relative E6- und E7-mRNA-Expressionsänderung nach Bestrahlung mit 6Gy	56
Abbildung 17: E6-Sequenzvergleich der Zelllinie UM-SCC47 mit der HPV16-Referenzsequenz	57

Abbildung 18: E7-Sequenzvergleich der Zelllinie UM-SCC47 mit der HPV16-Referenzsequenz	58
Abbildung 19: Sequenz-Vergleich von verschiedenen HPV16-Stämmen mit der Zelllinie UM-SCC47 und der HPV16-Referenzsequenz	60

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien-Informationen.....	22
Tabelle 2: Verdopplungszeiten	44
Tabelle 3: mRNA-Expression von E6 und E7 in den HPV-positiven Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 6Gy	55
Tabelle 4: Basensequenz-Analyse der untersuchten HPV-E6 und E7-Gen-Regionen und Konsequenz für die Aminosäure-Sequenz.....	59
Tabelle 5: Zusammenfassung des NCBI-Datenbank-Vergleichs mit den sequenzierten HPV-positiven Zelllinien.....	61
Tabelle 6: Gen-Expressions-Änderung auf p53 Signaling Array 4h nach Bestrahlung mit 6Gy in den HPV-negativen und -positiven Zelllinien.....	63
Tabelle 7: Eigenschaften und Funktionen der Gene mit stark veränderter Expression in der p53 Signaling Array Analyse der HPV-negativen und -positiven Zelllinien.	64

10 Literaturverzeichnis

- Ahmed, Kazi Mokim; Nantajit, Danupon; Fan, Ming; Murley, Jeffrey S.; Grdina, David J.; Li, Jian Jian (2009): Coactivation of ATM/ERK/NF-kappaB in the low-dose radiation-induced radioadaptive response in human skin keratinocytes. In: *Free Radic. Biol. Med.* 46 (11), S. 1543–1550. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.012.
- Andl, T.; Kahn, T.; Pfuhl, A.; Nicola, T.; Erber, R.; Conradt, C. et al. (1998): Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. In: *Cancer Res.* 58 (1), S. 5–13.
- Androphy, E. J.; Lowy, D. R.; Schiller, J. T. (1987): Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. In: *Nature* 325 (6099), S. 70–73. DOI: 10.1038/325070a0.
- Ang, K. Kian; Harris, Jonathan; Wheeler, Richard; Weber, Randal; Rosenthal, David I.; Nguyen-Tân, Phuc Felix et al. (2010): Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 363 (1), S. 24–35. DOI: 10.1056/NEJMoa0912217.
- Arenz, Andrea; Ziemann, Frank; Mayer, Christina; Wittig, Andrea; Dreffke, Kirstin; Preising, Stefanie et al. (2014): Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. In: *Strahlenther Onkol.* DOI: 10.1007/s00066-014-0605-5.
- Auluck, Ajit; Hislop, Greg; Bajdik, Chris; Poh, Catherine; Zhang, Lewei; Rosin, Miriam (2010): Trends in oropharyngeal and oral cavity cancer incidence of human papillomavirus (HPV)-related and HPV-unrelated sites in a multicultural population: the British Columbia experience. In: *Cancer* 116 (11), S. 2635–2644. DOI: 10.1002/cncr.25087.
- Badie, C.; Itzhaki, J. E.; Sullivan, M. J.; Carpenter, A. J.; Porter, A. C. (2000): Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells. In: *Mol. Cell. Biol.* 20 (7), S. 2358–2366.
- Balló, H.; Koldovsky, P.; Hoffmann, T.; Balz, V.; Hildebrandt, B.; Gerharz, C. D.; Bier, H. (1999): Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model. In: *Anticancer Res.* 19 (5B), S. 3827–3836.
- Banin, S.; Moyal, L.; Shieh, S.; Taya, Y.; Anderson, C. W.; Chessa, L. et al. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. In: *Science* 281 (5383), S. 1674–1677.
- Blomberg, Maria; Nielsen, Ann; Munk, Christian; Kjaer, Susanne Krüger (2011): Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. In: *Int. J. Cancer* 129 (3), S. 733–741. DOI: 10.1002/ijc.25699.
- Bonne-Andrea, C.; Santucci, S.; Clertant, P.; Tillier, F. (1995): Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase alpha but not replication protein A. In: *J. Virol.* 69 (4), S. 2341–2350.
- Boyer, S. N.; Wazer, D. E.; Band, V. (1996): E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. In: *Cancer Res.* 56 (20), S. 4620–4624.
- Braakhuis, Boudewijn J M; Visser, Otto; Leemans, C. René (2009): Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. In: *Oral Oncol.* 45 (9), S. e85-9. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2009.03.010.

- Brugarolas, J.; Moberg, K.; Boyd, S. D.; Taya, Y.; Jacks, T.; Lees, J. A. (1999): Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (3), S. 1002–1007.
- Buchkovich, K.; Duffy, L. A.; Harlow, E. (1989): The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. In: *Cell* 58 (6), S. 1097–1105.
- Byers, R. M.; Bland, K. I.; Borlase, B.; Luna, M. (1978): The prognostic and therapeutic value of frozen section determinations in the surgical treatment of squamous carcinoma of the head and neck. In: *Am. J. Surg.* 136 (4), S. 525–528.
- Chan, S. Y.; Ho, L.; Ong, C. K.; Chow, V.; Drescher, B.; Dürst, M. et al. (1992): Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. In: *J. Virol.* 66 (4), S. 2057–2066.
- Chaturvedi, Anil K.; Engels, Eric A.; Anderson, William F.; Gillison, Maura L. (2008): Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. In: *J. Clin. Oncol.* 26 (4), S. 612–619. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.1713.
- Chen, Xufeng; Shen, Binghui; Xia, Liqun; Khaletzkij, Alexander; Chu, David; Wong, Jeffrey Y C; Li, Jian-Jian (2002): Activation of nuclear factor kappaB in radioresistance of TP53-inactive human keratinocytes. In: *Cancer Res.* 62 (4), S. 1213–1221.
- Chen, Ziqi; Terai, Masanori; Fu, Leiping; Herrero, Rolando; Desalle, Rob; Burk, Robert D. (2005): Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. In: *J. Virol.* 79 (11), S. 7014–7023. DOI: 10.1128/JVI.79.11.7014-7023.2005.
- Chung, Christine H.; Gillison, Maura L. (2009): Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. In: *Clin. Cancer Res.* 15 (22), S. 6758–6762. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0784.
- Conrad, M.; Bubb, V. J.; Schlegel, R. (1993): The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. In: *J. Virol.* 67 (10), S. 6170–6178.
- Conway, D. I.; Stockton, D. L.; Warnakulasuriya, K A A S; Ogden, G.; Macpherson, L M D (2006): Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. In: *Oral Oncol.* 42 (6), S. 586–592. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2005.10.018.
- Dahm-Daphi, J. (2000): p53: biology and role for cellular radiosensitivity. In: *Strahlenther Onkol* 176 (6), S. 278–285.
- de Roda Husman, A M; Walboomers, J. M.; van den Brule, A J; Meijer, C. J.; Snijders, P. J. (1995): The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. In: *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 4), S. 1057–1062.
- DiMaio, D.; Mattoon, D. (2001): Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. In: *Oncogene* 20 (54), S. 7866–7873. DOI: 10.1038/sj.onc.1204915.
- Dürst, M.; Gissmann, L.; Ikenberg, H.; Zur Hausen, H. (1983): A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 (12), S. 3812–3815.
- Dyson, N. (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins. In: *Genes Dev.* 12 (15), S. 2245–2262.

- Dyson, N.; Howley, P. M.; Münger, K.; Harlow, E. (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. In: *Science* 243 (4893), S. 934–937.
- Ferlay, Jacques; Shin, Hai-Rim; Bray, Freddie; Forman, David; Mathers, Colin; Parkin, Donald Maxwell (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. In: *Int. J. Cancer* 127 (12), S. 2893–2917. DOI: 10.1002/ijc.25516.
- Fischer, Claude A.; Zlobec, Inti; Green, Edith; Probst, Simone; Storck, Claudio; Lugli, Alessandro et al. (2010): Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? In: *Int. J. Cancer* 126 (5), S. 1256–1262. DOI: 10.1002/ijc.24842.
- Foster, S. A.; Demers, G. W.; Etscheid, B. G.; Galloway, D. A. (1994): The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. In: *J. Virol.* 68 (9), S. 5698–5705.
- Franceschi, S.; Levi, F.; La Vecchia, C.; Conti, E.; Dal Maso, L.; Barzan, L.; Talamini, R. (1999): Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer. In: *Int. J. Cancer* 83 (1), S. 1–4.
- Franken, Nicolaas A P; Rodermond, Hans M.; Stap, Jan; Haveman, Jaap; van Bree, Chris (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. In: *Nat Protoc* 1 (5), S. 2315–2319. DOI: 10.1038/nprot.2006.339.
- Frattoni, M. G.; Laimins, L. A. (1994): Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (26), S. 12398–12402.
- Friedman, Jay; Nottingham, Liesl; Duggal, Praveen; Pernas, Francisco G.; Yan, Bin; Yang, Xin Ping et al. (2007): Deficient TP53 expression, function, and cisplatin sensitivity are restored by quinacrine in head and neck cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 13 (22 Pt 1), S. 6568–6578. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1591.
- Funk, J. O.; Waga, S.; Harry, J. B.; Espling, E.; Stillman, B.; Galloway, D. A. (1997): Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. In: *Genes Dev.* 11 (16), S. 2090–2100.
- Gillison, M. L.; Koch, W. M.; Capone, R. B.; Spafford, M.; Westra, W. H.; Wu, L. et al. (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (9), S. 709–720.
- Grénman, R.; Carey, T. E.; McClatchey, K. D.; Wagner, J. G.; Pekkola-Heino, K.; Schwartz, D. R. et al. (1991): In vitro radiation resistance among cell lines established from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *Cancer* 67 (11), S. 2741–2747.
- Gupta, Anjali K.; Lee, John H.; Wilke, Werner W.; Quon, Harry; Smith, Gareth; Maity, Amit et al. (2009): Radiation response in two HPV-infected head-and-neck cancer cell lines in comparison to a non-HPV-infected cell line and relationship to signaling through AKT. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74 (3), S. 928–933. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.03.004.
- Hafkamp, Harriet C.; Speel, Ernst J M; Haesevoets, Annick; Bot, Fredrik J.; Dinjens, Winand N M; Ramaekers, Frans C S et al. (2003): A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. In: *Int. J. Cancer* 107 (3), S. 394–400. DOI: 10.1002/ijc.11389.

- Hafkamp, Harriët C.; Manni, J. J.; Haesevoets, A.; Voogd, A. C.; Schepers, M.; Bot, F. J. et al. (2008): Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. In: *Int. J. Cancer* 122 (12), S. 2656–2664. DOI: 10.1002/ijc.23458.
- Hammarstedt, Lalle; Lindquist, David; Dahlstrand, Hanna; Romanitan, Mircea; Dahlgren, Liselotte Onelöv; Joneberg, Jeanna et al. (2006): Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. In: *Int. J. Cancer* 119 (11), S. 2620–2623. DOI: 10.1002/ijc.22177.
- Heck, Julia E.; Berthiller, Julien; Vaccarella, Salvatore; Winn, Deborah M.; Smith, Elaine M.; Shan'gina, Oxana et al. (2010): Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. In: *Int J Epidemiol* 39 (1), S. 166–181. DOI: 10.1093/ije/dyp350.
- Hocking, J. S.; Stein, A.; Conway, E. L.; Regan, D.; Grulich, A.; Law, M.; Brotherton, J M L (2011): Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. In: *Br. J. Cancer* 104 (5), S. 886–891. DOI: 10.1038/sj.bjc.6606091.
- Hoffman, William H.; Biade, Siham; Zilfou, Jack T.; Chen, Jiandong; Murphy, Maureen (2002): Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. In: *J. Biol. Chem.* 277 (5), S. 3247–3257. DOI: 10.1074/jbc.M106643200.
- Huibregtse, J. M.; Scheffner, M.; Howley, P. M. (1991): A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. In: *EMBO J.* 10 (13), S. 4129–4135.
- Husmann, Gabriele (2010): Krebs in Deutschland. 2005/2006 ; Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 7. Ausg. Berlin, Saarbrücken: Robert Koch-Inst; GEKID (Gesundheitsberichterstattung des Bundes).
- Innocente, S. A.; Abrahamson, J. L.; Cogswell, J. P.; Lee, J. M. (1999): p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (5), S. 2147–2152.
- Kamangar, Farin; Dores, Graça M.; Anderson, William F. (2006): Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. In: *J. Clin. Oncol.* 24 (14), S. 2137–2150. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.2308.
- Kennedy, I. M.; Haddow, J. K.; Clements, J. B. (1991): A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability. In: *J. Virol.* 65 (4), S. 2093–2097.
- Kimple, Randall J.; Smith, Molly A.; Blitzer, Grace C.; Torres, Alexandra D.; Martin, Joshua A.; Yang, Robert Z. et al. (2013): Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. In: *Cancer Res.* DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0587.
- Klussmann, J. P.; Weissenborn, S. J.; Wieland, U.; Dries, V.; Kolligs, J.; Jungehueling, M. et al. (2001): Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. In: *Cancer* 92 (11), S. 2875–2884.
- Klussmann, Jens P.; Gültekin, Elif; Weissenborn, Soenke J.; Wieland, Ulrike; Dries, Volker; Dienes, Hans P. et al. (2003): Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. In: *Am. J. Pathol.* 162 (3), S. 747–753. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63871-0.

- Klussmann, Jens P.; Mooren, Jeroen J.; Lehnen, Martin; Claessen, Sandra M H; Stenner, Markus; Huebbers, Christian U. et al. (2009): Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. In: *Clin. Cancer Res.* 15 (5), S. 1779–1786. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1463.
- Koike, Manabu; Shiomi, Tomoe; Koike, Aki (2005): Identification of Skin injury-related genes induced by ionizing radiation in human keratinocytes using cDNA microarray. In: *J. Radiat. Res.* 46 (2), S. 173–184.
- Korzeniewski, Nina; Spardy, Nicole; Duensing, Anette; Duensing, Stefan (2011): Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. In: *Cancer Lett.* 305 (2), S. 113–122. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.10.013.
- Kreimer, Aimee R.; Alberg, Anthony J.; Daniel, Richard; Gravitt, Patti E.; Viscidi, Rapheal; Garrett, Elizabeth S. et al. (2004): Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. In: *J. Infect. Dis.* 189 (4), S. 686–698. DOI: 10.1086/381504.
- Kreimer, Aimee R.; Clifford, Gary M.; Boyle, Peter; Franceschi, Silvia (2005): Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2), S. 467–475. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.
- Lansford, C. D.; Grenman, R.; Bier, H.; Somers, K. D.; Kim, S. Y.; Whiteside, T. L. et al. (1999): Head and Neck Cancers. In: *Human Cell Culture Vol. 2* (Cancer cell Lines Part 2, Kluwer Academic Press), S. 185–255.
- Lechner, M. S.; Mack, D. H.; Finicle, A. B.; Crook, T.; Vousden, K. H.; Laimins, L. A. (1992): Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. In: *EMBO J.* 11 (8), S. 3045–3052.
- Li, Hui; Yang, Yi; Zhang, Ruifen; Cai, Yupin; Yang, Xi; Wang, Zhiyun et al. (2013): Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. In: *J. Clin. Virol.* 56 (4), S. 342–347. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.12.014.
- Lin, Charles J.; Grandis, Jennifer R.; Carey, Thomas E.; Gollin, Susanne M.; Whiteside, Theresa L.; Koch, Wayne M. et al. (2007): Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. In: *Head Neck* 29 (2), S. 163–188.
- Lindel, Katja; Rieken, Stefan; Daffinger, Sigrid; Weber, Klaus J.; Villiers, Ethel-Michele de; Debus, Jürgen (2012): The transcriptional regulator gene E2 of the Human Papillomavirus (HPV) 16 influences the radiosensitivity of cervical keratinocytes. In: *Radiat Oncol* 7, S. 187. DOI: 10.1186/1748-717X-7-187.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Llewellyn, C. D.; Linklater, K.; Bell, J.; Johnson, N. W.; Warnakulasuriya, K A A S (2003): Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. In: *Oral Oncol.* 39 (2), S. 106–114.
- Loignon, Martin; Drobetsky, Elliot A. (2002): The initiation of UV-induced G(1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. In: *Carcinogenesis* 23 (1), S. 35–45.
- Longworth, Michelle S.; Laimins, Laimonis A. (2004): Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (2), S. 362–372. DOI: 10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004.

- Maltzman, W.; Czyzyk, L. (1984): UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. In: *Mol. Cell. Biol.* 4 (9), S. 1689–1694.
- Massimi, P.; Pim, D.; Bertoli, C.; Bouvard, V.; Banks, L. (1999): Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. In: *Oncogene* 18 (54), S. 7748–7754. DOI: 10.1038/sj.onc.1203208.
- Medrano, E. E.; Im, S.; Yang, F.; Abdel-Malek, Z. A. (1995): Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. In: *Cancer Res.* 55 (18), S. 4047–4052.
- Mesplède, Thibault; Gagnon, David; Bergeron-Labrecque, Fanny; Azar, Ibrahim; Sénéchal, Hélène; Coutlée, François; Archambault, Jacques (2012): p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. In: *J. Virol.* 86 (1), S. 94–107. DOI: 10.1128/JVI.00751-11.
- Mirzayans, Razmik; Andrais, Bonnie; Scott, April; Murray, David (2012): New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. In: *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, S. 170325. DOI: 10.1155/2012/170325.
- Mooren, Jeroen J.; Kremer, Bernd; Claessen, Sandra M H; Voogd, Adri C.; Bot, Fredrik J.; Peter Klussmann, J. et al. (2013): Chromosome stability in tonsillar squamous cell carcinoma is associated with HPV16 integration and indicates a favorable prognosis. In: *Int. J. Cancer* 132 (8), S. 1781–1789. DOI: 10.1002/ijc.27846.
- Münger, K.; Basile, J. R.; Duensing, S.; Eichten, A.; Gonzalez, S. L.; Grace, M.; Zacny, V. L. (2001): Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. In: *Oncogene* 20 (54), S. 7888–7898. DOI: 10.1038/sj.onc.1204860.
- Münger, K.; Phelps, W. C.; Bubb, V.; Howley, P. M.; Schlegel, R. (1989a): The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. In: *J. Virol.* 63 (10), S. 4417–4421.
- Münger, K.; Werness, B. A.; Dyson, N.; Phelps, W. C.; Harlow, E.; Howley, P. M. (1989b): Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. In: *EMBO J.* 8 (13), S. 4099–4105.
- Nagel, Remco; Martens-de Kemp, Sanne R; Buijze, Marijke; Jacobs, Gerbren; Braakhuis, Boudewijn J M; Brakenhoff, Ruud H. (2013): Treatment response of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines. In: *Oral Oncol.* 49 (6), S. 560–566. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.03.446.
- Niemantsverdriet, Maarten; Jongmans, Wim; Backendorf, Claude (2005): Radiation response and cell cycle regulation of p53 rescued malignant keratinocytes. In: *Exp. Cell Res.* 310 (1), S. 237–247. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.07.016.
- Oh, S. T.; Kyo, S.; Laimins, L. A. (2001): Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. In: *J. Virol.* 75 (12), S. 5559–5566. DOI: 10.1128/JVI.75.12.5559-5566.2001.
- Olthof, Nadine C.; Straetmans, Jos M J A A; Snoeck, Robert; Ramaekers, Frans C S; Kremer, Bernd; Speel, Ernst-Jan M. (2012): Next-generation treatment strategies for human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinoma: where do we go? In: *Rev. Med. Virol.* 22 (2), S. 88–105. DOI: 10.1002/rmv.714.
- Pai, Sara I.; Westra, William H. (2009): Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. In: *Annu Rev Pathol* 4, S. 49–70. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158.

- Pang, Ervinna; Delic, Naomi C.; Hong, Angela; Zhang, Mei; Rose, Barbara R.; Lyons, J. Guy (2011): Radiosensitization of oropharyngeal squamous cell carcinoma cells by human papillomavirus 16 oncoprotein E6*1. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 79 (3), S. 860–865. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.06.028.
- Parkin, D. Max; Bray, Freddie; Ferlay, J.; Pisani, Paola (2005): Global cancer statistics, 2002. In: *CA Cancer J Clin* 55 (2), S. 74–108.
- Parkin, D. Maxwell; Bray, Freddie (2006): Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. In: *Vaccine* 24 Suppl 3, S. S3/11-25. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.05.111.
- Patel, V.; Ensley, J. F.; Gutkind, J. S.; Yeudall, W. A. (2000): Induction of apoptosis in head-and-neck squamous carcinoma cells by gamma-irradiation and bleomycin is p53-independent. In: *Int. J. Cancer* 88 (5), S. 737–743.
- Pernot, Eileen; Hall, Janet; Baatout, Sarah; Benotmane, Mohammed Abderrafi; Blanchardon, Eric; Bouffler, Simon et al. (2012): Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. In: *Mutat. Res.* 751 (2), S. 258–286. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.05.003.
- Pfaffl, M. W. (2004): Quantification strategies in real-time PCR Quantification strategies in real-time PCR. In: *A-Z of quantitative PCR, International University Line (IUL)*, S. 87–112.
- Pim, D.; Massimi, P.; Banks, L. (1997): Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. In: *Oncogene* 15 (3), S. 257–264. DOI: 10.1038/sj.onc.1201202.
- Preuss, S. F.; Weinell, A.; Molitor, M.; Stenner, M.; Semrau, R.; Drebber, U. et al. (2008): Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer. In: *Br. J. Cancer* 98 (3), S. 627–632. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604192.
- PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. (1956): Action of x-rays on mammalian cells. In: *J. Exp. Med.* 103 (5), S. 653–666.
- Rieckmann, Thorsten; Tribius, Silke; Grob, Tobias J.; Meyer, Felix; Busch, Chia-Jung; Petersen, Cordula et al. (2013): HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. In: *Radiother Oncol* 107 (2), S. 242–246. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.03.013.
- Ritchie, Justine M.; Smith, Elaine M.; Summersgill, Kurt F.; Hoffman, Henry T.; Wang, Donghong; Klussmann, Jens P. et al. (2003): Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. In: *Int. J. Cancer* 104 (3), S. 336–344. DOI: 10.1002/ijc.10960.
- Roberts, S.; Ashmole, I.; Gibson, L. J.; Rookes, S. M.; Barton, G. J.; Gallimore, P. H. (1994): Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. In: *J. Virol.* 68 (10), S. 6432–6445.
- Roberts, S.; Ashmole, I.; Rookes, S. M.; Gallimore, P. H. (1997): Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. In: *J. Virol.* 71 (5), S. 3554–3562.
- Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *J. Biol. Chem.* 273 (10), S. 5858–5868.

- Romanczuk, H.; Howley, P. M. (1992): Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (7), S. 3159–3163.
- Sano, T.; Oyama, T.; Kashiwabara, K.; Fukuda, T.; Nakajima, T. (1998): Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. In: *Am. J. Pathol.* 153 (6), S. 1741–1748. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65689-1.
- Santana, Carla; Ortega, Enrique; García-Carrancá, Alejandro (2002): Oncogenic H-ras induces cyclin B1 expression in a p53-independent manner. In: *Mutat. Res.* 508 (1-2), S. 49–58.
- Scheffner, M.; Takahashi, T.; Huibregtse, J. M.; Minna, J. D.; Howley, P. M. (1992): Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. In: *J. Virol.* 66 (8), S. 5100–5105.
- Scheffner, M.; Werness, B. A.; Huibregtse, J. M.; Levine, A. J.; Howley, P. M. (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. In: *Cell* 63 (6), S. 1129–1136.
- Seedorf, K.; Krämer, G.; Dürst, M.; Suhai, S.; Röwekamp, W. G. (1985): Human papillomavirus type 16 DNA sequence. In: *Virology* 145 (1), S. 181–185.
- Shiboski, Caroline H.; Schmidt, Brian L.; Jordan, Richard C K (2005): Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. In: *Cancer* 103 (9), S. 1843–1849. DOI: 10.1002/cncr.20998.
- Shieh, S. Y.; Ikeda, M.; Taya, Y.; Prives, C. (1997): DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. In: *Cell* 91 (3), S. 325–334.
- Shirasawa, H.; Jin, M. H.; Shimizu, K.; Akutsu, N.; Shino, Y.; Simizu, B. (1994): Transcription-modulatory activity of full-length E6 and E6*I proteins of human papillomavirus type 16. In: *Virology* 203 (1), S. 36–42. DOI: 10.1006/viro.1994.1452.
- Sinha, Parul; Logan, Henrietta L.; Mendenhall, William M. (2012): Human papillomavirus, smoking, and head and neck cancer. In: *Am J Otolaryngol* 33 (1), S. 130–136. DOI: 10.1016/j.amjoto.2011.02.001.
- Slebos, R. J.; Lee, M. H.; Plunkett, B. S.; Kesisis, T. D.; Williams, B. O.; Jacks, T. et al. (1994): p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (12), S. 5320–5324.
- Smith, Benjamin; Chen, Zigui; Reimers, Laura; van Doorslaer, Koenraad; Schiffman, Mark; Desalle, Rob et al. (2011): Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. In: *PLoS ONE* 6 (6), S. e21375. DOI: 10.1371/journal.pone.0021375.
- Spanos, William C.; Nowicki, Paul; Lee, Dong Wook; Hoover, Andrew; Hostager, Bruce; Gupta, Anjali et al. (2009): Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. In: *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 135 (11), S. 1137–1146. DOI: 10.1001/archoto.2009.159.
- St Clair, Selvon; Giono, Luciana; Varmeh-Ziaie, Shohreh; Resnick-Silverman, Lois; Liu, Wen-Jun; Padi, Abhilash et al. (2004): DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. In: *Mol. Cell* 16 (5), S. 725–736. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.11.002.

- Stauber, Roland H.; Mann, Wolf; Knauer, Shirley K. (2007): Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. In: *Cancer Res.* 67 (13), S. 5999–6002. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0494.
- Steenbergen, R. D.; Hermsen, M. A.; Walboomers, J. M.; Joenje, H.; Arwert, F.; Meijer, C. J.; Snijders, P. J. (1995): Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. In: *Cancer Res.* 55 (22), S. 5465–5471.
- Stöppler, M. C.; Ching, K.; Stöppler, H.; Clancy, K.; Schlegel, R.; Icenogle, J. (1996): Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. In: *J. Virol.* 70 (10), S. 6987–6993.
- Talis, A. L.; Huijbregtse, J. M.; Howley, P. M. (1998): The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. In: *J. Biol. Chem.* 273 (11), S. 6439–6445.
- Tang, Alice L.; Hauff, Samantha J.; Owen, John H.; Graham, Martin P.; Czerwinski, Michael J.; Park, Jung Je et al. (2012): UM-SCC-104: a new human papillomavirus-16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line. In: *Head Neck* 34 (10), S. 1480–1491. DOI: 10.1002/hed.21962.
- Thomas, M.; Pim, D.; Banks, L. (1999): The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. In: *Oncogene* 18 (53), S. 7690–7700. DOI: 10.1038/sj.onc.1202953.
- Tobita, T.; Izumi, K.; Feinberg, S. E. (2010): Development of an in vitro model for radiation-induced effects on oral keratinocytes. In: *Int J Oral Maxillofac Surg* 39 (4), S. 364–370. DOI: 10.1016/j.ijom.2009.12.020.
- van den Brule, A J; Meijer, C. J.; Bakels, V.; Kenemans, P.; Walboomers, J. M. (1990): Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. In: *J. Clin. Microbiol.* 28 (12), S. 2739–2743.
- Volkmer, Martin (1994): Radioaktivität und Strahlenschutz. 2., aktualisierte Aufl., 121. - 170. Tsd. Hamburg: Hamburgische Electricitäts-Werke.
- Wald, Abigail I.; Hoskins, Elizabeth E.; Wells, Susanne I.; Ferris, Robert L.; Khan, Saleem A. (2011): Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. In: *Head Neck* 33 (4), S. 504–512. DOI: 10.1002/hed.21475.
- Wang, Yong; Schulte, Bradley A.; LaRue, Amanda C.; Ogawa, Makio; Zhou, Daohong (2006): Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. In: *Blood* 107 (1), S. 358–366. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1418.
- Warters, Raymond L.; Packard, Ann T.; Kramer, Gwen F.; Gaffney, David K.; Moos, Philip J. (2009): Differential gene expression in primary human skin keratinocytes and fibroblasts in response to ionizing radiation. In: *Radiat. Res.* 172 (1), S. 82–95. DOI: 10.1667/RR1677.1.
- Wentzensen, Nicolas; Vinokurova, Svetlana; von Knebel Doeberitz, Magnus (2004): Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. In: *Cancer Res.* 64 (11), S. 3878–3884. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0009.
- Werness, B. A.; Levine, A. J.; Howley, P. M. (1990): Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. In: *Science* 248 (4951), S. 76–79.

- White, A. E.; Livanos, E. M.; Tlsty, T. D. (1994): Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. In: *Genes Dev.* 8 (6), S. 666–677.
- White, Jason S.; Weissfeld, Joel L.; Ragin, Camille C R; Rossie, Karen M.; Martin, Christa Lese; Shuster, Michele et al. (2007): The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. In: *Oral Oncol.* 43 (7), S. 701–712. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2006.09.001.
- Wiest, Tina; Schwarz, Elisabeth; Enders, Christel; Flechtenmacher, Christa; Bosch, Franz X. (2002): Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. In: *Oncogene* 21 (10), S. 1510–1517. DOI: 10.1038/sj.onc.1205214.
- Wittekindt, C.; Wagner, S.; Mayer, C. S.; Klußmann, J. P. (2012): Grundlagen der Tumorentstehung und die Bedeutung Humaner Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen. In: *Laryngorhinootologie* 91 Suppl 1, S. S1-26. DOI: 10.1055/s-0031-1297241.
- Yang, L.; Mohr, I.; Fouts, E.; Lim, D. A.; Nohaile, M.; Botchan, M. (1993): The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (11), S. 5086–5090.
- Yuan, Chung-Hsiang; Filippova, Maria; Duerksen-Hughes, Penelope (2012): Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. In: *Viruses* 4 (12), S. 3831–3850. DOI: 10.3390/v4123831.
- Zerfass, K.; Schulze, A.; Spitkovsky, D.; Friedman, V.; Henglein, B.; Jansen-Dürr, P. (1995): Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. In: *J. Virol.* 69 (10), S. 6389–6399.
- Zhao, Mei; Sano, Daisuke; Pickering, Curtis R.; Jasser, Samar A.; Henderson, Ying C.; Clayman, Gary L. et al. (2011): Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. In: *Clin. Cancer Res.* 17 (23), S. 7248–7264. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0690.
- Zhou, J.; Sun, X. Y.; Louis, K.; Frazer, I. H. (1994): Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. In: *J. Virol.* 68 (2), S. 619–625.
- Zur Hausen, H. (1996): Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1288 (2), S. F55-78.
- Zur Hausen, H.; Meinhof, W.; Scheiber, W.; Bornkamm, G. W. (1974): Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. In: *Int. J. Cancer* 13 (5), S. 650–656.
- Zur Hausen, Harald (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. In: *Nat. Rev. Cancer* 2 (5), S. 342–350. DOI: 10.1038/nrc798.

11 Publikationsverzeichnis

Arenz A, Ziemann F, **Mayer C**, Wittig A, Dreffke K, Preising S, Wagner S, Klusmann JP, Engenhardt-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. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2014; PMID: 24715240 [Epub ahead of print]

Wittekindt C, Wagner S, **Mayer CS**, Klußmann JP (2012): Grundlagen der Tumorentstehung und die Bedeutung Humaner Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen. *Laryngo-Rhino-Otol* 2012; 91: S1–S26; PMID: 22456913 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York ISSN 1439-9121

Wittekindt C, Wagner S, **Mayer CS**, Klußmann JP (2012): Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2012; 11:Doc09; PMID: 23320061

Wagner S, **Mayer C**, Wittekindt C, Klußmann JP (2012): Humane Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen. *Hautarzt*, 2012; 63(1): 24-9; PMID: 22179127 © Springer-Verlag 2011

Schmidt R, Peters U, **Mayer C** (2012): Schleimhautschutz des Neugeborenen – Beobachtungen im Rahmen einer Allergieprävention mit Probiotika. *OM & Ernährung*, Nr. 141

Babuke T, Ruonala MO, Meister M, Amaddii M, **Genzler C**, Esposito A, Tikkanen R (2009): Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cell Sign*, 2009; 21(8): 1287-97; PMID: 19318123

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Für die Möglichkeit, diese Arbeit im HNO-Forschungslabor des Uniklinikums Gießen durchführen zu dürfen bedanke ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Jens Peter Klußmann.

Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic spreche ich meinen Dank aus für die Ermöglichung der Durchführung der Bestrahlungsversuche im Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Phillips-Universität Marburg.

Für die Bedienung der Röntgenröhre für Zellkulturexperimente im Biomedizinischen Forschungszentrum in Marburg, sowie deren Bereitstellung als Strahlenschutzbeauftragte danke ich Dr. Kristin Dreffke und Dr. Andrea Arenz. Weiterhin gilt mein Dank den Physikern Prof. Klemens Zink, Frank Ubrich, Enrico Dittrich und Ralf Hoffmann, die den Linearbeschleuniger in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie bedient haben, sowie die Dosimetrie erstellt und für jedes Experiment den Strahlenschutzbeauftragten gestellt haben.

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Claus Wittekindt und Dr. Steffen Wagner für die hervorragende Betreuung und die fortwährende Unterstützung bei Erstellung dieser Arbeit. Ebenso bei Dr. Andrea Arenz der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Phillips-Universität Marburg für die Betreuung und praktischen Hilfeleistungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Für die Korrektur dieser Arbeit danke ich Prof. Engenhardt-Cabillic und Priv. Doz. Dr. Andrea Wittig aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie herzlich.

Maike Roth aus dem Gießener Forschungslabor trug durch ihre technischen Hilfestellungen, ihr stetes Engagement und nicht zuletzt durch ihre sehr gute Zusammenarbeit zum Gelingen dieser Arbeit bei. Stefanie Preising und Frank Ziemann förderten die Anfertigung dieser Arbeit ebenfalls durch vielseitige technische Unterstützung im Labor für Strahlentherapie am Standort Marburg.

Den Ärztinnen Shachi Jenny Sharma und Dr. Claudia Holler danke ich für die gute Zusammenarbeit und technische Unterstützung im Forschungslabor in Gießen.

Mein großer Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinem Mann Markus, der mich zu jeder Zeit nach Kräften unterstützte und mir immer den nötigen Rückhalt gab.