

Aus der  
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss der Bortezomib-induzierten p53-Reaktivierung  
auf die Strahlen- und Chemosensibilität  
HPV-assoziiertes  
Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Steve Seltz**  
aus Potsdam

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 31.08.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Frau Prof. Dr. A. Wittig
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. R. Mandić

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung Kopf-Hals-Tumoren.....	1
1.1.1 Epidemiologische Kennzahlen.....	1
1.1.2 Klinische Präsentation.....	2
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.4 Therapie und Prognose von HNSCC.....	3
1.2 Biologische Grundlagen HPV-assoziiertes HNSCC.....	5
1.2.1 Humane Papillomaviren.....	5
1.2.2 p53-/p21-Signalweg.....	6
1.2.3 Funktion und Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems.....	7
1.2.4 Beeinträchtigter p53-/p21-Signalweg in HPV-assoziierten HNSCC.....	8
1.2.5 Zelluläre Effekte der Standardtherapeutika auf HNSCC-Zellen.....	9
1.3 Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib.....	11
1.3.1 Aufbau und Wirkweise von Bortezomib.....	11
1.4 Fragestellung.....	12
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Material.....	14
2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	14
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	14
2.1.3 Zelllinien.....	19
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkultur.....	21
2.2.2 Untersuchungen zur Zellviabilität.....	24
2.2.3 Proteinbiochemische Untersuchungen.....	25
2.2.4 Zellzyklusanalyse.....	29

Inhaltsverzeichnis	II
2.2.5 Untersuchungen zur Apoptoseinduktion .....	31
2.2.6 Koloniebildungstests.....	33
2.2.7 Statistische Auswertung .....	35
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Zellviabilität .....	36
3.2 Proteinbiochemische Untersuchungen.....	37
3.2.1 Wirkung von Bortezomib auf die Expression von p53 und p21 .....	37
3.2.2 Wirkung von Bortezomib und Bestrahlung auf die Proteinexpression ....	40
3.3 Zellzyklusanalyse .....	43
3.4 Apoptoseinduktion.....	47
3.5 Klonogenes Überleben.....	49
3.5.1 Behandlung mit Bortezomib.....	49
3.5.2 Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung.....	51
3.5.3 Behandlung mit Bortezomib und Cisplatin .....	53
3.5.4 Behandlung mit Bortezomib, Cisplatin und Bestrahlung .....	54
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>57</b>
4.1 Auswahl der Zelllinien .....	57
4.2 Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität.....	57
4.3 Mechanistische Untersuchungen zur funktionellen p53-Reaktivierung ....	58
4.3.1 Bortezomib-induzierte Reaktivierung von p53.....	58
4.3.2 Einfluss von Bortezomib und Bestrahlung auf den Zellzyklus .....	60
4.3.3 Einfluss von Bortezomib, Cisplatin und Bestrahlung auf die Apoptose ..	61
4.4 Untersuchungen zur Effektivität der funktionellen p53-Reaktivierung .....	62
4.4.1 Koloniebildungstests mit Bortezomib .....	63
4.4.2 Koloniebildungstests mit Bestrahlung und Cisplatin.....	63
4.4.3 Untersuchungen zur Strahlen-/ Chemosensibilisierung durch Bortezomib .....	64
4.5 Klinische Daten zu Bortezomib in der Behandlung von HNSCC.....	66
4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	68
<b>5 Deutschsprachige Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>

Inhaltsverzeichnis	III
<b>6</b>	<b>Englischsprachige Zusammenfassung..... 71</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis..... 72</b>
<b>8</b>	<b>Anhang..... 85</b>
8.1	Anhang A..... 85
8.2	Curriculum Vitae ..... 92
8.3	Liste der Publikationen..... 93
8.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer ..... 95
8.5	Danksagung..... 96
8.6	Ehrenwörtliche Erklärung ..... 98

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Dieses Verzeichnis enthält die im Text verwendeten Abkürzungen. Nicht enthalten sind die Einheiten des Internationalen Einheitensystems.

Abb.	Abbildung
BSA	Bovines Serumalbumin
BZM	Bortezomib
CDDP	cis-Diammindichloridoplatin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
E6AP	E6-aktivierendes Protein
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
FBS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>g</i>	Fallbeschleunigung (1 <i>g</i> entspricht 9,81 m/s <sup>2</sup> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HNSCC	Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region ( <i>head and neck squamous cell carcinoma</i> )
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IR	Ionisierende Strahlung ( <i>ionizing radiation</i> )
kDa	Kilodalton
m	männlich
mdm2	mouse double minute 2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der Einzelversuche
n. s.	nicht signifikant
NF-κB	Nuclear Factor-κB
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, 1x ( <i>phosphate buffered saline</i> )

---

PE	Plattierungseffizienz
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidiumiodid
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rel.	relativ
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts ( <i>standard error of the mean</i> )
SF	Überlebensfraktion ( <i>surviving fraction</i> )
siRNA	small interfering RNA
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung ( <i>TRIS buffered saline</i> )
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
w	weiblich
WST-1	water soluble tetrazolium-1 ( <i>4-(3-[4-Iodophenyl]-2-[4-nitrophenyl]-2H-5-tetrazolio)-1,3-Benzol-Disulfonat</i> )

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Hypothese der Pathomechanismen des p53-Stoffwechsels in HNSCC sowie deren Beeinflussung durch Bortezomib .....	13
Abb. 2: Wirkung von Bortezomib auf die Zellviabilität.....	36
Abb. 3: Wirkung von Bortezomib auf die Proteinexpression von p53 und p21.....	38
Abb. 4: Unterschiedliche Proteinexpression nach Behandlung mit Bortezomib.....	39
Abb. 5: Wirkung von Bortezomib und Bestrahlung auf die Proteinexpression. ....	41
Abb. 6: Veränderte Proteinexpression nach Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung.....	42
Abb. 7: Beeinflussung der Zellzyklusprogression durch Bortezomib und Bestrahlung. 44	
Abb. 8: Stratifikation der Zellzyklusprogression nach HPV-Status.....	46
Abb. 9: Apoptoseinduktion durch Bortezomib und Kombinationsbehandlungen. ....	48
Abb. 10: Konzentrationsabhängige Reduktion des klonogenen Überlebens durch Bortezomib.....	50
Abb. 11: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung..	51
Abb. 12: Wachstumsverzögerung durch Bortezomib.....	52
Abb. 13: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Bortezomib und Cisplatin. ....	53
Abb. 14: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Bortezomib, Cisplatin und Bestrahlung.....	55



---

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Überblick über HPV-negative und HPV-positive HNSCC.....	5
Tabelle 2: Zusammensetzung des Zellkulturmediums.....	18
Tabelle 3: Eigenschaften der verwendeten Antikörper. ....	19
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien.....	20
Tabelle 5: Technische Bestrahlungsparameter. ....	22
Tabelle 6: Rezepturen für die verwendeten Cisplatin-Konzentrationen. ....	24
Tabelle 7: Alphabetische Auflistung der verwendeten Gebrauchsmaterialien. ....	85
Tabelle 8: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte. ....	86
Tabelle 9: Alphabetische Auflistung der verwendeten Software.....	88
Tabelle 10: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	89

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Einführung Kopf-Hals-Tumoren

### 1.1.1 Epidemiologische Kennzahlen

Beim Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region handelt es sich um eine häufige Tumorerkrankung. Laut den aktuellen Daten des Robert-Koch-Instituts (2016) wurden in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2013 12 992 Neuerkrankungen bei Männern (entsprechend einer Inzidenz von 32,9 je 100 000 Einwohner) und 4 532 Neuerkrankungen bei Frauen (entsprechend einer Inzidenz von 11,0 je 100 000 Einwohner) registriert. Somit stellten HNSCC für Männer die sechsthäufigste und für Frauen die zwölft häufigste maligne Tumorentität in Deutschland dar. Das mittlere Erkrankungsalter ist mit 63,8 Jahren (Männer) und 66,2 Jahren (Frauen) bei beiden Geschlechtern vergleichbar. Insgesamt wurden 7 192 Sterbefälle (5 494 (Männer) und 1 698 (Frauen)) registriert (Robert-Koch-Institut 2016).

Sowohl in Deutschland, als auch in vielen anderen europäischen Ländern zeigt sich für Kopf-Hals-Tumoren langfristig ein Anstieg der Inzidenz, insbesondere bei Frauen. Bei Männern hingegen zeigt sich diesbezüglich eine stabile Entwicklung – jedoch bei deutlich höherer Gesamtzahl an Erkrankten (Simard et al. 2014; Robert-Koch-Institut 2016). Wie im Folgenden beschrieben, sind dabei jedoch deutliche Unterschiede in den Subgruppen der Kopf-Hals-Tumoren auszumachen.

Entsprechend der anatomischen Lokalisation des Primärtumors ergibt sich die Einteilung in Hypopharynx-, Oropharynx-, Nasopharynx- und Larynxkarzinome (Marur et al. 2016). Oropharynxkarzinome, insbesondere Mundhöhlen- und Tonsillenkarzinome, stellen dabei die häufigste Lokalisation dar und zeigten in den vergangenen Jahren einen starken Inzidenzanstieg in europäischen Ländern, während die Inzidenzen der Tumoren an den anderen Lokalisationen gering abnahmen (Simard et al. 2014).

### 1.1.2 Klinische Präsentation

Die Symptomatik der Erkrankung ist stark von der Lokalisation des Tumors sowie seiner Ausbreitung abhängig. Führend sind hierbei Beschwerden wie nasale Sprache, Heiserkeit, Dysphagie, Ulzerationen, Blutungen, Dyspnoe, inspiratorischer Stridor, Husten oder Schmerzen. Das Fehlen charakteristischer Frühzeichen sowie die unspezifische Symptomatik führen dazu, dass eine Vielzahl der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird (Argiris et al. 2008). Bei Diagnosestellung sind bei über 40 % der Patienten bereits lokoregionale Lymphknotenmetastasen und bei bis zu 10 % Fernmetastasen nachweisbar (Marur et al. 2016).

### 1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Kopf-Hals-Tumoren entwickeln sich in über 95 % der Fälle aus nicht-verhornendem Plattenepithel der Schleimhäute. Die Tumoren metastasieren primär lymphogen in die lokoregionalen Lymphknoten und erst spät hämatogen (Leemans et al. 2011).

Seit langem bekannte Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCC sind die toxischen Substanzen Alkohol und Nikotin, die über den Zwischenschritt einer Zelldysplasie die Transformation in ein invasives Karzinom auslösen. Die genannten Risikofaktoren führen zur Entstehung *Noxen-induzierter HNSCC*. Während im Tabakrauch enthaltene Karzinogene hauptsächlich genotoxisch wirken, wird dem Alkohol vor allem die Rolle als Lösungsmittel für diese Substanzen zugeschrieben. Pathogenetisch kommt es zu einer Akkumulation von genetischen Mutationen, die die Tumorprogression vorantreiben (Wittekindt et al. 2012). In bis zu 80 % der Fälle liegt eine Mutation im *TP53*-Gen vor, welche zu einer Dysfunktion des Tumorsuppressorproteins p53 und dessen nachgeschalteten Signalwegen führt (Braakhuis et al. 2004; Leemans et al. 2011; Riaz et al. 2014; Chung et al. 2015; Tinhofer et al. 2016).

Die Verlagerung des Altersgipfels zu einem deutlich jüngeren Alter der Patienten mit Oropharynxkarzinom, insbesondere bei Nichtrauchern, führte im letzten Jahrzehnt zu der Vermutung, dass ein weiterer unabhängiger Risikofaktor für die Tumorentstehung ursächlich sein könnte. Unter den Erkrankten konnte ein hoher Anteil an Patienten identifiziert werden, deren Schleimhaut mit Humanen Papillomaviren (HPV) infiziert war (Gillison et al. 2000; Wittekindt et al. 2012). Mittlerweile stellt die Infektion mit HPV einen anerkannten Risikofaktor für die Entstehung eines HNSCC dar, wobei diese Tumoren aufgrund deutlich differenter biologischer Eigenschaften als eigene Entität angesehen werden (Leemans et al. 2011). Im Gegensatz zu Noxen-induzierten HNSCC ist für

*HPV-assoziierte HNSCC* charakteristisch, dass Tumorsuppressorgene wie *TP53* häufig in der Wildtyp-Form vorliegen (Braakhuis et al. 2004; Chung et al. 2015; Tinhofer et al. 2016). Pathogenetisch vordergründig scheinen bei dieser Subgruppe HPV-bedingte Inhibitionsprozesse von Tumorsuppressor-Signalwegen zu sein, anstatt einer erhöhten Mutationslast wie bei Noxen-induzierten HNSCC (Leemans et al. 2011).

Die pathogenetischen Zusammenhänge auf molekularer Basis sind für beide Entitäten weiter unten erörtert.

#### 1.1.4 Therapie und Prognose von HNSCC

Die Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Kopf-Hals-Region erfolgt stadienabhängig im Rahmen eines multimodalen Konzepts, welches die chirurgische Resektion, die Strahlentherapie, eine zytostatische Chemotherapie sowie zielgerichtete Therapeutika beinhalten kann. Eine Therapiestratifizierung nach Ätiologie und Risikofaktoren ist bisher nicht etabliert. Für die evidenzbasierte Therapie bestehen Empfehlungen der Fachgesellschaften, die im Folgenden für das Oropharynxkarzinom dargestellt sind (Wolff et al. 2012; Quon et al. 2017; Sher et al. 2017).

In lokal begrenzten Tumorstadien ist eine primäre Resektion des Tumors indiziert, die eine komplette Tumorresektion mit ausreichendem Sicherheitssaum sowie die Resektion der lokoregionalen Lymphknoten auch bei klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus erfordert (Wolff et al. 2012).

In fortgeschrittenen Tumorstadien, etwa mit Infiltration der benachbarten Strukturen, Lymphknotenbefall oder extrakapsulärem Tumorwachstum, erfolgt eine adjuvante Bestrahlung oder Cisplatin-basierte Radiochemotherapie (Wolff et al. 2012; Sher et al. 2017).

Bei Inoperabilität aber fehlender Fernmetastasierung ist eine primäre Cisplatin-haltige Radiochemotherapie im Rahmen eines kurativen Konzepts indiziert. In palliativen Therapiesituationen hat die Radio(chemo)-therapie ebenfalls einen hohen Stellenwert zur Linderung der tumorassoziierten Beschwerden (Wolff et al. 2012; Quon et al. 2017).

Die Operation, aber auch die Radiochemotherapie, bergen ein relevantes Nebenwirkungspotential, was insbesondere bei älteren und multimorbiden Patienten in bis zu 50 % der Fälle eine Dosisreduktion notwendig macht oder zum Therapieabbruch führen kann (O'Neill et al. 2015). Führend sind unerwünschte Wirkungen wie Strahlentherapie-induzierte Stomatitis, schmerzhaftes Dysphagie und Xerostomie sowie Cisplatin-

induzierte Blutbildveränderungen und insbesondere die Cisplatin-induzierte Neuro-, Oto- und Nephrotoxizität (Wolff et al. 2012; O'Neill et al. 2015; Huang et al. 2016).

Die Prognose von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx hängt vom Tumorstadium bei Diagnosestellung sowie der Ätiologie der Erkrankung ab. Insbesondere in den fortgeschrittenen Tumorstadien wird die Prognose wesentlich von der adjuvanten nicht-chirurgischen Therapie beeinflusst. Während die alleinige adjuvante Chemotherapie zu keiner signifikanten Prognoseverbesserung führt (Pignon et al. 2000), verbessert eine Cisplatin-basierte Radiochemotherapie das Gesamtüberleben entscheidend (Pignon et al. 2000; Bourhis et al. 2012).

Das Vorliegen einer *TP53*-Mutation, die häufig bei Noxen-induzierten HNSCC vorhanden sind, erwies sich als negativer prognostischer Faktor bezüglich des Gesamtüberlebens (Poeta et al. 2007), so dass dieses Gen eine erhebliche klinische Relevanz hat.

Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen zeigen hingegen ein besseres Ansprechen auf eine Radiochemotherapie als Patienten mit HPV-negativen Tumoren. Das bessere Therapieansprechen übersetzt sich zudem in ein besseres Gesamtüberleben (3-Jahres-Gesamtüberleben 82,4 % bei HPV-positiven, 57,1 % bei HPV-negativen Tumoren in den Stadien III und IV) (Ang et al. 2010). Die hohe klinische Relevanz dieser Beobachtung findet Ausdruck durch die aktuelle Änderung der Stadieneinteilung der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region, bei der HPV-assoziierte Tumoren von Noxen-induzierten Tumoren künftig unterschieden werden, um der prognostischen Bedeutung der Tumorätiologie Rechnung zu tragen (Malm et al. 2017).

Die tumorbiologischen und molekularen Gründe für dieses verbesserte Therapieansprechen sind allerdings bisher nicht abschließend geklärt (Psyrrri et al. 2014). Trotzdem werden aktuell in klinischen Studien Ansätze zur Therapie-Deintensivierung HPV-assoziiierter HNSCC untersucht mit dem Ziel der Verringerung therapieassoziierter Nebenwirkungen bei gleichbleibend guter lokaler Tumorkontrolle und Gesamtüberleben (O'Sullivan et al. 2013; Kofler et al. 2014; Mirghani et al. 2015).

Die bekannten Unterschiede HPV-assoziiierter und Noxen-induzierter HNSCC sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Überblick über HPV-negative und HPV-positive HNSCC.

Charakteristikum	HPV-negative HNSCC	HPV-positive HNSCC
Inzidenz	abnehmend bis stabil	zunehmend
Ätiologie	Tabak- und Alkoholkonsum	Infektion mit HPV
Erkrankungsalter	> 60 Jahre	< 60 Jahre
TP53-Mutationen	sehr häufig	selten
Prädilektionsstelle	keine	Oropharynx
Prognose	ungünstig	günstig
Therapie	Chirurgie, Cisplatin-basierte Radiochemotherapie, Cetuximab	

modifiziert nach (Leemans et al. 2011).

## 1.2 Biologische Grundlagen HPV-assoziiertes HNSCC

### 1.2.1 Humane Papillomaviren

Humane Papillomaviren (HPV) sind eine Gruppe doppelsträngiger DNA-Viren, welche einen Tropismus gegenüber Plattenepithelien aufweisen (McLaughlin-Drubin et al. 2009). Nach ersten Untersuchungen in den 1970er Jahren (zur Hausen et al. 1974) sind heutzutage ca. 200 Subtypen bekannt, die mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert sind. Klinisch hat sich dabei die Einteilung in so genannte Niedrigrisiko- („low-risk“) und Hochrisikotypen („high-risk“) etabliert. Während low-risk-HPV-Viren (HPV6, HPV11 u.a.) Erkrankungen wie benigne Warzen auslösen, sind high-risk HPV (HPV16, HPV18 u.a.) Onkoviren mit dem Potential der Induktion von Plattenepithelkarzinomen.

Die Übertragung von HPV erfolgt sexuell (McLaughlin-Drubin et al. 2009). Die Infektion mit high-risk HPV ist Ursache für die Entstehung von Karzinomen der Cervix uteri. Zudem ist eine starke Assoziation mit dem Penis- und Analkarzinom bekannt (McLaughlin-Drubin et al. 2009). Die Assoziation von high-risk HPV mit HNSCC wird vor allem mit dem Praktizieren von oralem Geschlechtsverkehr in Verbindung gebracht (Wittekindt et al. 2012). Aktuelle Studien gehen von einer HPV-Infektion in bis zu 45 % der Karzinome des Oropharynx aus, wobei Tonsillenkarzinome in bis zu 54 % der Fälle HPV-assoziiert sind (Ndiaye et al. 2014). Während die HPV-Assoziation bei Oropharynx-

rynix-Karzinomen über die Zeit stark anstieg, blieb diese bei den anderen HNSCC-Lokalisationen stabil (Mehanna et al. 2013). Häufigster HPV-Subtyp ist in HNSCC mit über 80 % HPV16 (Ndiaye et al. 2014).

Für den Nachweis der HPV-Assoziation eines Tumors steht neben dem direkten DNA-Nachweis im Tumor der immunhistochemische Nachweis des Surrogatmarkers p16<sup>Ink4A</sup> zur Verfügung (Wittekindt et al. 2012). Da das Vorgehen für den HPV-Nachweis bisher nicht einheitlich erfolgt und zwischen den Analysemethoden deutliche Abweichungen bestehen (Wittekindt et al. 2012), sind die Angaben zur HPV-Assoziation in HNSCC schwankend.

Humane Papillomaviren infizieren die basalen Plattenepithelschichten und vermehren sich im Verlauf der Differenzierung der Epithelzellen bis zur Superfizialschicht, wo sie letztlich die Zellen verlassen und zur Transmission an der Oberfläche zur Verfügung stehen (zur Hausen 2002). Das virale Genom kodiert für acht Proteine, denen in unterschiedlichem Ausmaß eine Beteiligung an der onkogenen Wirkung zugeschrieben wird. Von essenzieller Bedeutung für die maligne Transformation sind die Proteine E6 und E7, die beständig in HPV-induzierten Malignomen exprimiert sind und in charakteristischer Weise zelluläre Schutzmechanismen inhibieren (zur Hausen 2002).

Da bisher keine kausale Therapie der HPV-Infektion verfügbar ist, spielt die Prävention der Erkrankung eine entscheidende Rolle. Zur Prävention des Zervixkarzinoms steht ein Totimpfstoff zur Verfügung, dessen Anwendung bei jungen Frauen in Deutschland empfohlen ist. Langzeitstudien sowie Untersuchungen zur Impfprävention HPV-assoziiertes HNSCC stehen aktuell noch aus (Wittekindt et al. 2012).

### 1.2.2 p53-/p21-Signalweg

Die Infektion mit high-risk HPV führt zu einer Inhibition des p53-/p21-Signalwegs. Nachfolgend ist zunächst die Bedeutung des intakten Signalwegs als zellulärer Schutz vor maligner Entartung dargestellt.

P53 ist ein 53 Kilodalton (kDa) schweres intrazelluläres Protein, das durch das Gen *TP53* auf Chromosom 17 kodiert wird und als Transkriptionsfaktor fungiert. Als eines der wichtigsten Tumorsuppressorproteine hat p53 Bedeutung für die zelluläre Integrität und dient dem Schutz vor maligner Transformation (Levine 1997). In mehr als der Hälfte aller malignen Tumoren ist *TP53* mutiert (Levine 1997); in HNSCC liegt sogar in bis zu 80 % der Tumoren eine Mutation vor (Braakhuis et al. 2004; Leemans et al. 2011;

Riaz et al. 2014; Chung et al. 2015; Tinhofer et al. 2016). In den meisten Fällen handelt es sich um eine Missense-Mutation in einem Allel, die zu einer hohen Expression eines nicht funktionalen Proteins führt und in der Folge die Funktionalität des verbleibenden Wildtyp-p53 inhibiert (Muller et al. 2013).

P53 wird konstitutiv exprimiert, ist jedoch durch Auto-Inhibition in konstant niedrigen Konzentrationen vorhanden, da das eigene Transkriptionsprodukt *mouse double minute 2* (*mdm2*), eine Ubiquitin-Ligase, p53 dem proteasomalen Abbau zuführt. Die Aktivierung von p53 findet durch eine Vielzahl zellulärer Schädigungen, wie z. B. bestrahlungsinduzierte DNA-Doppelstrangbrüche, statt. Solche Signale führen zu einer Erhöhung der p53-Halbwertszeit mit konsekutivem Anstieg der Konzentration, wodurch p53 als Transkriptionsfaktor aktiv wird und folglich eine Signalkaskade aktiviert. Wesentliche Effekte der p53-Wirkung sind der Zellzyklus-Arrest zur Ermöglichung der DNA-Reparatur sowie die Induktion von Apoptose (Levine 1997).

Ein Transkriptionsprodukt und wesentlicher Mediator der p53-Signalkaskade ist das 21 kDa schwere Protein p21<sup>Cip1/WAF1</sup>. Es bindet an verschiedene Komplexe aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (*CDK*, *cyclin-dependent kinases*) und unterdrückt damit deren fördernde Wirkung auf die Zellzyklusprogression. Somit entsteht als zentraler p21-vermittelter Mechanismus der *G<sub>1</sub>-Arrest*, bei dem der Zellzyklus am Übergang zwischen G<sub>1</sub>- und S-Phase (vorübergehend) arretiert wird, wodurch zelluläre Reparaturmechanismen ermöglicht werden (Abbas et al. 2009).

In Fällen irreparabler DNA-Schäden kann p53 den kontrollierten Zelltod, die *Apoptose*, auslösen. Dies geschieht durch Aktivierung der Transkription proapoptotischer Proteine (Levine 1997; Vogelstein et al. 2000).

### 1.2.3 Funktion und Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist im Rahmen der HPV-Infektion besonders bedeutsam, da hierüber die Suppression des p53-/p21-Signalwegs erfolgt.

Das *Proteasom* ist ein Zellorganell, das für die intrazelluläre Proteinbalance eine gewichtige Rolle spielt. Es ist maßgeblich für die Proteolyse fehlgefalteter Proteine verantwortlich und für den Umsatz intrazellulärer Signalproteine wie p53 zuständig. Bis zu 90 % der intrazellulären Proteine werden proteasomal abgebaut (Sorokin et al. 2009).

Das 26 Svedberg (S)-Proteasom befindet sich in Zytoplasma und Kern der Zellen und hat einen fassartigen Aufbau. An beiden Seiten befindet sich je eine kappenartige 19S-



Untereinheit, die die Einschleusung reguliert und somit – im Gegensatz zum Lysosom – die Proteolyse zu einem präzise regulierten Prozess macht. Die katalytische 20S-Subeinheit im Inneren des Proteasoms beherbergt drei proteolytische Funktionen, die Trypsin-ähnliche, die Chymotrypsin-ähnliche und die Caspase-ähnliche Aktivität, die jeweils an unterschiedlichen Schnittstellen die Proteolyse katalysieren (Sorokin et al. 2009).

Für die Einschleusung von Proteinen in den proteasomalen Abbau existiert eine mehrstufige Signalkaskade, in der das kleine Markerprotein *Ubiquitin* eine entscheidende Bedeutung hat. Nach Aktivierung von Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 entsteht durch das Ubiquitin-vernetzende Enzym E2 eine Poly-Ubiquitin-Kette. Substrat-spezifische Ubiquitin-Ligasen, genannt E3, führen als Endstück der Aktivierungskette zu einer Markierung des abzubauenen Substrats mit der Poly-Ubiquitin-Kette (Sorokin et al. 2009). Die mit Abstand wichtigste p53-spezifische Ubiquitin-Ligase ist mdm2 (Chao 2015). Bei Kontakt des markierten Proteins mit dem Proteasom erfolgt die Deubiquitinierung sowie Einschleusung durch die 19S-Untereinheit und schließlich die Proteolyse durch die 20S-Untereinheit (Sorokin et al. 2009).

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist mit der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen assoziiert (Sorokin et al. 2009). In der modernen Tumorthherapie und insbesondere für die vorliegende Arbeit ist von entscheidender Bedeutung, dass es einen Ansatz für medikamentöse Therapien bietet. Vertiefend ist dies in den folgenden Abschnitten erörtert.

#### 1.2.4 Beeinträchtigter p53-/p21-Signalweg in HPV-assoziierten HNSCC

Die beschriebenen Mechanismen stellen bei intakter Funktion die zelluläre Integrität sicher und sorgen für eine adäquate Reaktion auf zelluläre Schädigungen. Mutationen im *TP53*-Gen sind in HPV-assoziierten HNSCC selten (Braakhuis et al. 2004; Chung et al. 2015; Tinhofer et al. 2016). Die p53-vermittelten Mechanismen sind jedoch in dieser Subentität in charakteristischer Weise durch das Wirken HP-viraler Onkoproteine gestört.

Eine zentrale Rolle nimmt dabei das HPV-Protein E6 ein. Dieses bildet mit der zellulären Ubiquitin-Ligase *E6-aktivierendes Protein* (E6AP) einen aktivierenden Komplex, welcher zur Polyubiquitinierung von p53 führt (Scheffner et al. 1993). Der folgende, vorzeitige proteasomale Abbau führt zur Störung der Autoregulation von p53 mit einem Mangel an prinzipiell funktionalem p53, so dass dessen Aktivierung bei DNA-

Schädigung mit der nachfolgenden Signalkaskade ausbleibt (zur Hausen 2002). Als Konsequenz daraus ergeben sich Defizite in der DNA-Reparatur (Rieckmann et al. 2013; Ziemann et al. 2017) und Zellzyklusregulation (Arenz et al. 2014) sowie eine erhöhte Therapiesensibilität (Kimple et al. 2013; Ziemann et al. 2015).

Zusammenfassend liegt also eine funktionelle Inhibition von p53 durch das Wirken HP-viraler Proteine vor, da dieses forciert seinem natürlichen Abbauweg zugeführt wird und somit die nachfolgende Signalkaskade nicht aktiviert werden kann, da kein p53-Konzentrationsanstieg induziert wird.

### 1.2.5 Zelluläre Effekte der Standardtherapeutika auf HNSCC-Zellen

Da in der vorliegenden Arbeit neben einer auf den p53-Stoffwechsel abzielenden Therapie auch die Kombination mit den Standardtherapeutika Bestrahlung und Cisplatin untersucht werden sollte, sind nachfolgend deren biologische Wirkungen dargestellt.

#### 1.2.5.1 Zelluläre Wirkungen von Bestrahlung

Hochenergetische Photonenstrahlung (IR, *ionizing radiation*) bewirkt durch die hohe Energieübertragung Ionisationsprozesse, wobei die Entstehung freier Radikale durch Ionisation des Wassers für die biologischen Prozesse ursächlich ist. Eine Photonenbestrahlung mit einer Einzeldosis von 1 Gy führt durchschnittlich zu 30 *DNA-Doppelstrangbrüchen* (DSB) pro Zelle, welche die höchstrangige Form der DNA-Schädigung darstellen und umgehender Reparaturprozesse bedürfen, um die Integrität des Genoms zu erhalten (Dikomey et al. 2016). Eine Überforderung der Doppelstrangbruchreparatur durch Akkumulation bestrahlungsinduzierter DNA-Schäden mit daraus resultierender nachhaltiger Schädigung des Genoms führt zur radiogenen Fröhschädigung, die vor allem Mechanismen der Apoptose bedingt. Eine essenzielle Form der radiogenen Spätschädigung hingegen stellt der mitogene Zelltod dar, der durch insuffiziente Zellteilung in der Folge angehäufter DNA-Doppelstrangbrüche verursacht wird und im Gesamtkonzept der medizinischen Strahlentherapie eine gewichtige Rolle einnimmt (Eriksson et al. 2010).

Eine zentrale zelluläre Reaktion auf Bestrahlung zur Ermöglichung der zeitlich anspruchsvollen DNA-Reparatur ist der Arrest des Zellzyklus. Neben dem p53-abhängigen G<sub>1</sub>/S-Arrest spielt der G<sub>2</sub>/M-Arrest in der Strahlenreaktion eine besondere Rolle. In p53-defizienten Zellen steht somit nur noch der G<sub>2</sub>/M-Arrest für Reparaturvor-

gänge zur Verfügung, weshalb dieser in der Folge nach Bestrahlung häufig verstärkt und prolongiert ist (Dikomey et al. 2016).

HNSCC-Zelllinien weisen *in vitro* eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit auf. Häufig sind HPV-positive HNSCC-Zelllinien strahlensensibler als HPV-negative Zelllinien, wobei die zugrundeliegenden Ursachen noch nicht gänzlich geklärt sind (Kimple et al. 2013; Arenz et al. 2014). Neben dem unterschiedlichen p53-Stoffwechsel wird auch eine defiziente DNA-Reparatur für die höhere Strahlensensibilität verantwortlich gemacht (Rieckmann et al. 2013; Ziemann et al. 2017). Charakteristisch ist in HPV-positiven HNSCC-Zellen ein prolongierter G<sub>2</sub>/M-Arrest (Busch et al. 2017).

#### 1.2.5.2 Zelluläre Wirkungen von Cisplatin

Cis-Diammindichloridoplatin (*Cisplatin, CDDP*) ist die Leitsubstanz aus der Gruppe der platinhaltigen Zytostatika. Hauptmechanismus der zytostatischen Wirkung ist die Bindung an Purinbasen der DNA mit nachfolgender Bildung von DNA-Addukten durch Quervernetzung innerhalb und zwischen DNA-Strängen. Die Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Schäden erfordert die Funktion effektiver DNA-Reparaturmechanismen. Eine Überforderung dieser Mechanismen führt zum apoptotischen Zelltod. Therapie-limitierend sind die unerwünschten Wirkungen der Substanz, so dass eine möglichst geringe Dosis bei maximalem Behandlungserfolg erstrebenswert ist (Dasari et al. 2014).

Wie in Abschnitt 1.1.4 beschrieben stellt Cisplatin in Kombination mit der Strahlentherapie ein Standard-Therapiekonzept für Patienten mit HNSCC dar. *In vitro* konnte in HNSCC-Zelllinien eine erhöhte Cisplatin-Sensitivität HPV-positiver HNSCC gezeigt werden (Ziemann et al. 2015).

## 1.3 Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib

Als zielgerichtete Therapie für den gestörten p53-Metabolismus in HPV-positiven HNSCC wurde in der vorliegenden Arbeit die Inhibition des proteasomalen Abbaus von p53 untersucht. Nachfolgend wird die grundlegende Wirkweise der verwendeten Substanz vorgestellt und der angenommene Wirkmechanismus im konkreten Versuchsaufbau dargelegt.

### 1.3.1 Aufbau und Wirkweise von Bortezomib

*Bortezomib* (Entwicklungsname PS-341; Handelsname Velcade®, Millennium Pharmaceuticals) ist die Leitsubstanz der ersten Generation der Proteasom-Inhibitoren. Chemisch handelt es sich um eine niedermolekulare (Molekulargewicht 384,24 g/mol), Bor-haltige Verbindung mit Dipeptidstruktur (Chen et al. 2011).

Die Substanz wirkt als reversibler Inhibitor des 26S-Proteasoms. Durch Bindung als Pseudosubstrat an die katalytische Untereinheit erfolgt die kompetitive Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms, was zu einer Unausgewogenheit des intrazellulären Proteinstoffwechsels führt. Die Wirksamkeit in der Therapie der zugelassenen Indikationen wird insbesondere auf die funktionelle Inhibition des proliferationsfördernden Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor-κB* (NF-κB) zurückgeführt (Chen et al. 2011). Darüber hinaus konnten in präklinischen Studien weitere Wirkmechanismen eruiert werden, wie die p53-unabhängige Induktion von Apoptose (Qin et al. 2005; Strauss et al. 2007), Inhibition von Angiogenese (Sunwoo et al. 2001) oder Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und einer Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums aufgrund der Akkumulation fehlgefalteter Proteine (Fribley et al. 2004).

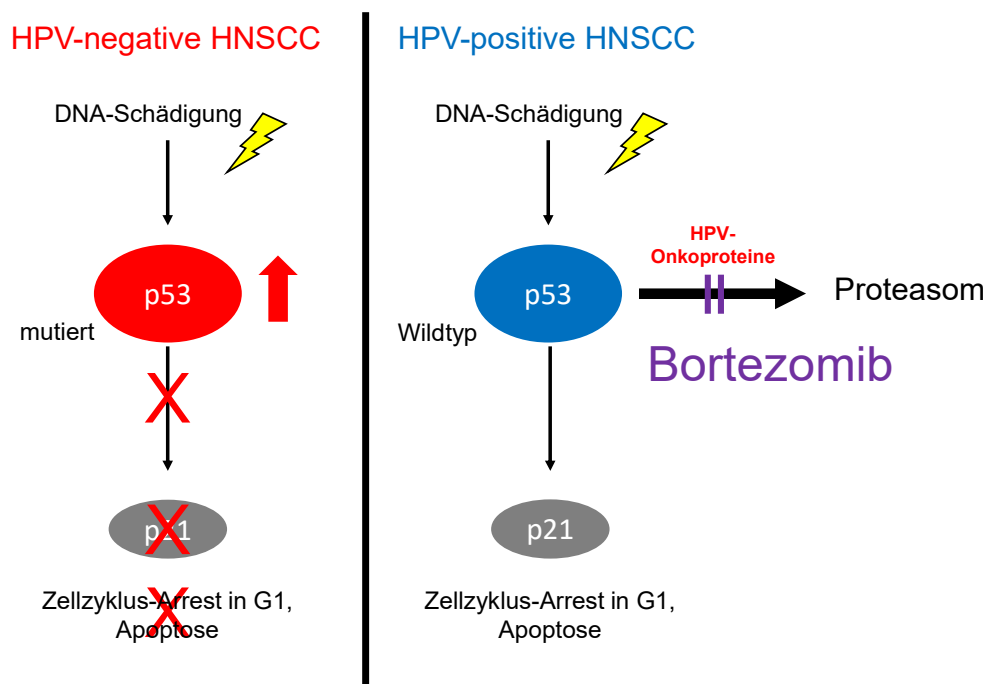
Bortezomib ist in der Therapie verschiedener hämatologischer Erkrankungen seit Jahren klinisch etabliert. Führende unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind Blutbildveränderungen wie Anämie und Thrombozytopenie, gastrointestinale Nebenwirkungen, Fatigue und eine zumeist reversible periphere sensorische Neuropathie (Moreau et al. 2011). Die Verträglichkeit von Bortezomib ist insgesamt jedoch als gut zu bewerten.

## 1.4 Fragestellung

Die Pathomechanismen, die bei HPV-assoziierten HNSCC im Vergleich zu HPV-negativen HNSCC zu einem besseren Therapieansprechen führen, sind nur teilweise bekannt. Wichtige *in vitro* untersuchte Gründe für das bessere Ansprechen könnten in der beeinträchtigten DNA-Reparaturkapazität und Zellzyklusregulation (Rieckmann et al. 2013; Arenz et al. 2014; Ziemann et al. 2015; Ziemann et al. 2017) sowie der verstärkten Induktion der p53-abhängigen Apoptose (Kimple et al. 2013) in HPV-assoziierten HNSCC sein. Apoptose wurde als wichtiger Zelltodmechanismus in HPV-assoziierten HNSCC angenommen, da das Tumorsuppressorgen *TP53* in dieser distinkten Tumorentität zumeist als Wildtyp vorliegt. Der p53-Level ist allerdings in der Regel sehr niedrig, da HP-virales E6 zu einem vermehrten proteasomalen Abbau mit ausbleibender p53-Aktivität führt, was dessen antineoplastische Wirkung einschränkt (Cleary et al. 2016). In HPV-negativen HNSCC liegt p53 hingegen meist in der mutierten und somit unwirksamen Form vor (Tinhofer et al. 2016).

In mehreren Tumorentitäten wurde bereits gezeigt, dass eine Erhöhung des p53-Levels (Wildtyp) und die funktionelle Reaktivierung der p53-abhängigen Signalwege als therapeutischer Ansatzpunkt dienen können, vor allem zur effektiven und spezifischen Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber antineoplastischen Chemotherapeutika (Mandinova et al. 2011).

Die der Arbeit zugrunde liegende, in Abb. 1 verdeutlichte Hypothese war daher, dass durch Bortezomib das Proteasom gehemmt und somit der vorzeitige p53-Abbau verhindert wird. Das wiederhergestellte, potentiell wirksame – weil nicht mutierte – p53 würde somit durch eine Bestrahlung und Behandlung mit Cisplatin aktivierbar sein und verstärkt antineoplastisch wirken. Aus klinischer Sicht stellt diese kombinierte Therapie einen attraktiven Ansatz dar, da die Anwendung des nebenwirkungsarmen Bortezomib zu einer Dosisreduktion der Radiochemotherapie führen könnte, was eine gleichbleibende Wirkung bei geringerer Gesamtoxizität zur Folge hätte.



**Abb. 1: Hypothese der Pathomechanismen des p53-Stoffwechsels in HNSCC sowie deren Beeinflussung durch Bortezomib**

Vereinfachte Darstellung des p53-Signalwegs in HPV-negativen (*links*) und HPV-positiven HNSCC (*rechts*). Während durch Mutationen die nachfolgende Signalkaskade in HPV-negativen HNSCC gestört ist, liegt in HPV-positiven HNSCC eine funktionelle Inhibition des im Wildtyp exprimierten p53 durch virale Onkoproteine vor. Durch die Wirkung von Bortezomib wird der gesteigerte p53-Abbau gehemmt, so dass die p53-Signalkaskade bei DNA-Schädigung regelhaft ablaufen kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zu untersuchen, ob:

- Bortezomib den proteasomalen Abbau von p53 in HPV-positiven HNSCC inhibiert und somit *in vitro* zu einer funktionellen Reaktivierung von p53 mit konsekutiven Effekten auf Zellviabilität, Zellzyklusregulation und Apoptose führt.
- Bortezomib in HPV-positiven HNSCC *in vitro* zu einer Strahlensensibilisierung und Chemosensibilisierung gegenüber Cisplatin führt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

##### *2.1.1.1 Verbrauchsmaterialien*

Die detaillierte Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien ist Anhang A zu entnehmen.

##### *2.1.1.2 Geräte*

Die detaillierte Auflistung der verwendeten Geräte ist Anhang A zu entnehmen.

##### *2.1.1.3 Software*

Die detaillierte Auflistung der verwendeten Software ist Anhang A zu entnehmen.

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

##### *2.1.2.1 Chemikalien*

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Chemikalien befindet sich in Anhang A.

##### *2.1.2.2 Puffer und Reagenzien*

#### **Allgemeine Puffer und Reagenzien**

*Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 10x, pH 7,4*

*zur Zubereitung von 1xPBS 1:10 mit vollentsalztem Wasser verdünnen*

Natriumchlorid	80 g
Kaliumchlorid	2 g
Dinatriumhydrogenphosphat	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4 g
vollentsalztes Wasser	ad 1000 ml

*Fixierlösung für Koloniebildungstests*

Kristallviolett	100 mg
Formaldehyd	100 ml
vollentsalztes Wasser	ad 1000 ml

*Propidiumiodid-Färbepuffer**Zubereitung unter Lichtschutz*

Propidiumiodid	20 µg
RNAse A	200 µg
Triton® X-100	0,1 %
PBS (1x)	ad 1 ml

**Puffer und Reagenzien für proteinbiochemische Untersuchungen***Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer (1x)*

Natriumchlorid	0,876 g
Triton® X-100	1 g
TRIS 1 M (pH 8)	5 ml
Natriumdesoxycholat 10 %	5 ml
Natriumdodecylsulfat 10 %	1 ml
vollentsalztes Wasser	ad 100 ml

*Lysepuffer (1x)*

PMSF	10 µl
Natriumorthovanadat	10 µl
Protease Inhibitor Cocktail	10 µl
RIPA-Puffer (1x)	ad 1 ml

*Trenngelpuffer (pH 8,8)*

TRIS	90,89 g
Salzsäure 37 %	4,5 ml
vollentsalztes Wasser	ad 500 ml

*Sammelgelpuffer (pH 6,8)*

TRIS	6,1 g
Salzsäure 37 %	5 ml
vollentsalztes Wasser	ad 100 ml



---

<i>Lämmli-Probenpuffer (4x)</i>	<i>mit Probe 1:4 versetzen</i>
TRIS-HCl 1 M (pH 6,8)	2,4 ml
Glycerol 10 %	4,0 ml
Natriumdodecylsulfat 8 %	0,8 g
2-Mercaptoethanol	1,0 ml
Bromphenolblau 0,03 %	1 Tropfen
vollentsalztes Wasser	ad 10 ml
<i>Laufpuffer (10x)</i>	<i>vor Benutzung 1:10 verdünnen</i>
TRIS	30,3 g
Glycin	144,0 g
Natriumdodecylsulfat	10,0 g
vollentsalztes Wasser	ad 1000 ml
<i>Transferpuffer (pH 8,3)</i>	
TRIS	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
Natriumdodecylsulfat 10 %	1 ml
vollentsalztes Wasser	ad 1000 ml
<i>TRIS-gepufferte Salzlösung (TBS), 10x (pH 7,2–7,4)</i>	
TRIS	24,2 g
Natriumchlorid	87,6 g
Salzsäure 37 %	7,5 ml
vollentsalztes Wasser	ad 1000 ml
<i>TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20 (TBS-T), 1x</i>	
TBS (10x)	100 ml
Tween® 20	1 ml
vollentsalztes Wasser	ad 1000 ml
<i>Blockpuffer, 3 % BSA-haltig</i>	
BSA	3 g
TBS-T	ad 100 ml

---

<i>Trenngel 11 %</i>	<i>für 2 Gele</i>
Rotiphorese® 30	3,70 ml
Trenngelpuffer	2,50 ml
Natriumdodecylsulfat 10 %	0,10 ml
vollentsalztes Wasser	3,70 ml
Ammoniumpersulfat 10 %	75 µl
TEMED	7,5 µl
<i>Sammelgel 4 %</i>	<i>für 2 Gele</i>
Rotiphorese® 30	0,65 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml
Natriumdodecylsulfat 10 %	0,05 ml
vollentsalztes Wasser	3,05 ml
Ammoniumpersulfat 10 %	25 µl
TEMED	5 µl
<i>Lösung A für ECL-Reagens</i>	<i>Lagerung bei +4 °C</i>
TRIS-HCl 0,1 M (pH 8,6)	200 ml
Luminol	50 mg
<i>Lösung B für ECL-Reagens</i>	<i>Lagerung unter Lichtschutz</i>
para-Hydroxycoumarinsäure	11 mg
DMSO	ad 10 ml
<i>ECL-Detektionsreagens</i>	<i>unmittelbar vor Gebrauch anzusetzen</i>
Lösung A	1 ml
Lösung B	100 µl
Wasserstoffperoxid 35 %	0,5 µl

### 2.1.2.3 Zellkulturmedium

Zur Kultivierung aller Zelllinien wurde ein Zellkulturmedium verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2 beschrieben ist. Die Lagerung erfolgte bei +4 °C. Unmittelbar vor Verwendung wurde das Zellkulturmedium im Kleinbrutschrank auf +37 °C aufgewärmt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Zellkulturmediums.

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen</b>
Roswell Park Memorial Institute Medium ohne L-Glutamin (RPMI-1640)	500 ml
Fetales Kälberserum (FBS superior)	50 ml
MEM Non-Essential Amino Acids Solution 100x	5 ml
Stabiles Glutamin 200 mM	5 ml

### 2.1.2.4 Antikörper

Die Eigenschaften der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Eigenschaften der verwendeten Antikörper.

Zielprotein (Molare Masse in kDa)	Primärer Antikörper (Hersteller; Bestell- nummer)	Verdünnung	Sekundärer Antikörper (Hersteller; Be- stellnummer)	Verdünnung
p53 (53 kDa)	Purified Mouse Anti-human p53, Klon DO-7 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; #554294)	1:1500 in 3 % BSA in TBS-T	Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology, Dan- vers, MA, USA; #7076)	1:5000 in TBS-T
p21 (21 kDa)	Anti-p21/WAF1/Cip1 Mouse monoclonal antibody, Klon CP36/CP74 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA; #05-345)	1:1000 in 3 % BSA in TBS-T		
GAPDH (37 kDa)	GAPDH Rabbit mon- oclonal antibody, Klon 14C10 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; #2118)	1:3000 in 3 % BSA in TBS-T		

*kDa, Kilodalton; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; HRP, horseradish peroxidase.*

### 2.1.3 Zelllinien

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an sieben etablierten Zelllinien durchgeführt, die aus humanen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region isoliert wurden. Herkunft und Eigenschaften dieser Zelllinien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien.

Bezeichnung	p53-Status	HPV-Status	Lokalisation	Geschlecht, Alter	Referenzen
UM-SCC-3	mutiert (R248Q)	HPV-negativ	Nasenhöhle	w, 73	(Lansford et al. 2002; Mandic et al. 2005; Lin et al. 2007; Zhao et al. 2011)
UM-SCC-11b	mutiert (C242S)	HPV-negativ	Larynx	m, 65	(Lansford et al. 2002; Lin et al. 2007; Zhao et al. 2011)
UT-SCC-33	mutiert (R282W)	HPV-negativ	Mundhöhle	w, 86	(Lansford et al. 2002; Lin et al. 2007)
UD-SCC-2	Wildtyp	HPV16-positiv	Hypopharynx	m, 58	(Ballo et al. 1999; Lansford et al. 2002; Rieckmann et al. 2013)
UM-SCC-47	Wildtyp	HPV16-positiv	Mundhöhle	m, 53	(Lansford et al. 2002; Lin et al. 2007; Zhao et al. 2011)
UM-SCC-104	Wildtyp	HPV16-positiv	Mundhöhle	m, 56	(Tang et al. 2012)
UPCI:SCC152	Wildtyp	HPV16-positiv	Hypopharynx	m, 47	(White et al. 2007)

*m, männlich; w, weiblich. Alter des Spenders in Jahren zum Zeitpunkt der Isolation des Tumors. Lokalisation entspricht dem Ort des Primärtumors. Die zusätzliche Angabe bei Vorliegen einer p53-Mutation entspricht der Lokalisation der Punktmutation.*

*Modifiziert nach (Arenz et al. 2014).*

Die korrekte Identität der Zelllinien wurde durch das Labor der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) per Short-Tandem-Repeat-Analyse und Single-Nucleotide-Polymorphism-Analyse überprüft (Castro et al. 2013).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben dieses Abschnitts auf sämtliche Zellkulturarbeiten mit allen verwendeten Zelllinien.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in runden Zellkulturgefäßen mit einer Wachstumsfläche von 58 cm<sup>2</sup> in einem Zellkulturinkubator bei +37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Arbeiten an den vitalen Zellen außerhalb des Inkubators fanden an einer Sterilwerkbank statt.

#### **Ablösen und Passagieren der Zellen**

Zum Ablösen der adhärent wachsenden Zellen wurde zuerst das Zellkulturmedium abgesaugt, der Zellrasen einmalig mit 5 ml PBS (1x) gewaschen und mit 3 ml Trypsin-EDTA überschichtet. Je nach verwendeter Zelllinie war eine Inkubation über 5–15 min nötig, bis mikroskopisch die Ablösung der Zellen festgestellt werden konnte. Zur Beendigung des Ablösevorgangs wurden 7 ml Zellkulturmedium hinzugefügt und die Zellsuspension anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 300 g über 4 min wurde vom Zentrifugat der flüssige Überstand abgesaugt, um daraufhin das verbliebene Zellsediment in 10 ml frischem Zellkulturmedium zu resuspendieren. Zum Passagieren erfolgte, je nach initialer Konfluenz der Zellen im Kulturgefäß und abhängig von der verwendeten Zelllinie, die Aussaat der Zellen in ein frisches Zellkulturgefäß im Verhältnis 1:2–1:20. Üblicherweise war das Passagieren der Zellen zweimal wöchentlich notwendig, wobei nach insgesamt 20-maliger Passagierung die Zellen verworfen und durch eine jüngere Passage ersetzt wurden.

Die Aussaat von Zellen für Versuche mit einer definierten Zellzahl machte die vorherige Zellzahlbestimmung sowie Zubereitung von frischem Zellkulturmedium erforderlich.

### Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach o. g. Ablösevorgang in einer Zählkammer vom Typ *Neubauer improved*. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension auf die zuvor mit einem Deckglas abgedeckte Zählkammer überführt. Nach Auszählen der auf den vier je 1 mm<sup>2</sup> messenden Quadraten befindlichen Zellen ergab sich durch Berechnung des arithmetischen Mittels der Zellzahlen der vier Quadrate multipliziert mit dem Kammerfaktor 10<sup>4</sup> die Zellzahl pro Milliliter.

#### 2.2.1.2 Bestrahlung der Zellen

Die Zellen wurden in der Röntgenbestrahlungsanlage X-RAD 320 iX (Hersteller: Precision X-Ray Inc., North Branford, CT, USA) unter den in Tabelle 5 angegebenen Bedingungen bestrahlt. Die absorbierten Energiedosen betragen 2 Gy oder 4 Gy. Zur Analyse der bestrahlungsinduzierten Effekte diente das stetige Mitführen einer unbestrahlten Kontrolle. Die Zeitpunkte der Bestrahlung in den verschiedenen Versuchen sind detailliert in den folgenden Abschnitten sowie im Ergebnisteil aufgeführt.

Tabelle 5: Technische Bestrahlungsparameter.

Eigenschaft	Wert
Anodenspannung	320 kV
Stromstärke	10 mA
Dosisrate	1,2 Gy/min
Fokus-Objekt-Abstand	60 cm
Filter	0,5 mm Kupfer; 0,5 mm Aluminium

#### 2.2.1.3 Behandlung der Zellen mit Bortezomib

*Bortezomib* (BZM) wurde in Pulverform in einer Abpackung von je 2,5 mg bezogen und nach Herstellerangaben in 6,51 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, wodurch sich eine Lösung mit der Konzentration 1 mM ergab. Diese Stammlösung wurde zur Vermeidung mehrerer Einfrier-Auftau-Zyklen in kleine Volumina aufgeteilt und bei -20 °C in Mikroreaktionsgefäßen gelagert.

Um für die angegebenen Versuche die Applikation von Bortezomib in Konzentrationen von 2,5 nM bis 200 nM zu ermöglichen, war eine Verdünnung der Stammlösung erfor-

derlich. Dazu wurde zu der Stammlösung zunächst DMSO hinzugegeben, bis eine Bortezomib-Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  vorlag. Die Zielkonzentration wurde anschließend durch eine Verdünnung dieses Ansatzes im Verhältnis 1:1000 in Zellkulturmedium erreicht. Durch dieses Verfahren konnte sichergestellt werden, dass die Endkonzentration des Lösungsmittels DMSO konstant bei allen Ansätzen 0,1 % betrug.

Nähere Angaben zu den in den verschiedenen Versuchen verwendeten Bortezomib-Konzentrationen sowie den Zeitpunkten der Behandlung finden sich im Ergebnisteil.

#### 2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit Cisplatin

*Cis-Diammindichloridoplatin* (Cisplatin, CDDP) wurde als Lösung in Volumina von 1 ml aus der Zytostatika-Zubereitung der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, Leiter: Dr. Martin Engelbach, bezogen. Die Ausgangskonzentration des Präparates mit dem Handelsnamen Cisplatin-Teva betrug 1 mg/ml. Die Stammlösung wurde unter Lichtschutz bei Raumtemperatur aufbewahrt; nach einer Woche wurde die Lösung verworfen.

Cisplatin kam in den Konzentrationen 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  sowie 10  $\mu\text{M}$  zur Anwendung. Zum Erreichen einer Zwischenverdünnung mit einer Konzentration von 1 mM wurde dem Molekulargewicht von Cisplatin (300,05 g/mol) entsprechend ein Volumen von 300,3  $\mu\text{l}$  der Stammlösung mit 699,7  $\mu\text{l}$  Aqua ad iniectabilia in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt.

Ein weiterer Verdünnungsschritt diente der Herstellung einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Cisplatin in Zellkulturmedium. Dazu wurden 4950  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und anschließend um 50  $\mu\text{l}$  der Cisplatin-Lösung mit der Konzentration 1 mM ergänzt.

Die Behandlung der Zellen wurde anschließend durch die direkte Zugabe des mit Cisplatin angereicherten Zellkulturmediums in das Zellkulturgefäß durchgeführt. Entsprechend dem hinzugefügten Volumen und unter Voraussetzung des im Zellkulturgefäß vorhandenen definierten Volumens von 4 ml ergab sich somit die in Tabelle 6 aufgeführte Zielkonzentration.



Tabelle 6: Rezepturen für die verwendeten Cisplatin-Konzentrationen.

<b>CDDP-Zielkonzentration</b>	<b>benötigtes Volumen CDDP-haltigen (10 µM) Zellkulturmediums pro Zellkulturgefäß</b>
0,25 µM	100 µl
0,5 µM	200 µl

Um das Gesamtvolumen im Zellkulturgefäß konstant zu halten, war es notwendig, vor Zugabe des mit Cisplatin angereicherten Zellkulturmediums die entsprechende Menge aus dem Zellkulturgefäß per Mikroliterpipette zu entnehmen.

Die für die in Abschnitt 2.2.5 beschriebenen Versuche benötigte Cisplatin-Konzentration von 10 µM wurde durch Überspringen der Zwischenverdünnung in Zellkulturmedium und stattdessen direkte Zugabe von 40 µl Cisplatin der Konzentration 1 mM in das Zellkulturgefäß erreicht.

Die Zeitpunkte der Behandlung mit Cisplatin sind detailliert im Ergebnisteil aufgeführt.

## 2.2.2 Untersuchungen zur Zellviabilität

### 2.2.2.1 Prinzip des WST-1-Assays

Beim WST-1-Assay wird photometrisch die Umwandlung des Tetrazoliums Salzes WST-1 (*water soluble tetrazolium-1, 4-(3-[4-Iodophenyl]-2-[4-nitrophenyl]-2H-5-tetrazolio)-1,3-Benzol-Disulfonat*) in das lösliche Formazan gemessen, welche durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert wird. Die verminderte Entstehung des Formazans als Zeichen einer herabgesetzten metabolischen Aktivität durch die verminderte Anzahl mitochondrienhaltiger, vitaler Zellen nach Behandlung mit Bortezomib erlaubt in Relation zu unbehandelten Zellen die semiquantitative Bestimmung der Zellviabilität (Yin et al. 2013).

### 2.2.2.2 Durchführung

Die Einführung in die Methodik sowie Anleitung bei Planung und Durchführung erster Vorversuche dazu erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Kristin Dreffke. Weitere Versuche wurden eigenständig geplant und durchgeführt.

Die Aussaat der Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen erfolgte in Triplikaten mit einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>, entsprechend  $5,8 \cdot 10^3$  Zellen pro Vertiefung in jeweils 100 µl Zellkulturmedium. Zusätzlich wurde in drei Vertiefungen ausschließlich Zellkulturmedium pipettiert, um später den Leerwert zu bestimmen. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen im Zellkulturinkubator wurde die Behandlung mit Bortezomib in den Konzentrationen 2,5 nM, 5 nM, 7,5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM und 200 nM sowie DMSO 0,1 % als Lösungsmittelkontrolle, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, im Rahmen eines Mediumwechsels durchgeführt. Es schloss sich eine erneute 24-stündige Inkubation an.

Das WST-1-Reagens wurde aus dem Lagerbestand (−20 °C) kurz vor der Verwendung unter Lichtschutz auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden je 10 µl WST-1-Reagens in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach einem sich anschließenden Schüttelvorgang über 1 min auf dem im Mikroplattenleser enthaltenen Schüttler erfolgte dort die Bestimmung der Absorption bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 450 nm.

### 2.2.2.3 Auswertung

Ziel der Versuchsauswertung war es, anhand der gemessenen Absorption den prozentualen Anteil viabler Zellen nach Bortezomib-Behandlung, bezogen auf die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Kontrollgruppe, zu ermitteln. Dazu war zunächst die Berechnung des Mittelwertes der drei Absorptionswerte einer Bortezomib-Konzentration bzw. der drei DMSO-Kontrollen (Triplikate) notwendig. Anschließend wurde diesen Werten jeweils der Mittelwert der drei Leerwerte abgezogen, so dass sich die bereinigten Absorptionswerte  $A_{BZM}$  bzw.  $A_{DMSO}$  ergaben. Die Berechnung der Zellviabilität für eine Bortezomib-Konzentration  $V_{BZM}$  erfolgte nach Formel ( 1 ).

$$V_{BZM} = \frac{A_{BZM}}{A_{DMSO}} \quad ( 1 )$$

Für die Darstellung der Ergebnisse wurde die Zellviabilität prozentual angegeben.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Untersuchungen

### 2.2.3.1 Prinzip und Versuchsaufbau

Aus Zelllysaten gewonnene Proteine werden entsprechend ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufgetrennt, danach im Western-Blot-Verfahren auf eine Membran

übertragen und anschließend immunologisch durch spezifische Antikörper nachgewiesen (Mahmood et al. 2012).

Die Versuche dienten der Bestimmung der Proteinexpression nach Bestrahlung bzw. Behandlung mit Bortezomib. Detaillierte Angaben zur Behandlung der Zellen vor der Präparation der Zelllysate finden sich im Ergebnisteil.

### 2.2.3.2 Durchführung

Die Versuchsdurchführung wurde durch Frau Stefanie Preising und Herrn Dr. med. Frank Ziemann angeleitet sowie durch Mithilfe bei der Präparation der Zelllysate, SDS-PAGE, Western Blot, Detektion und densitometrischen Auswertung unterstützt.

### Präparation von Zelllysaten

Exponentiell wachsende Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, mit der Zellzahl  $2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturgefäßen mit 21 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausgesät und wie in den Abschnitten 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben behandelt.

Zur Präparation der Zelllysate wurden die Zellkulturgefäße aus dem Inkubator genommen, das Zellkulturmedium auf Eis abgesaugt und anschließend mit 5 ml eiskaltem PBS (1x) einmal gewaschen. Nach Zugabe von 150 µl des frisch zubereiteten Lysepuffers wurde der Zellrasen mittels eines Zellschabers in den Puffer hinein geschabt, das Lysat anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und sofort für mindestens 12 h bei -80 °C gelagert.

### SDS-PAGE

Die Zubereitung der Polyacrylamidgele für die *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese* (SDS-PAGE) erfolgte am Vortag. Nach Reinigung der Glasplatten (Abstand 0,75 mm) mit 70 % Ethanol wurden diese in die Gießvorrichtung eingespannt, anschließend die Reagenzien für das Sammel- und Trenngel pipettiert und die Katalysatoren der Polymerisation *Ammoniumpersulfat* und *N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin* (TEMED) kurz vor dem Gießvorgang zugegeben. Das Trenngel wurde luftblasenfrei bis zu einer Höhe von 4,5 cm zwischen die Glasplatten pipettiert und anschließend zum Luftabschluss mit 200 µl Isopropanol überschichtet. Nach Abschluss des Polymerisationsvorgangs wurde das Isopropanol durch ein Filterpapier entfernt, anschließend nach gleichem Vorgehen das Sammelgel gegossen und zuletzt der ta-

schenbildende Kamm eingesetzt. Die Lagerung der vorbereiteten Gele erfolgte bis zur weiteren Nutzung in einer feuchten Kammer bei +4 °C.

Die Zellysate wurden kurz vor Durchführung der SDS-PAGE auf Eis aufgetaut, anschließend dreimal für 2 s mithilfe des Ultraschall-Homogenisators sonifiziert und 10 min bei 10.000 rpm gekühlt zentrifugiert. Aus dem proteinhaltigen Überstand wurden 20 µl in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, mit 7 µl Lämmli-Probenpuffer vermengt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert.

Nachdem das Polyacrylamidgel in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Lauffuffer aufgefüllt wurde, erfolgte nach Entfernung des Kamms das Auftragen von je 25 µl der vorbereiteten Probe. In einer der Taschen wurden 5 µl des Molekulargewichtsmarkers aufgetragen. Anschließend erfolgte der Elektrophoresevorgang bei 100 V, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hat.

### **Western Blot**

Nach beendeter SDS-PAGE wurden die Glasplatten entfernt, das Sammelgel abgetrennt und anschließend das Trenngel bis zur weiteren Verwendung in Transferpuffer überführt. Der Western Blot erfolgte als Semi-dry-Blot auf eine zuvor auf die Größe des Gels (8,5 cm × 4,5 cm) zugeschnittene Membran aus *Polyvinylidendifluorid* (PVDF). Zuvor wurden die Filterpapiere in Transferpuffer, die Membran zuerst für 30 s in 100 % Methanol und anschließend in Transferpuffer, equilibriert.

Der Transfer erfolgte in der Blotkammer bei folgendem Aufbau:

Anode – Filterpapier – Membran – Trenngel – Filterpapier – Kathode

Nach handfestem Anziehen der Verschlusschrauben wurde der Transfervorgang bei einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> für 60 min durchgeführt. Nach Abbau der Apparatur und Abnahme der Membran diente eine einstündige Inkubation in Blockpuffer dem Blockieren der freien Bindungsstellen. Anschließend wurde diese auf Höhe der 25-kDa-Markerbande in zwei Teile geschnitten, so dass auf dem oberen Teil die Zielproteine p53 und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), auf dem unteren Teil p21 analysiert werden konnten.

### **Antikörpermarkierung**

Die Vorbereitung der Antikörper-Inkubationslösungen für p53 und p21 wurde wie in Tabelle 3 angegeben zu Volumina von 3 ml in Zentrifugenröhrchen durchgeführt. Die

Inkubation der Membranen mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht (ca. 18 h) auf einem Rolleninkubator im Kühlraum (+4 °C).

Zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers wurde dreimal je 10 min mit TBS-T (20 ml) auf einem Schüttler gewaschen. Daran schloss sich die einstündige Inkubation des sekundären Antikörpers bei Raumtemperatur an. Anschließend wurde die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung wie im folgenden Abschnitt beschrieben durchgeführt.

Zum Nachweis von GAPDH wurde anschließend der obere Teil der Membran mittels o. g. Waschvorgang vom Detektionsreagens gereinigt und mit der vorbereiteten Antikörper-Inkubationslösung für den primären Antikörper für GAPDH für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Markierung mit dem sekundären Antikörper erfolgte analog dem oben beschriebenen Vorgehen.

### **Detektion**

Der Nachweis der Antigen-Antikörperbindung erfolgte mittels *Enhanced-Chemiluminescence* (ECL)-Verfahren. Die mit dem sekundären Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert hierbei die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, wobei durch Chemilumineszenz Licht entsteht. Mithilfe eines Imaging-Systems kann dieses sichtbar gemacht werden (Mahmood et al. 2012).

Die Messung der Lichtemission erfolgte am ChemoCam Imager 3.2 (Hersteller: INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) des Instituts für Lungenforschung der Philipps-Universität Marburg, Leiter: Prof. Dr. med. Bernd Schmeck. Dazu wurde unmittelbar vor der Messung 1 ml des ECL-Detektionsreagens auf die Membran gegeben und die Lichtemission nach 5 min Inkubation gemessen.

#### **2.2.3.3 Auswertung**

Die densitometrische Bestimmung der Bandenstärke unter Hintergrundsuppression erfolgte für jede Bande einzeln mittels der Software QuantityOne 4.6.7. Anschließend wurden die Werte für p53 und p21 durch die Dichtewerte der entsprechenden Bande des Proteins GAPDH geteilt, das aufgrund der konstitutiven Expression mit dem Gesamtproteingehalt des entsprechend analysierten Zelllysats korreliert. Diese *GAPDH-normierten Werte* wurden zur weiteren Berechnung verwendet.

Zum Ausgleich von Unregelmäßigkeiten innerhalb eines Versuchs, also der bestimmten Proteinexpression für jeweils p53 oder p21 in einer Zelllinie mit den entsprechenden Behandlungsgruppen, erfolgte die Berechnung der *relativen Proteinexpression*. Dazu wurden die GAPDH-normierten Werte für die jeweilige Behandlungsgruppe durch das arithmetische Mittel aller GAPDH-normierten Werte des Versuchs geteilt und zuletzt mit dem arithmetischen Mittel der GAPDH-normierten Werte der Versuche aller Zelllinien (Untersuchungen mit Bortezomib) respektive aller Versuche einer Zelllinie (Untersuchungen mit Bortezomib und Bestrahlung) unter Trennung nach HPV-Status multipliziert.

## 2.2.4 Zellzyklusanalyse

### 2.2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Im Durchflusszytometer werden Einzelzellen beim Durchfluss durch eine dünne Kapillare analysiert. Dabei wird die bei Zelldurchtritt auftretende Lichtstreuung eines Laserstrahls gemessen, wodurch Rückschlüsse auf die analysierte Zelle möglich sind.

Der Fluoreszenzfarbstoff *Propidiumiodid* (PI) bindet an Nukleinsäuren und emittiert nach Anregung durch den Laser Licht, dessen Intensität direkt mit dem Nukleinsäuregehalt der Zelle korreliert. Unter Berücksichtigung der zellzyklusphasenabhängigen Variabilität des DNA-Gehalts wird somit eine Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung der Zellpopulation möglich (Darzynkiewicz et al. 2010).

### 2.2.4.2 Durchführung

Die Versuchsdurchführung und -auswertung wurde durch Herrn Dr. med. Frank Ziemann angeleitet und bei der Fixierung der Proben sowie der Messung am Durchflusszytometer unterstützt.

### **Aussaat und Behandlung der Zellen**

Die in exponentiellem Wachstum befindlichen Zellen wurden, abhängig von der verwendeten Zelllinie, mit Zelldichten von  $1,0\text{--}1,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturgefäßen mit einer Wachstumsfläche von 21 cm<sup>2</sup> ausgesät.

Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben mit Bortezomib behandelt und nach weiteren 24 h wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben

bestrahlt. Der Zeitpunkt der Bestrahlung definierte den Beginn der Fixierung der Proben für die Zellzyklusanalyse, im Folgenden als *0 h* gekennzeichnet.

### **Fixierung der Proben**

Die Fixierung der Proben für die durchflusszytometrische Analyse erfolgte zu den Zeitpunkten 0 h, 7 h und 24 h. Dazu wurde das überstehende Zellkulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert, der Zellrasen mit 4 ml PBS (1x) überschichtet und dieses ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gefüllt. Es schloss sich ein Zentrifugationsvorgang dieser Suspension für 4 min bei 300 g an. Anschließend wurde der Überstand bis auf Höhe des Zellsediments abgesaugt.

Zur Ablösung der Zellen war eine Überschichtung mit 1,5 ml Accutase® mit anschließender Inkubation für 5 min erforderlich. Nach mikroskopischer Kontrolle der Ablösung der Zellen wurden diese durch mehrmaliges Pipettieren mit einer Mikroliterpipette vereinzelt und danach in das Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Fixierung diente anschließend die tropfenweise Zugabe von 3,5 ml eiskaltem Ethanol, welche unter stetigem Vermischen auf einem Vortex-Schüttler durchgeführt wurde. Die fertig fixierten Proben wurden danach bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse gelagert.

### **Färbung mit Propidiumiodid**

Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte die Färbung der Zellen mit Propidiumiodid, wobei die spezifische Bindung an die zelluläre DNA durch Abbau von RNA mittels beigefügter RNase A gewährleistet wurde (Darzynkiewicz et al. 2010). Nach Erwärmung auf Raumtemperatur wurden die Proben für 5 min bei 300 g zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes mit 5 ml PBS (1x) gewaschen. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsvorgang und Absaugen des Überstandes an. Anschließend wurden unter Lichtschutz 500  $\mu\text{l}$  des frisch zubereiteten Färbepuffers pro Probe hinzugefügt, auf dem Vortex-Schüttler vermischt und für 30 min bei Raumluft unter Lichtschutz inkubiert.

### **Messung am Durchflusszytometer**

Die Messungen wurden an einem Durchflusszytometer LSR II (Hersteller: BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) des Labors der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps-Universität Marburg, Leiter: Prof. Dr. Andreas Neubauer durchgeführt.

Nach dem Resuspendieren der Zellen mittels Vortex-Schüttler wurden diese in ein Probenröhrchen dekantiert. Nach einer ersten Voranalyse zur zelllinienspezifischen Einstellung der Parameter erfolgte anschließend die Messung von 20.000 Ereignissen im Kanal Peridinin-Chlorophyll-Protein (*PerCP*) unter einer Flussrate von 300 Ereignissen pro Sekunde.

#### 2.2.4.3 Auswertung

Die Rohdaten wurden mittels der Software FlowJo 7.6.5 prozessiert. Zelltrümmer und fälschlich gemessene zusammenhängende Zellen (sog. Dubletten) wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Zur Zuordnung der Zellzyklusphasen diente das Modell nach *Watson* (Watson et al. 1987). In den vorliegenden Versuchen wurden nur die Zellzyklusphasen G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>/M berücksichtigt. Daher war zunächst eine rechnerische Normierung erforderlich, indem die Summe der Zellen in G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>/M als 100 % gesetzt und anschließend der prozentuale Anteil Zellen der jeweiligen Zellzyklusphase errechnet wurde.

### 2.2.5 Untersuchungen zur Apoptoseinduktion

#### 2.2.5.1 Prinzip und Versuchsaufbau

Frühapoptotische Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass eine Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran stattfindet, welches spezifisch vom Protein *Annexin V* gebunden wird. Durch vorherige Fluoreszenzmarkierung von *Annexin V* mittels *Fluoresceinisothiocyanat* (FITC) kann durchflusszytometrisch der Anteil frühapoptotischer Zellen in einer Probe bestimmt werden. Da es bei spätapoptotischen und nekrotischen Zellen zusätzlich zu einer Zellmembranfragmentierung kommt, die indirekt durch das Einströmen des Nukleinsäurefarbstoffs Propidiumiodid erkennbar gemacht werden kann, ist durch Gegenfärbung mit diesem aufgrund des charakteristischen Fluoreszenzprofils eine Unterscheidung zu frühapoptotischen sowie vitalen Zellen möglich (Logue et al. 2009).

#### 2.2.5.2 Durchführung

Die Versuchsdurchführung und -auswertung wurde durch Herrn Dr. med. Frank Ziemann angeleitet und bei der Präparation der Proben sowie der Messung am Durchflusszytometer unterstützt.



### **Aussaat und Behandlung der Zellen**

Die Aussaat der in exponentiellem Wachstum befindlichen Zellen erfolgte in einer Zelldichte von  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturgefäßen mit einer Wachstumsfläche von 21 cm<sup>2</sup>. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben mit Bortezomib, nach weiteren 22 h wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben mit Cisplatin behandelt und nach weiteren 2 h Inkubation wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben bestrahlt. Die Zellen wurden bis zur Messung inkubiert.

### **Präparation und Färbung der Proben**

Die Apoptoseinduktion durch o. g. Behandlungen wurde 24 h und 48 h nach Bestrahlung gemessen. Der Überstand des Zellkulturgefäßes wurde in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert, daran schloss sich ein Waschvorgang mit 2 ml PBS (1x) an, welches anschließend ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen dekantiert wurde. Der Zellrasen wurde anschließend mit 1,5 ml Accutase<sup>®</sup> inkubiert, bis mikroskopisch das Ablösen der Zellen festgestellt werden konnte. Nach Abwaschen der Zellsuspension mit 4 ml Zellkulturmedium wurde die entstandene Suspension ebenso in das Zentrifugenröhrchen dekantiert und 4 min bei 300 g zentrifugiert. Die Färbung und Antikörpermarkierung des Zellsediments erfolgte anschließend nach den Herstellerangaben des *Annexin V-FITC Detection Kit* (Hersteller: PromoKine, Heidelberg, Deutschland).

### **Messung am Durchflusszytometer**

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben. Die Detektion des PI-Signals erfolgte dabei im Kanal *PerCP*, die des FITC-Signals im Kanal *FITC*.

#### **2.2.5.3 Auswertung**

Die Vorgehensweise zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen ist bereits vorgeschrieben (Greve et al. 2009). Früh- und spätapoptotische Zellen wurden zusammengefasst als *apoptotische Zellen* dargestellt. Die gemessenen Werte sämtlicher Behandlungsmodalitäten wurden dabei in Relation zu den korrespondierenden, mit der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) behandelten Zellen gesetzt.

## 2.2.6 Koloniebildungstests

### 2.2.6.1 Prinzip des Koloniebildungstests

Der 2D-Koloniebildungstest nach Puck und Marcus (Puck et al. 1956) ist eine etablierte Standardmethode zur Bestimmung des klonogenen Zellüberlebens. Dazu werden Einzelzellen in definierter Anzahl ausgesät, anschließend mit der zu untersuchenden Noxe behandelt und dann so lange inkubiert, bis sich Kolonien, definiert als aus Einzelzellen entstandene Zellagglomerate mit mindestens 50 Zellen, gebildet haben. Eine immer mit untersuchte unbehandelte Kontrollgruppe dient der Bestimmung der zelllinienspezifischen Plattierungseffizienz und ermöglicht die Berechnung der Überlebensfraktion nach Einwirken der Noxe (Franken et al. 2006).

### 2.2.6.2 Durchführung

Die Planung der Versuche wurde mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. Frank Ziemann durchgeführt.

### **Aussaat und Behandlung der Zellen**

Sofern nicht anders angegeben, wurde der Versuch für jede Behandlungsgruppe einschließlich der obligaten Lösungsmittelkontrolle in drei Zellkulturgefäßen (*Triplikate*) mit einer jeweiligen Wachstumsfläche von 21 cm<sup>2</sup> durchgeführt.

Das Ablösen und die Zellzahlbestimmung der in exponentieller Wachstumsphase befindlichen Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben. Ziel war, in jeder Behandlungsgruppe eine Kolonieanzahl von ca. 100–150 Kolonien pro Zellkulturgefäß zu erhalten. Entsprechend musste die optimale Anzahl der eingesäten Zellen pro Behandlungsgruppe zunächst ausgetestet werden und lag bei Behandlungsgruppen, in denen viele Zellen die Behandlung überlebten niedriger als bei Behandlungen mit hoher Zytotoxizität. Da die Zellsuspension mit der entsprechend eingestellten Zellzahl immer zu Nennvolumina von 4 ml pro Zellkulturgefäß eingesät werden sollte, waren entsprechend mehrere Zwischenverdünnungen der Stammlösung in Zellkulturmedium notwendig. Je nach Versuchsaufbau erfolgte zudem unmittelbar bei Aussaat die direkte Zugabe von DMSO und Bortezomib. Die Zellkulturgefäße wurden anschließend im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert.

Sofern die Zugabe von Bortezomib oder DMSO im Rahmen eines Mediumwechsels durchgeführt wurde, erfolgte die Verdünnung der Substanzen in Zellkulturmedium wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben. Nach Absaugen der Überstände im Zellkulturgefäß

wurden anschließend 4 ml des mit den Substanzen angereicherten Zellkulturmediums hinzugefügt.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, die Behandlung mit Cisplatin wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben.

Detaillierte Informationen zum zeitlichen Ablauf der Behandlungsschritte befinden sich schematisch aufgeführt im Ergebnisteil.

### **Mediumwechsel**

Zur Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und wachstumsstimulierenden Faktoren für das Langzeitwachstum sowie zum Entfernen von DMSO, Bortezomib und Cisplatin, war ein Mediumwechsel erforderlich.

Da der Wachstumsreiz der ausgesäten Einzelzellen nur sehr gering ist, wurde zur Verbesserung des Zellwachstums das Zellkulturmedium mit Zellkulturmedium-Überständen der gleichen Zelllinie angereichert (Franken et al. 2006). Diese Überstände wurden beim Passagieren der Zellen entnommen, für 4 min bei 300 g zentrifugiert und nach erfolgter Sterilfiltration bei +4 °C gelagert. Frisches Zellkulturmedium wurde mit diesen Überständen im Verhältnis 2:1 versetzt (sog. *konditioniertes Zellkulturmedium*).

Der Mediumwechsel erfolgte durch Absaugen des Überstandes und anschließendes Überschichten des Zellrasens mit 4 ml konditioniertem Zellkulturmedium.

### **Fixierung und Färbung der Kolonien**

Die Fixierung der gewachsenen Kolonien zur Auswertung war, abhängig von den individuellen Wachstumseigenschaften der Zelllinien, 6 bis 22 Tage nach Aussaat erforderlich. Ab ca. 5 Tagen nach Aussaat erfolgten tägliche mikroskopische Kontrollen der Koloniebildung.

Für die Versuche mit alleiniger Bortezomib-Behandlung erfolgte die Fixierung des gesamten Versuchs in Abhängigkeit von der DMSO-behandelten Kontrollgruppe. Bei den übrigen Versuchen wurde jede einzelne Behandlungsgruppe in Abhängigkeit ihres individuellen Koloniewachstums zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert, mit dem Ziel denen der Kontrollgruppe vergleichbar große Kolonien zu erhalten. In jedem Falle wurden immer alle Triplikate einer Behandlungsgruppe gleichzeitig fixiert.

Zur Fixierung und Färbung der Kolonien schloss sich nach Absaugen des überstehenden Zellkulturmediums ein einmaliger Waschvorgang mit PBS (1x) an; anschließend wurde der Boden des Zellkulturgefäßes vollständig mit der Fixier- und Färbelösung für Kolonien überschichtet. Das enthaltene Formaldehyd bewirkte die Fixierung der Zellen auf dem Zellkulturgefäß, während das Kristallviolett zu einer Anfärbung der Zellen führte. Nach 10 min wurde die Lösung abgekippt und das Zellkulturgefäß in einer Wanne mit vollentsalztem Wasser gewaschen. Nach Lufttrocknung waren die Zellkulturgefäße mit den Kolonien langzeitlagerfähig.

### 2.2.6.3 Auswertung

Das Auszählen der Kolonien erfolgte manuell auf einer Leuchtplatte unter Zuhilfenahme eines Mikroskops. Um sicherzustellen, dass nur Kolonien mit einer Mindestzahl von 50 Zellen gezählt werden, wurde zuerst unter mikroskopischer Sicht eine Größenordnung durchgeführt. Anschließend wurden die Kolonien makroskopisch auf einer Leuchtplatte unter Berücksichtigung dieser Kriterien gezählt.

Nach Bildung des arithmetischen Mittels der Triplikate erfolgte zuerst die Errechnung der *Plattierungseffizienz* (PE, plating efficiency) für die jeweilige Behandlungsgruppe. Anschließend konnte daraus die *Überlebensfraktion* (SF, surviving fraction) in Relation zur Kontrollgruppe errechnet werden. Die grafische Darstellung der Überlebensfraktion erfolgte halblogarithmisch in Bezug auf die Behandlungsbedingungen (Franken et al. 2006).

### 2.2.7 Statistische Auswertung

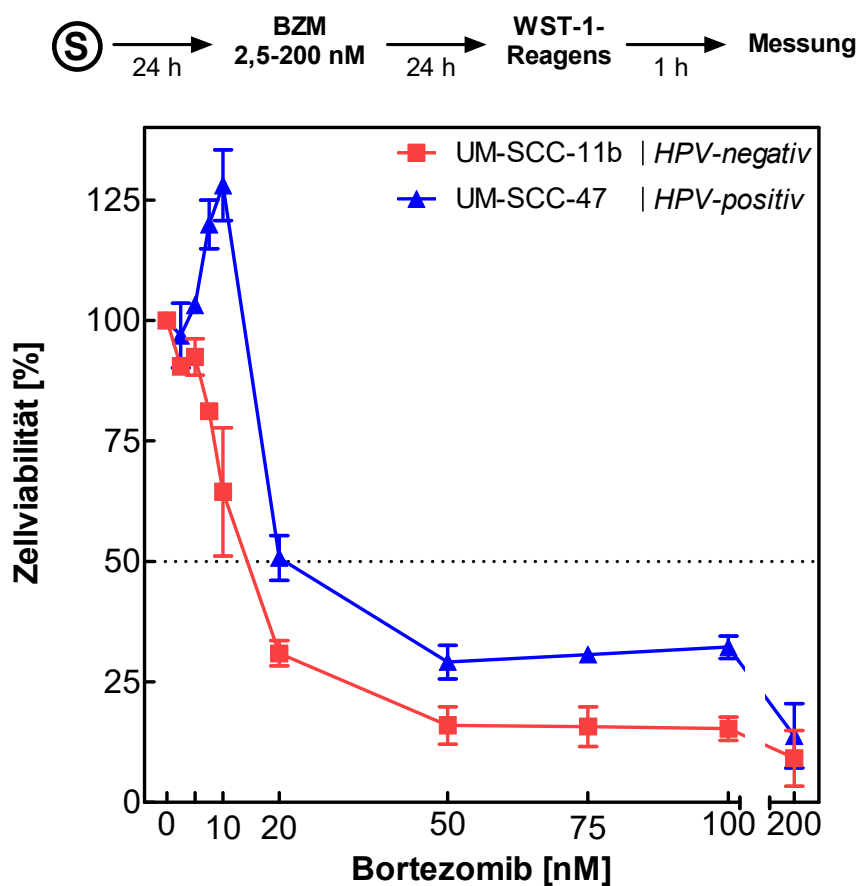
Sofern nicht anders angegeben, wurde für die grafische Darstellung das arithmetische Mittel der unabhängigen Einzelversuche mit dem zugehörigen *Standardfehler des Mittelwerts* (SEM, standard error of the mean) gewählt. Die Anzahl der Einzelversuche  $n$  für die verschiedenen Untersuchungen ist im Ergebnisteil ausgewiesen. Signifikanzwerte wurden, sofern nicht anders angegeben, mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet, wobei Werte  $p < 0,05$  als signifikant angesehen wurden. Die Auszeichnung in den Abbildungen erfolgte folgendermaßen:

n. s.	$p > 0,05$
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$ .

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Zellviabilität

Zur Konzentrationsfindung wurde die Zellviabilität einer HPV-positiven und einer HPV-negativen HNSCC-Zelllinie nach Behandlung mit aufsteigenden Bortezomib-Konzentrationen untersucht. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sind in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2: Wirkung von Bortezomib auf die Zellviabilität.**

Die Behandlung mit Bortezomib (BZM) wurde 24 h nach Aussaat der Zellen (S) durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Zugabe des WST-1-Reagens, nach einer weiteren Stunde die photometrische Messung. Dargestellt ist die prozentuale Zellviabilität (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle) in Abhängigkeit von der Bortezomib-Konzentration.  $n = 3$ .

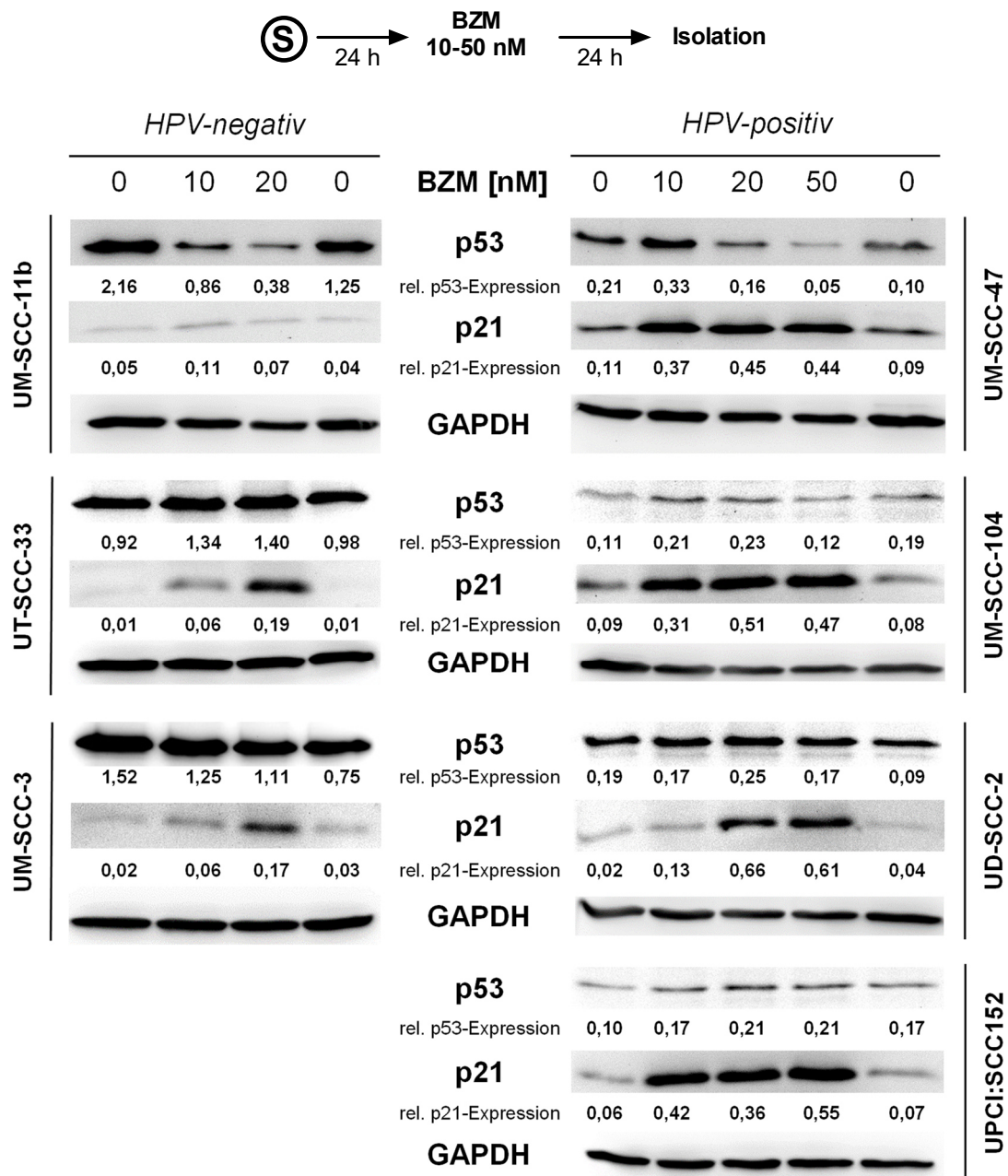
Bortezomib führte in der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC-11b bereits ab der geringsten verwendeten Konzentration (2,5 nM) zu einer Verminderung der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In der HPV-positiven Zelllinie UM-SCC-47 hingegen war bis zu einer Bortezomib-Konzentration von 10 nM die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle verbessert, ab 20 nM zeigte sich jedoch eine deutliche Verminderung der Zellviabilität. Die Zellviabilität war im gesamten Konzentrationsbereich höher als diejenige in der Zelllinie UM-SCC-11b.

Aus der grafischen Darstellung ermittelt ergibt sich für UM-SCC-11b ein  $IC_{50}$ -Wert (*Mittlere inhibitorische Konzentration*; Bortezomib-Konzentration, die zu einer Reduktion der Zellviabilität um 50 % führt) von ca. 14 nM; für UM-SCC-47 ein  $IC_{50}$ -Wert von ca. 20 nM.

## 3.2 Proteinbiochemische Untersuchungen

### 3.2.1 Wirkung von Bortezomib auf die Expression von p53 und p21

Im Folgenden wurde die Wirkung von Bortezomib auf die Proteinexpression von p53 und p21 in vier HPV-positiven und drei HPV-negativen Zelllinien untersucht. Basierend auf den Ergebnissen des Viabilitätstests wurde Bortezomib für diese Versuche in den Konzentrationen 10 nM und 20 nM für alle, sowie 50 nM zusätzlich für die HPV-positiven Zelllinien verwendet. Der zeitliche Ablauf mit einer Behandlung über 24 h wurde wie in den Viabilitätstests durchgeführt. Exemplarische Western Blots für alle untersuchten Zelllinien sind in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3: Wirkung von Bortezomib auf die Proteinexpression von p53 und p21.**

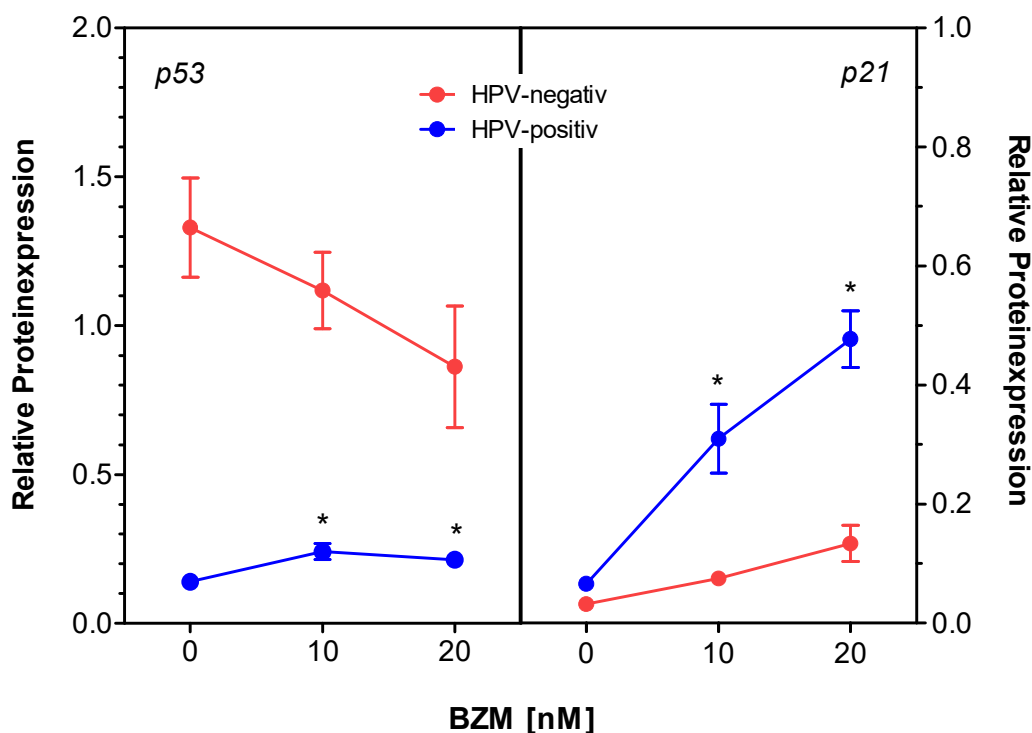
Exemplarische Western Blots für drei HPV-negative (*links*) und vier HPV-positive HNSCC-Zelllinien (*rechts*) nach Behandlung mit Bortezomib (BZM) für 24 h in den angegebenen Konzentrationen mit Angabe der relativen (*rel.*) Proteinexpression nach densitometrischer Auswertung. S, Aussaat der Zellen; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

In allen HPV-negativen Zelllinien war eine hohe Expression von p53 in der Kontrollgruppe nachweisbar, nach Behandlung mit Bortezomib war diese allerdings nur gering verändert. Die Expression von p21 in der Kontrollgruppe der HPV-negativen Zelllinien befand sich am Rande der Nachweisgrenze, nach Behandlung mit Bortezomib konnte

nur durch die höhere Konzentration (20 nM) eine marginale Erhöhung der p21-Expression in zwei Zelllinien ausgemacht werden.

In den HPV-positiven Zelllinien hingegen wurde die unter Ausgangsbedingungen niedrige p53-Expression durch Behandlung mit Bortezomib erhöht, und zwar bereits bei einer Bortezomib-Konzentration von 10 nM. Darüber hinaus führte diese Behandlung zu einem markanten Anstieg der p21-Expression in allen HPV-positiven Zelllinien.

Zur Quantifizierung des relativen Anstiegs der Proteinexpression in den HPV-positiven im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien unter Berücksichtigung der in den Zelllinien individuell verschiedenen absoluten Proteinexpression erfolgte die Berechnung der *relativen Expression* für p53 bzw. p21, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben. Diese nach HPV-Status der Zelllinien stratifizierten Ergebnisse sind in Abb. 4 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 4: Unterschiedliche Proteinexpression nach Behandlung mit Bortezomib.**

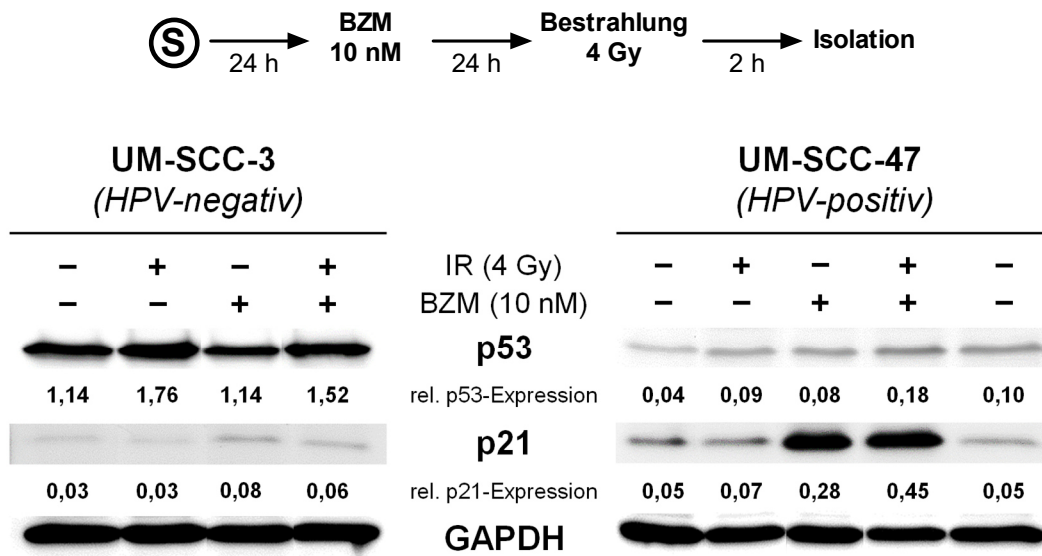
Darstellung der relativen Expression von p53 (*links*) und p21 (*rechts*) nach Behandlung mit Bortezomib (BZM) in den angegebenen Konzentrationen für die Gruppe der HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.  $n = 2$  für jede Zelllinie.



Somit führte Bortezomib in der Gruppe der HPV-positiven Zelllinien in den Konzentrationen 10 nM und 20 nM zu einem signifikanten Anstieg von p53 (jeweils  $p = 0,03$ ) und p21 (jeweils  $p = 0,03$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Expression beider Proteine in der Gruppe der HPV-negativen Zelllinien änderte sich nach Bortezomib-Behandlung nicht signifikant. Im Trend war in dieser Gruppe sogar eine relative Abnahme der p53-Konzentration zu erkennen.

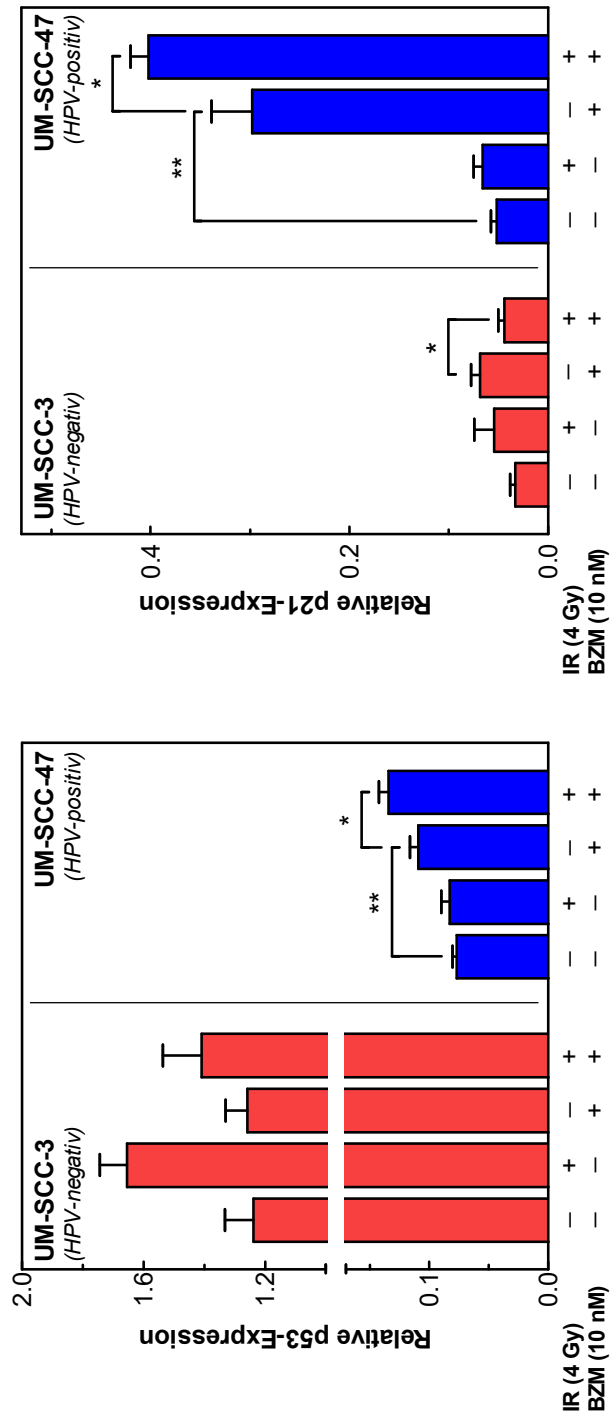
### 3.2.2 Wirkung von Bortezomib und Bestrahlung auf die Proteinexpression

In einer folgenden Versuchsreihe wurde untersucht, inwiefern die Expression von p53 und p21 durch eine kombinierte Behandlung aus Bortezomib und Bestrahlung in zwei ausgewählten Zelllinien beeinflusst wird. Da bereits die niedrige Bortezomib-Konzentration von 10 nM in den angeführten Ergebnissen zu signifikant messbaren Unterschieden in der Proteinexpression führte, wurde diese für die Kombination mit einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy gewählt. Der Zeitraum der 24-stündigen Vorbehandlung mit Bortezomib aus den vorhergehenden Versuchen wurde beibehalten; die Herstellung von Zelllysaten erfolgte 2 h nach der sich anschließenden Bestrahlung. Exemplarische Western Blots sind in Abb. 5, die densitometrische Auswertung aller Versuche der Versuchsreihe in Abb. 6 dargestellt.



**Abb. 5: Wirkung von Bortezomib und Bestrahlung auf die Proteinexpression.**

24 h nach Aussaat (S) erfolgte die Behandlung mit 10 nM Bortezomib (BZM), nach weiteren 24 h die Bestrahlung (IR) mit 4 Gy. Nach zweistündiger Inkubation wurden Zelllysate präpariert und für proteinbiochemische Analysen prozessiert. Exemplarische Western Blots für die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-3 (*links*) und die HPV-positive Zelllinie UM-SCC-47 (*rechts*) mit Angabe der Behandlungsmodalitäten sowie der relativen (*rel.*) Proteinexpression nach densitometrischer Auswertung. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase



**Abb. 6: Veränderte Proteineexpression nach Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung.**

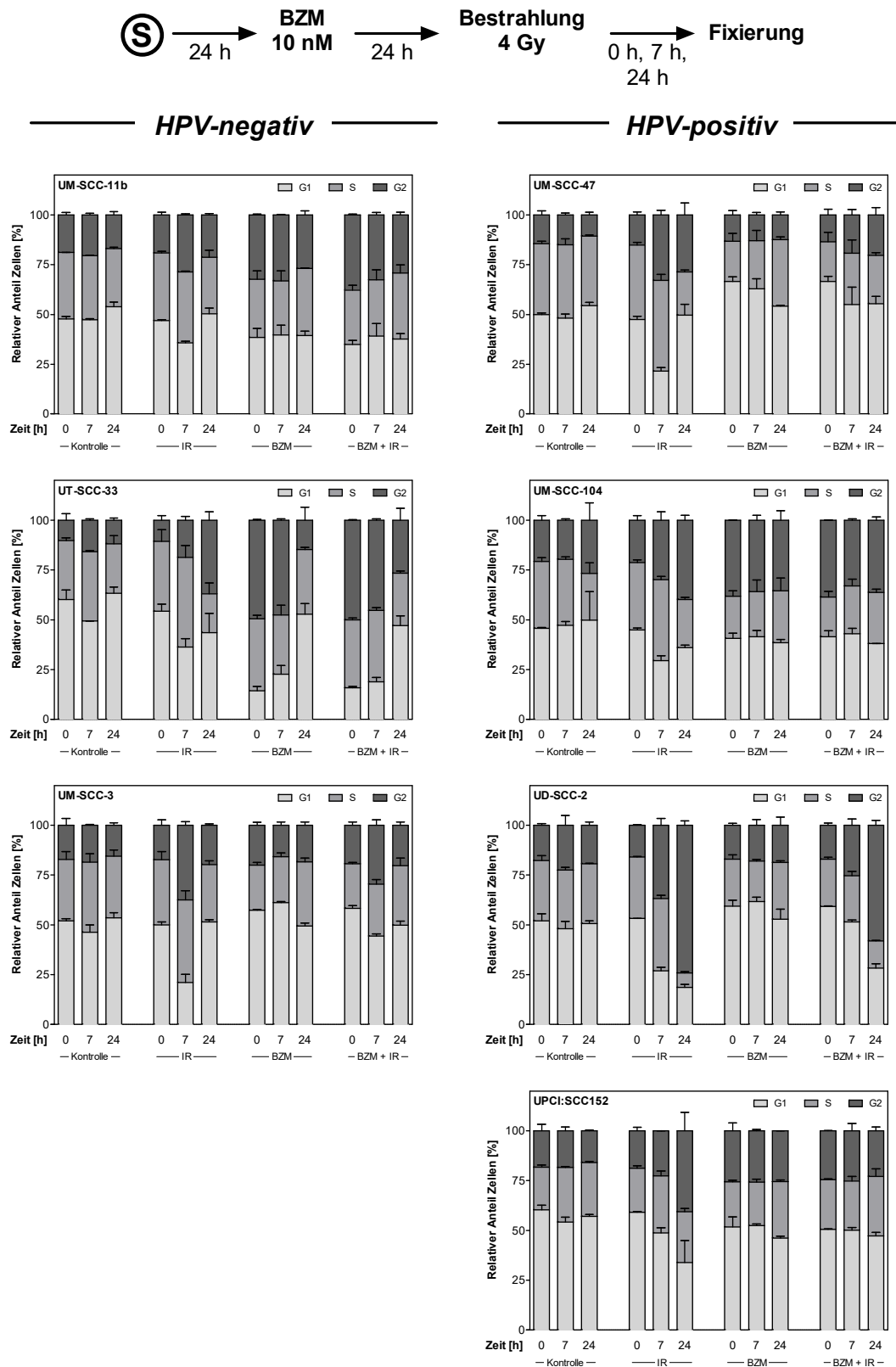
Relative Expression von p53 (*links*) und p21 (*rechts*) in den Zelllinien UM-SCC-3 (HPV-negativ) und UM-SCC-47 (HPV-positiv) nach densitometrischer Auswertung, n = 6. BZM, Bortezomib; IR, Photonenbestrahlung.

Hinsichtlich der Proteinexpression in der Kontrollgruppe sowie in der alleinig mit Bortezomib behandelten Gruppe waren die Ergebnisse zu der o. g. Versuchsreihe konkordant; Bortezomib induzierte die p53- und p21-Expression nur in der HPV-positiven Zelllinie in einem signifikanten Ausmaß (p53:  $p = 0,004$ ; p21:  $p = 0,005$ ). Die alleinige Bestrahlung führte zu einer geringen Aktivierung von p53 und p21 in der HPV-positiven Zelllinie UM-SCC-47, jeweils aber unter dem Niveau der mit Bortezomib allein behandelten Gruppe. In der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC-3 war durch Bestrahlung eine isoliert gesteigerte Aktivierung von p53 auszumachen, die entsprechende Aktivierung von p21 war allerdings nur gering ausgeprägt.

Die kombinierte Behandlung aus Bortezomib und Bestrahlung führte, in Relation zur alleinig mit Bortezomib behandelten Gruppe, zu einem signifikanten Anstieg von p53 ( $p = 0,03$ ) und p21 ( $p = 0,04$ ) in der HPV-positiven Zelllinie. In der HPV-negativen Zelllinie hingegen wurde die Expression von p53 *nicht* moduliert ( $p = 0,33$ ), während die von p21 signifikant abnahm ( $p = 0,04$ ).

### 3.3 Zellzyklusanalyse

In Anknüpfung an die gezeigten, divergenten Effekte von Bortezomib in HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien hinsichtlich der p53- und p21-Expression wurden im Folgenden die Auswirkungen dessen untersucht. Da, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, die Regulation der Zellzyklusprogression entscheidend durch den p53-/p21-Signalweg gesteuert wird, erfolgte die Analyse der Modulation der Zellzyklusphasendistribution durch Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung. Zur Vergleichbarkeit der Effekte wurden auch hier Behandlungsablauf und Dosen bzw. Medikamentenkonzentrationen beibehalten; die Fixierung der Proben zur Analyse erfolgte zu den Zeitpunkten 0 h, 7 h und 24 h nach Bestrahlung. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse in den einzelnen Zelllinien sind in Abb. 7 dargestellt.



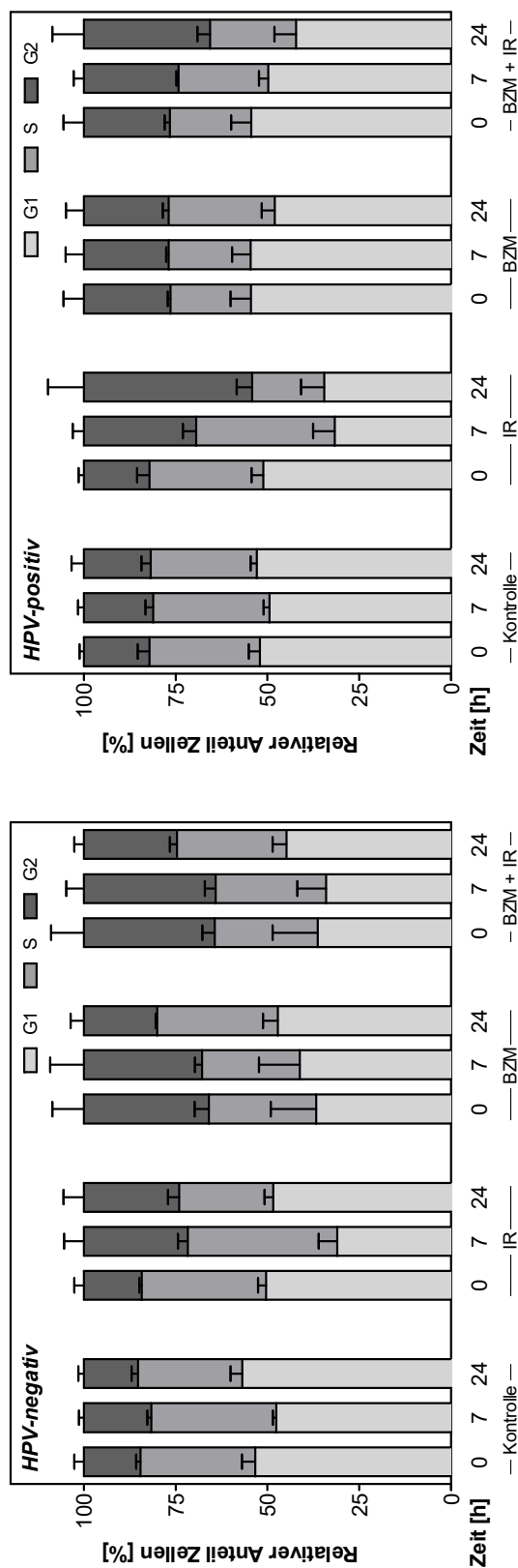
**Abb. 7: Beeinflussung der Zellzyklusprogression durch Bortezomib und Bestrahlung.**

Prozentuale Anteile der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase von drei HPV-negativen (*links*) und vier HPV-positiven Zelllinien (*rechts*) nach durchflusszytometrischer Messung. Die Behandlung mit Bortezomib (BZM) erfolgte 24 h nach Aussaat (S), die Fixierung der Proben zu den Zeitpunkten 0 h, 7 h und 24 h nach Bestrahlung (IR).  $n = 2$  für jede Zelllinie.

Die alleinige Bestrahlung führte in allen HPV-negativen Zelllinien zu einem transienten Arrest in der G<sub>2</sub>-Phase mit einem Maximum am Messzeitpunkt 7 h nach Bestrahlung. In der Zelllinie UT-SCC-33 war der G<sub>2</sub>-Arrest auch nach 24 h noch progredient. Die Zellzyklusphasenverteilung wurde durch Bortezomib allein im Vergleich zur Kontrollgruppe kaum beeinflusst, mit Ausnahme der Zelllinie UT-SCC-33, wo sich ein transienter Arrest in der G<sub>2</sub>-Phase zeigte. Die kombinierte Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung modulierte die Zellzyklusphasenverteilung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung nur gering; in UT-SCC-33 stellte sich die Verteilung allerdings vergleichbar mit der alleinigen Bortezomib-Behandlung dar.

In der Gruppe der HPV-positiven Zelllinien führte die alleinige Bestrahlung in allen Zelllinien zu einem ausgeprägten G<sub>2</sub>-Arrest, der in UM-SCC-47 und UM-SCC-104 nur transient war. Auch in dieser Gruppe wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen durch Bortezomib allein nur gering im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle moduliert. Durch die kombinierte Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung war in allen vier Zelllinien ein deutlicher Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase erkennbar.

Wie auch im vorherigen Abschnitt erfolgte eine gruppierte Analyse nach HPV-Status stratifiziert. Diese ist in Abb. 8 dargestellt.



**Abb. 8: Stratifikation der Zellzyklusprogression nach HPV-Status.**

Zusammengefasste Darstellung der Zellzyklusphasenverteilung für HPV-negative (*links*) und HPV-positive Zelllinien (*rechts*). BZM, Bortezomib; IR, Photonenbestrahlung.

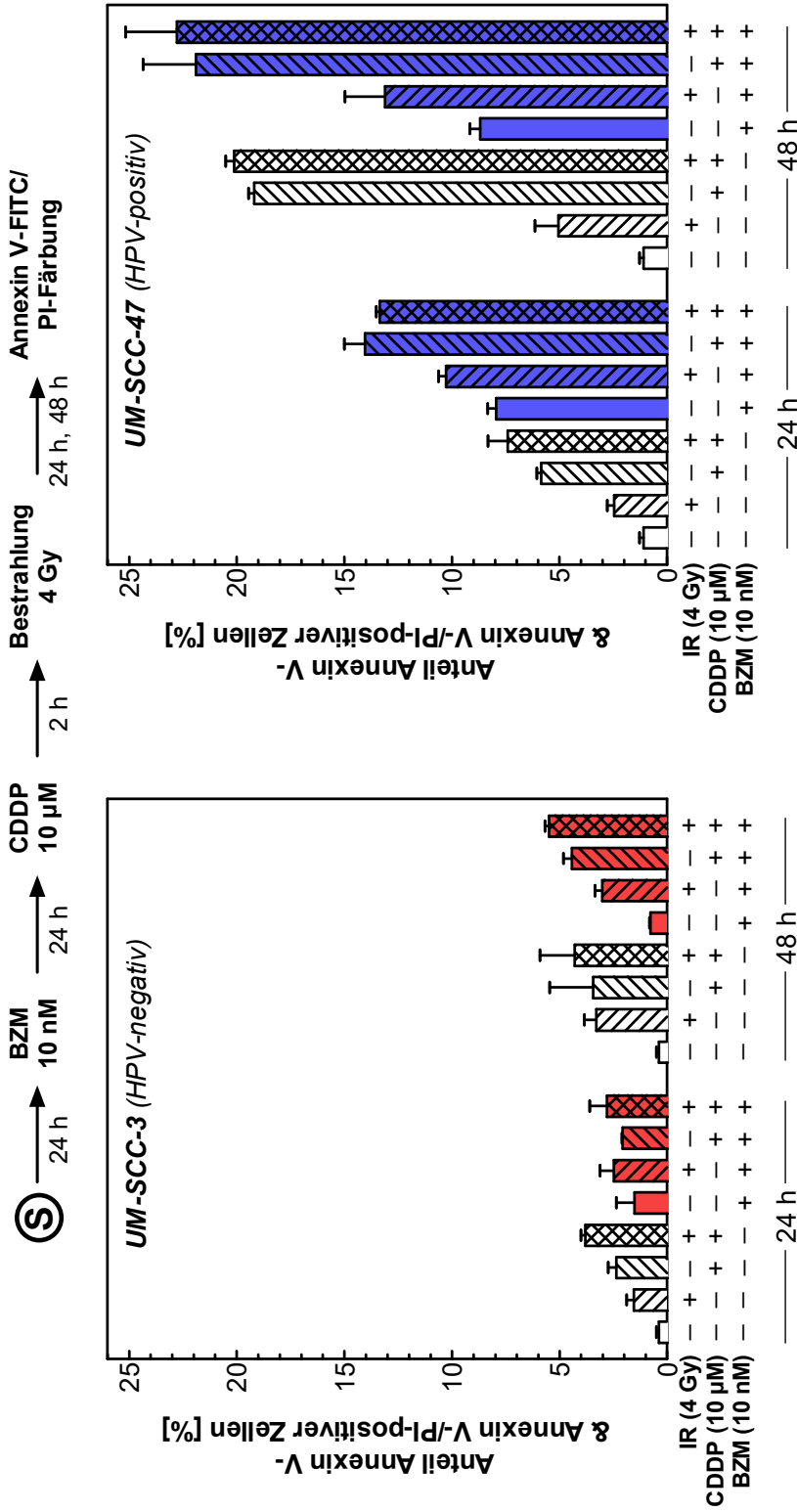
In Zusammenschau der Ergebnisse waren in der Gruppe der HPV-negativen Zelllinien nur geringe Änderungen der Zellzyklusphasenverteilung durch Zugabe von Bortezomib in der Gruppe der unbestrahlten bzw. bestrahlten Zellen zu verzeichnen, die im Bereich der Standardabweichung liegen.

In der Gruppe der HPV-positiven Zelllinien hingegen zeigte sich durch die kombinierte Behandlung aus Bortezomib und Bestrahlung ein transienter G<sub>1</sub>-Arrest, während die alleinige Bortezomib-Behandlung zu keiner Änderung der Zellzyklusphasenverteilung führte. Unter Berücksichtigung der beschriebenen Abweichungen war der bestrahlungsinduzierte G<sub>2</sub>-Arrest in den HPV-positiven im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien stärker ausgeprägt und prolongiert.

### 3.4 Apoptoseinduktion

Die Induktion von Apoptose ist ein weiterer zentraler Mechanismus, der durch p53-abhängige Signalwege vermittelt wird. Es erfolgte daher die Messung der Apoptoseinduktion durch Bortezomib, Cisplatin, Bestrahlung und deren Kombinationen mittels Annexin V-FITC/PI-Färbung und Durchflusszytometrie für zwei ausgewählte Zelllinien, deren p53-Signalweg unter den angegebenen Behandlungen zuvor bereits proteinbiochemisch untersucht wurde (siehe oben). Der zeitliche Ablauf mit einer 24-stündigen Bortezomib-Vorbehandlung (10 nM) wurde beibehalten. Anschließend folgte die Behandlung mit Cisplatin (10 µM) 2 h vor Bestrahlung (4 Gy). Die Messung erfolgte 24 h und 48 h nach Bestrahlung. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt.





**Abb. 9: Apoptoseinduktion durch Bortezomib und Kombinationsbehandlungen.**

Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen nach Bestrahlung (IR) sowie Behandlung mit Bortezomib (BZM) und Cisplatin (CDDP) in UM-SCC-3 (HPV-negativ, links) und UM-SCC-47 (HPV-positiv, rechts), jeweils gemessen 24 h und 48 h nach Bestrahlung. n = 2. S, Ausaat; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PI, Propidiumiodid.

In der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC-3 wurde durch keine Behandlungsmodalität eine relevante Induktion von Apoptose erreicht, insbesondere nicht durch Kombination mit Bortezomib. Der Anteil apoptotischer Zellen blieb bei allen Behandlungen in einem Bereich bis maximal ca. 5 %.

In der HPV-positiven Zelllinie UM-SCC-47 hingegen führte Bortezomib allein schon in der frühen Messung zur Induktion von Apoptose (7,9 %), die der Apoptoseinduktion durch Kombination von Cisplatin mit einer Bestrahlung (7,4 %) vergleichbar war. Durch die Kombination aus Cisplatin, Bestrahlung und Bortezomib stieg der Anteil apoptotischer Zellen signifikant nach 24 h an ( $p = 0,02$ ; *t-Test nach Student*). Dieser zusätzliche Anstieg war allerdings nach 48 h nicht mehr zu verzeichnen ( $p = 0,38$ ; *t-Test nach Student*).

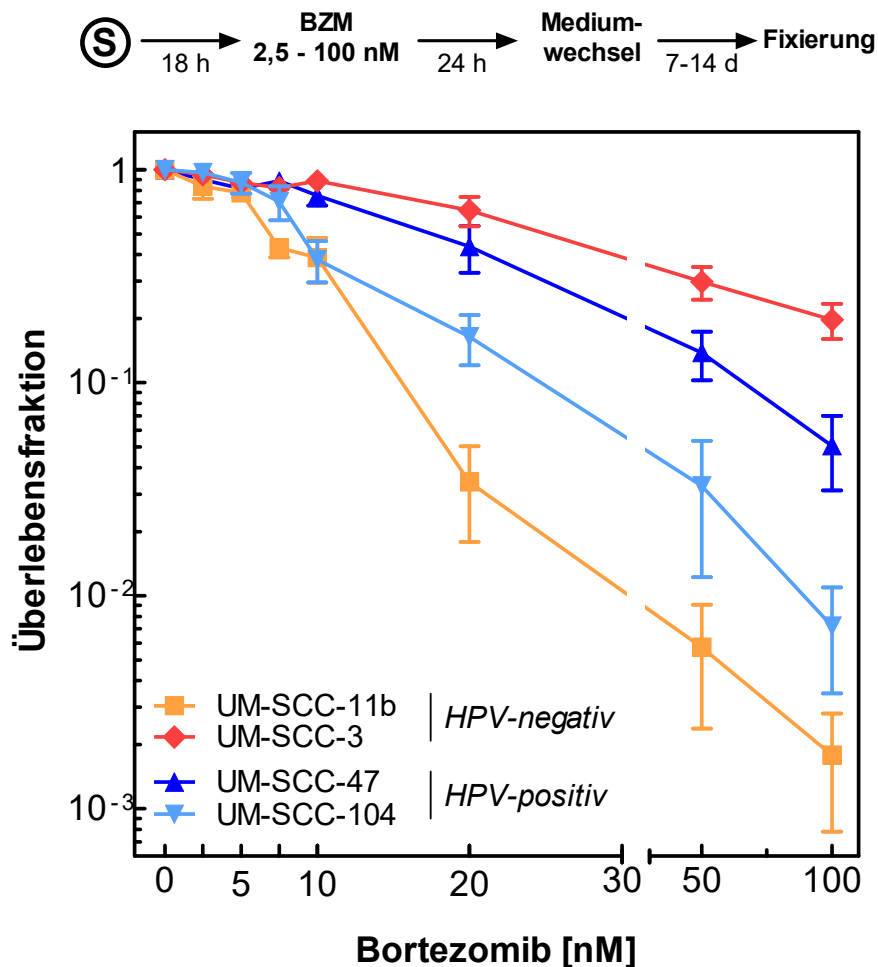
Zusammenfassend wurde in der HPV-positiven Zelllinie im Gegensatz zur HPV-negativen Zelllinie Apoptose als wichtige zelluläre Reaktion nach Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung beobachtet. Der Effekt der Kombination der Bestrahlung mit Cisplatin konnte durch Zugabe von Bortezomib relevant verstärkt werden. Die HPV-negative Zelllinie scheint auf Grundlage dieser Ergebnisse weniger sensitiv gegenüber den durchgeführten Behandlungen zu sein oder ein Defizit in der Induktion von Apoptose aufzuweisen.

## 3.5 Klonogenes Überleben

Das klonogene Überleben von HNSCC-Zellen nach Behandlung mit Bortezomib, Cisplatin, Bestrahlung und Kombinationen daraus wurde mittels Koloniebildungstest bestimmt.

### 3.5.1 Behandlung mit Bortezomib

Der Versuch wurde mit je zwei HPV-negativen (UM-SCC-3, UM-SCC-11b) und HPV-positiven (UM-SCC-47, UM-SCC-104) HNSCC-Zelllinien durchgeführt. Nach Aussaat der Zellen und Inkubation über Nacht erfolgte die 24-stündige Behandlung mit Bortezomib in einer Konzentration zwischen 2,5 nM und 100 nM. Nach einem Mediumwechsel erfolgte die Inkubation, bis die Kolonien fixiert werden konnten. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 10 dargestellt.



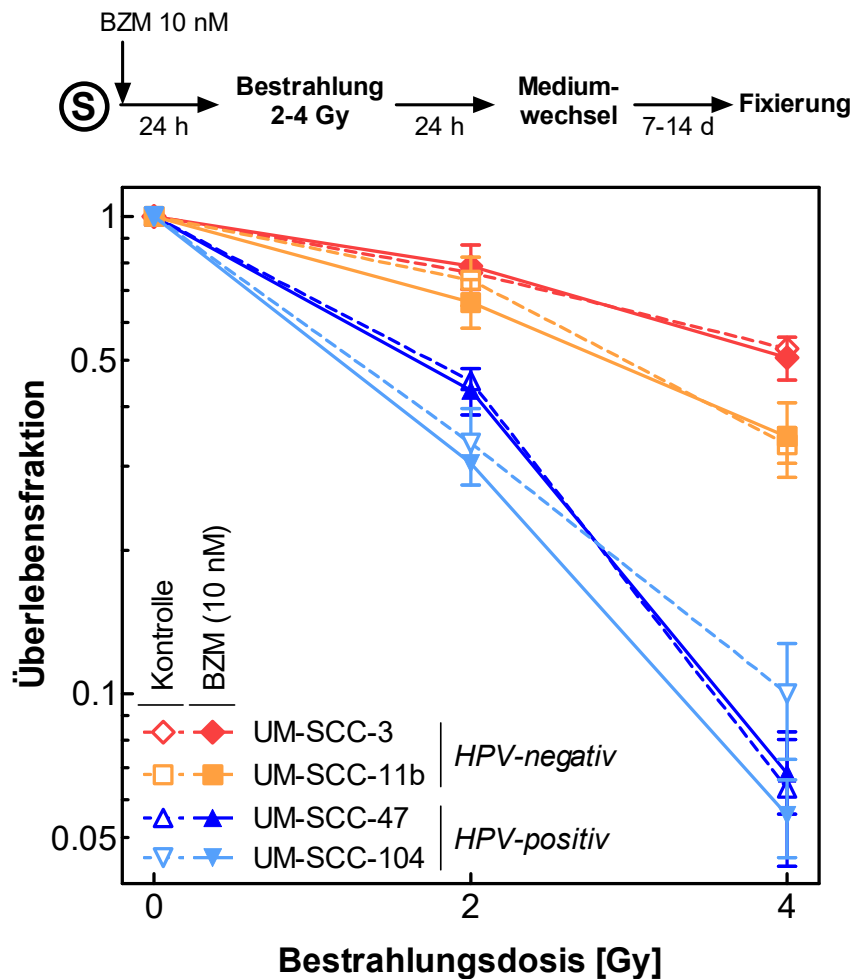
**Abb. 10: Konzentrationsabhängige Reduktion des klonogenen Überlebens durch Bortezomib.**

Halblogarithmische Darstellung der Überlebensfraktion der angegebenen Zelllinien in Abhängigkeit von der verwendeten Bortezomib-Konzentration. Die Behandlung mit Bortezomib (BZM) erfolgte nach Inkubation über Nacht ca. 18 h nach Aussaat (S).  $n = 3$ .

Bortezomib führte in allen untersuchten Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der Überlebensfraktion. Die Zelllinie UM-SCC-3 zeigte sich am resistentesten, die Zelllinie UM-SCC-11b hingegen am sensibelsten gegenüber einer Bortezomib-Behandlung. Es bestand keine Korrelation zwischen Therapiesensibilität und HPV-Status. In allen Zelllinien war in einer Konzentration unterhalb 7,5 nM Bortezomib nur eine geringe Reduktion des klonogenen Überlebens feststellbar; ab 10 nM zeigte sich hingegen in allen Zelllinien ein deutlicher Effekt mit Abnahme der Überlebensfraktion bei hohen Bortezomib-Konzentrationen. Aus diesem Grund wurde auch für die folgenden Versuche zur Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und Bestrahlung die Bortezomib-Konzentration 10 nM gewählt.

### 3.5.2 Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung

Die Analyse einer möglichen Strahlensensibilisierung durch Bortezomib wurde für die o. g. Zelllinien mittels Koloniebildungstests mit 10 nM Bortezomib und anschließender Bestrahlung durchgeführt. Das Zeitschema mit einer 24-stündigen Vorbehandlung wurde beibehalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

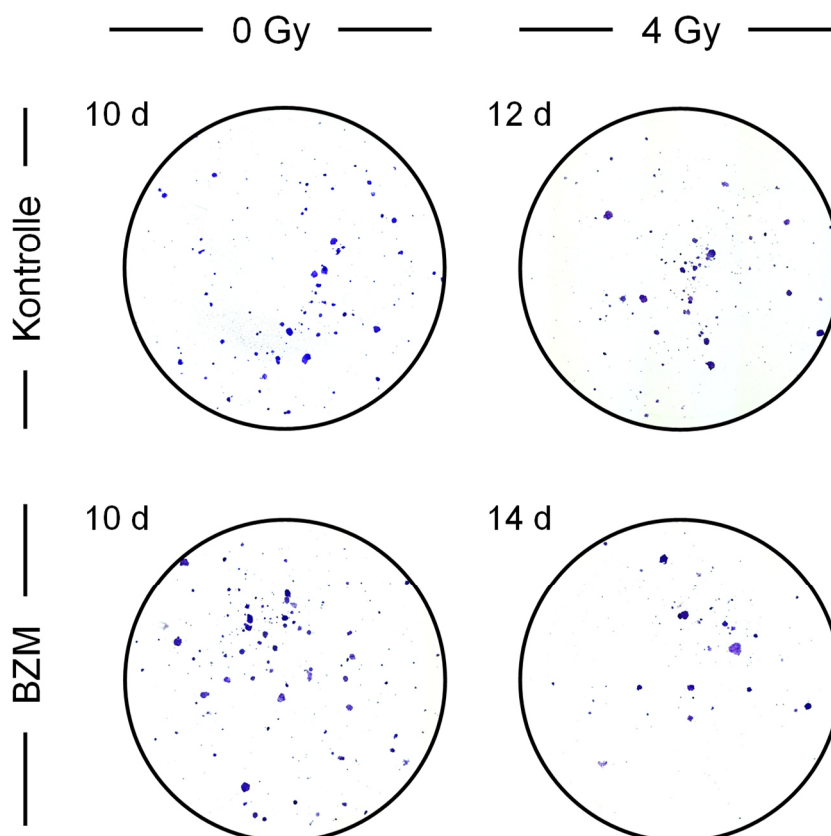


**Abb. 11: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung.**

Halblogarithmische Darstellung der Überlebensfraktion der Zelllinien in Abhängigkeit von der verwendeten Bestrahlungsdosis. Die Behandlung mit Bortezomib (BZM) erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat (S), die Bestrahlung nach 24-stündiger Inkubation. *Gestrichelte Linien, offene Symbole*: Lösungsmittelkontrolle, *durchgezogene Linien, geschlossene Symbole*: Bortezomib-Behandlung.  $n = 3$ .

Die HPV-positiven Zelllinien UM-SCC-47 und UM-SCC-104 wiesen im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle eine signifikant höhere Strahlenempfindlichkeit auf (2 Gy:  $p = 0,001$ ; 4 Gy:  $p = 0,001$ ). Eine Vorbehandlung mit Bortezomib führte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu keiner weitergehenden Reduktion der Überlebensfraktion, so dass keine Strahlensensibilisierung auszumachen war. Diesbezüglich war kein Unterschied zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Zelllinien erkennbar.

Die Behandlung mit Bortezomib führt allerdings zu einer Wachstumsverzögerung. Um den Effekt dieser Wachstumsverzögerung zu kompensieren und die Ergebnisse bezüglich des klonogenen Überlebens hierdurch nicht zu verfälschen, wurden die behandelten Zellkulturen so lange inkubiert, bis deren Koloniegröße mit den Kolonien in der Kontrollgruppe vergleichbar war, wie exemplarisch in Abb. 12 gezeigt ist.

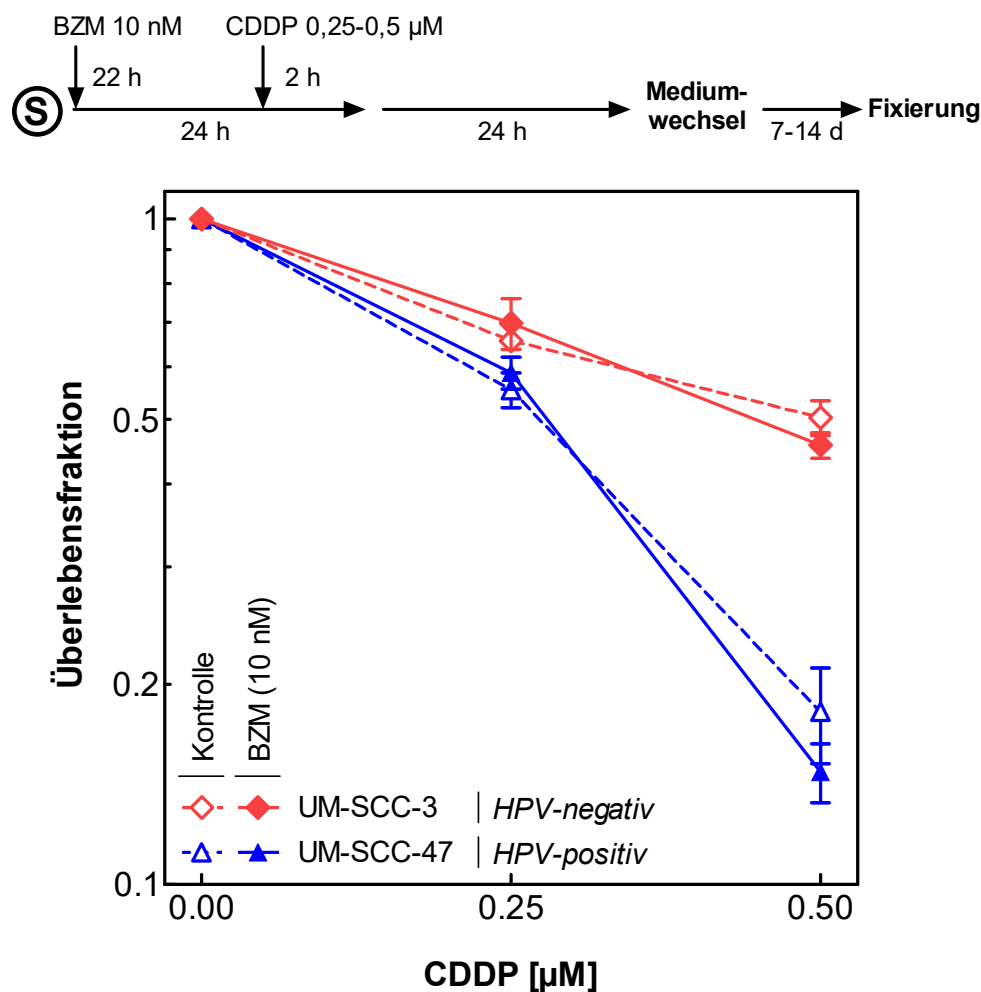


**Abb. 12: Wachstumsverzögerung durch Bortezomib.**

Fotos repräsentativer Zellkulturgefäße mit Kolonien der Zelllinie UM-SCC-3 (*HPV-negativ*) nach Behandlung mit Bortezomib (*BZM*) bzw. Bestrahlung mit zusätzlicher Angabe der Tage (*d*) zwischen Aussaat und Fixierung der Kolonien.

### 3.5.3 Behandlung mit Bortezomib und Cisplatin

Für zwei ausgewählte Zelllinien, die bereits deutliche Unterschiede in Proteinexpression und Induktion von Apoptose zeigten (siehe oben), wurde im Folgenden eine Chemosensibilisierung durch Bortezomib untersucht. Dazu wurde Bortezomib (10 nM) bei Aussaat der Zellen zugegeben und nach 22-stündiger Inkubation mit Cisplatin (0,25–0,5  $\mu\text{M}$ ) ergänzt. Nach weiteren 26 h erfolgte der Mediumwechsel. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 13 dargestellt.



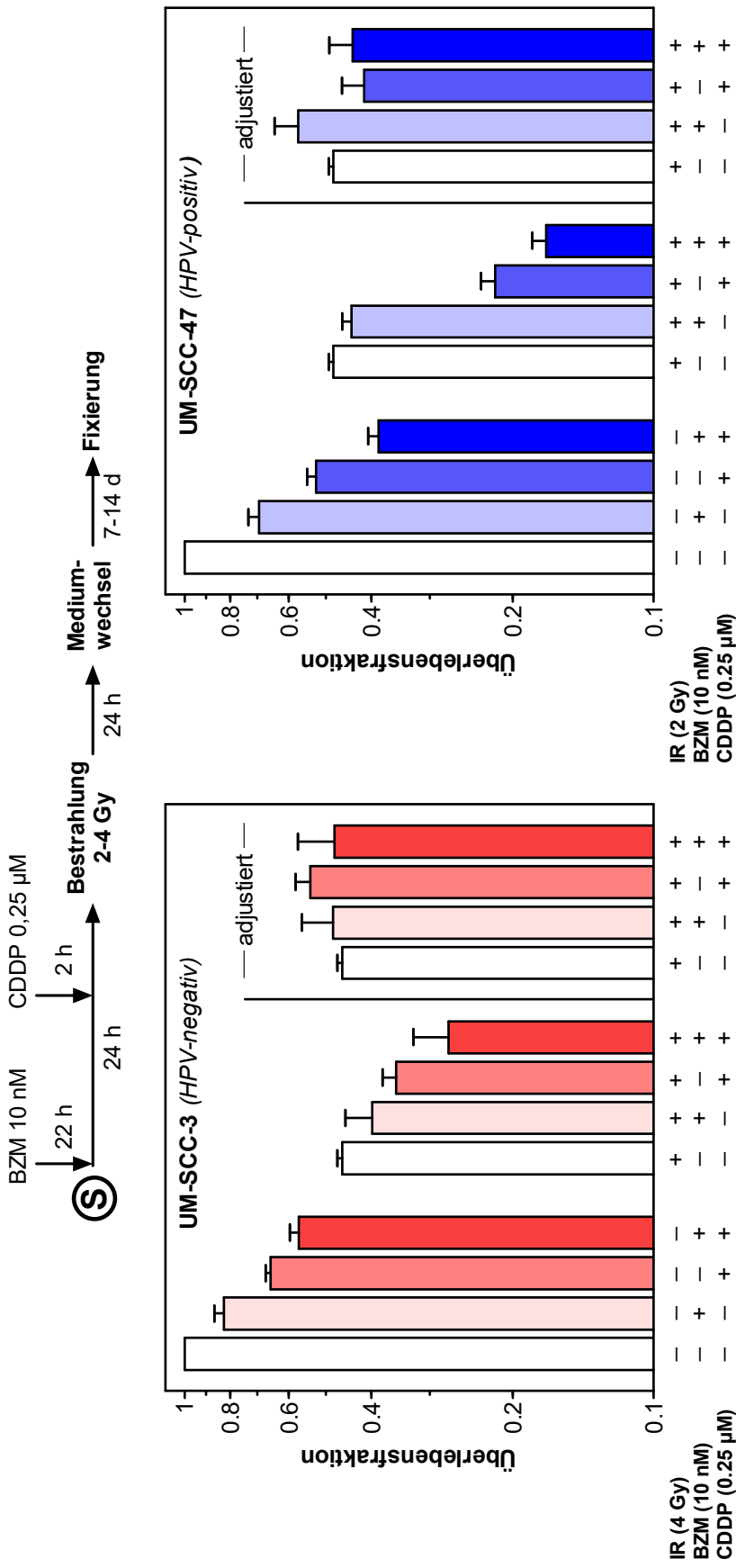
**Abb. 13: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Bortezomib und Cisplatin.**

Halblogarithmische Darstellung der Überlebensfraktion von UM-SCC-3 (*HPV-negativ*) und UM-SCC-47 (*HPV-positiv*) in Abhängigkeit von der verwendeten Cisplatin-Konzentration. Die Behandlung mit Bortezomib (*BZM*) erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat (*S*), die Behandlung mit Cisplatin (*CDDP*) nach 22-stündiger Inkubation. *Gestrichelte Linien, offene Symbole*: Lösungsmittelkontrolle, *durchgezogene Linien, geschlossene Symbole*: Bortezomib-Behandlung.  $n = 3$ .

Die HPV-positive Zelllinie UM-SCC-47 zeigte sich insgesamt sensibler gegenüber der Cisplatin-Behandlung als die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-3. Durch Vorbehandlung mit Bortezomib konnte jedoch in beiden Zelllinien keine Chemosensibilisierung gegenüber Cisplatin beobachtet werden.

#### 3.5.4 Behandlung mit Bortezomib, Cisplatin und Bestrahlung

Da in den vorhergehenden Versuchen keine Strahlen- und Chemosensibilisierung durch Bortezomib auszumachen war, wurde im Folgenden untersucht, ob Bortezomib HNSCC-Zelllinien gegenüber einer kombinierten Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung sensitivieren kann. Dazu wurden die Behandlungsschemata der Einzelversuche für die Zelllinien UM-SCC-3 (HPV-negativ) und UM-SCC-47 (HPV-positiv) integriert. Basierend auf den Vorergebnissen erfolgte zur Gewährleistung isotoxischer Dosen eine Anpassung der Strahlendosis. Aufgrund der höheren Strahlensensibilität der HPV-positiven Zelllinie wurde diese nur mit 2 Gy bestrahlt, die HPV-negative Zelllinie hingegen mit 4 Gy. Bortezomib- und Cisplatin-Konzentrationen wurden aus den Vorversuchen und für beide Zelllinien identisch beibehalten. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 14 dargestellt.



**Abb. 14: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Bortezomib, Cisplatin und Bestrahlung.**  
 Halblogarithmische Darstellung der Überlebensfraktion von UM-SCC-3 (HPV-negativ, links) und UM-SCC-47 (HPV-positiv, rechts) nach angegebener Behandlung. Die Behandlung mit Bortezomib (BZM) erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat (S), die Behandlung mit Cisplatin (CDDP) nach 22-stündiger Inkubation. Eine Bestrahlung (IR) schloss sich nach weiteren 2 h an. n = 3.



---

Bortezomib, Cisplatin sowie die Kombination beider Substanzen reduzierten das klonogene Überleben in beiden Zelllinien, wie bereits in den vorherigen Versuchen gezeigt. Durch eine zusätzliche Bestrahlung wurde die Überlebensfraktion aller Versuchsmodalitäten weiter reduziert. Nach *Adjustierung* der Werte auf die individuelle unbestrahlte Kontrolle (Abb. 14, jeweils die Balken rechts der Trennlinie) demaskierte sich jedoch eine ausbleibende Sensibilisierung der Behandlungsmodalitäten durch Bortezomib. Es lag somit nur eine additive Wirkung aller drei Behandlungen vor.

## 4 DISKUSSION

Patienten mit HPV-positiven HNSCC zeigen insgesamt ein besseres Therapieansprechen mit einer günstigeren Gesamtprognose als Patienten mit HPV-negativen HNSCC (Ang et al. 2010). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den defizienten p53-/p21-Signalweg in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien zu reaktivieren und eine konsekutiv mögliche Sensibilisierung gegenüber Standardtherapeutika zu untersuchen.

### 4.1 Auswahl der Zelllinien

HNSCC stellen nach heutiger Kenntnis eine heterogene Gruppe von Tumoren dar (Cleary et al. 2016), die sich hinsichtlich des therapeutischen Ansprechens auf Bestrahlung (Rieckmann et al. 2013; Arenz et al. 2014) und Cisplatin (Ziemann et al. 2015; Busch et al. 2016) – auch innerhalb der Subgruppen der HPV-negativen bzw. HPV-positiven HNSCC – deutlich unterscheiden. Daher war es notwendig, zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen eine hinreichende Anzahl von Zelllinien heranzuziehen, die diese Heterogenität in hinreichendem Maße abdecken.

Wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, exprimierten alle in dieser Arbeit untersuchten HPV-positiven HNSCC-Zelllinien p53 im Wildtyp, während für die verwendeten HPV-negativen Zelllinien eine Expression von ausschließlich mutiertem p53 vorlag. Die gewählte Stichprobe berücksichtigt somit die in der Einleitung beschriebenen, grundlegenden molekularbiologischen Unterschiede zwischen den beiden HNSCC-Entitäten und bildet somit repräsentativ die *in vivo* bekannten Eigenschaften für die *in vitro* durchgeführten Untersuchungen ab.

### 4.2 Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung von Zellen mit schädigenden Noxen stellt eine technisch einfache Methode dar und wurde hier zur Konzentrationsfindung genutzt.

Die Inkubation mit Bortezomib in der untersuchten großen Konzentrationsspanne führte zu einer Verminderung der Zellviabilität sowohl in der HPV-negativen, als auch der HPV-positiven Zelllinie. Da niedrige Bortezomib-Konzentrationen in der HPV-positiven Zelllinie reproduzierbar zu einer Erhöhung der Zellviabilität im Vergleich zur Lösungs-

mittelkontrolle führten – was in der HPV-negativen Zelllinie nicht der Fall war – zeigte sich schon in diesem orientierenden Versuch, dass die biologische Wirkung von Bortezomib in den HNSCC-Subgruppen verschieden sein könnte.

Die Verminderung der Zellviabilität durch Bortezomib wurde in verschiedenen HNSCC-Zelllinien bereits beschrieben (Chen et al. 2008; Lin et al. 2012; Li et al. 2013; Tamatani et al. 2013; Bullenkamp et al. 2014), vorwiegend mittels MTT- (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) Assay. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete WST-1-Assay ist eine Weiterentwicklung des MTT-Assays und zeigt vergleichbare Ergebnisse (Kim et al. 2005). Als unspezifischer Globaltest war er hier für die Konzentrationsfindung von Bortezomib geeignet; weiterführende Aussagen erforderten jedoch die Durchführung differenzierter Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind im Folgenden diskutiert. Da bei niedrigen Konzentrationen fluktuierende Ergebnisse und bei hohen Konzentrationen kaum mehr viable Zellen nachweisbar waren, wurde für die weiteren Versuche – auch im Hinblick auf geplante kombinierte Therapien – der mittlere Bortezomib-Konzentrationsbereich von 10–50 nM gewählt.

## 4.3 Mechanistische Untersuchungen zur funktionellen p53-Reaktivierung

### 4.3.1 Bortezomib-induzierte Reaktivierung von p53

Die Behandlung mit Bortezomib führte nur in HPV-positiven Zelllinien zu einem konzentrationsabhängigen und signifikanten Anstieg der Expression von p53 sowie des p53-Effektorproteins p21. In Zusammenschau wurde somit in den gezeigten HPV-positiven HNSCC-Zelllinien proteinbiochemisch eine Reaktivierung des p53-Signalwegs bzw. eine *funktionelle Reaktivierung* von p53 durch Bortezomib nachgewiesen. Ein solcher Zusammenhang konnte, in einer deutlich kleineren Auswahl an Zelllinien, durch Li et al. bereits gezeigt werden (Li et al. 2013).

Die Veränderung der Expression von p53 war in der Gruppe der HPV-positiven Zelllinien individuell verschieden, im Mittel war hier jedoch konzentrationsabhängig ein Anstieg nachzuweisen. Der Anstieg von p21 jedoch war über alle Zelllinien aus dieser Gruppe stark ausgeprägt und konstant. Aufgrund des zentralen Stellenwerts von p21 als Effektorprotein von p53 sprechen die vorliegenden Daten dafür, dass der p21-Anstieg nach Behandlung mit Bortezomib im Vergleich zur p53-Expression nicht nur

den profizienten Signalweg anzeigt, sondern auch einen besseren Indikator für die funktionelle Reaktivierung darstellt.

In der Gruppe der HPV-negativen Zelllinien zeigten sich marginale Veränderungen des Expressionsprofils beider Proteine nach Behandlung mit Bortezomib. Dies lässt sich damit erklären, dass trotz Vorliegen des mutierten *TP53*-Gens zu einem geringen Anteil funktionelles p53 exprimiert werden kann, das sich entsprechend funktionell reaktivieren lässt. Beispielsweise wurde für die Zelllinie UM-SCC-3 eine geringe Expression von p21 beschrieben (Mandic et al. 2005). Während in den von Li et al. untersuchten HPV-negativen Zelllinien kein p21-Anstieg nach Behandlung mit Bortezomib nachweisbar war (Li et al. 2013), zeigten sich in anderen Untersuchungen an vergleichbaren Zelllinien, ähnlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Alterationen der p21-Expression (Bullenkamp et al. 2014).

Die mittels Western-Blot-Verfahren nachgewiesenen Veränderungen der p21-Expression lagen in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind daher sehr empfindlich gegenüber Schwankungen, welche im Einzelfall auch durch die verwendete Methodik (Reagenzien, Transfermembran, Detektionssystem u. a.) und Datenauswertung maßgeblich beeinflusst werden (Taylor et al. 2014). Es ist daher davon auszugehen, dass die Differenzen zwischen den hier vorliegenden und den in der Literatur gezeigten Ergebnissen auch durch diese methodischen Unterschiede mitbegründet sind.

Die Kombination aus Bortezomib-Behandlung und anschließender Bestrahlung verstärkte die funktionelle Reaktivierung von p53 in den HPV-positiven Zelllinien weiter. Beide Therapien wirkten synergistisch hinsichtlich einer Erhöhung der Proteinexpression von p53 und p21.

Die Aktivierung von p53 als intrinsische Reaktion auf Bestrahlung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien ist bereits bekannt und stellt somit – vorrangig mittels p53-induzierter Apoptose – eine wichtige Determinante für die höhere Strahlensensibilität HPV-positiver HNSCC-Zelllinien dar (Kimple et al. 2013). Insofern ergänzten sich in der Kombination die bestrahlungsinduzierte p53-Aktivierung und die Bortezomib-induzierte funktionelle p53-Reaktivierung, was zu signifikantem Anstieg der Expression von p53 und p21 führte. In der Gruppe der HPV-negativen Zelllinien hingegen zeigten sich diese Effekte aufgrund des defizienten Signalwegs nicht, es kam sogar zu einer signifikanten *Abnahme* der p21-Expression nach der Doppelbehandlung.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass auf der Ebene der Proteinexpression in den untersuchten HPV-positiven HNSCC-Zelllinien grundsätzlich ein profizienter p53-/p21-Signalweg vorliegt. Die Expression beider Proteine lässt sich durch Behandlung mit Bortezomib konzentrationsabhängig im Sinne einer funktionellen Reaktivierung des Signalwegs erhöhen, was in Kombination mit dem bekannten p53-Induktor *Bestrahlung* weiter verstärkt werden kann. In HPV-negativen HNSCC-Zelllinien hingegen ist der gesamte Signalweg defizient, so dass es durch keine der beiden Behandlungen zu einer bedeutenden Aktivierung des Signalwegs kommen kann.

#### 4.3.2 Einfluss von Bortezomib und Bestrahlung auf den Zellzyklus

Die funktionelle Reaktivierung des p53-/p21-Signalwegs durch Bortezomib und synergistisch mit Bestrahlung konnte in den bereits diskutierten Ergebnissen für HPV-positive HNSCC-Zelllinien *proteinbiochemisch* nachgewiesen werden. Wie in Abschnitt 1.2.2 erläutert, ist der Arrest des Zellzyklus am G<sub>1</sub>/S-Übergang ein zentraler p53-vermittelter und direkt p21-abhängiger Mechanismus, der der Reparatur Noxen-induzierter DNA-Schäden dient. Zur Verifizierung Bortezomib-induzierter Zellzyklusalterationen erfolgte daher die Zellzyklusanalyse.

Bestrahlung führt in HNSCC-Zellen üblicherweise zu einem G<sub>2</sub>/M-Arrest, insbesondere und prolongiert in HPV-positiven Zelllinien (Kimple et al. 2013; Rieckmann et al. 2013; Arenz et al. 2014; Ziemann et al. 2015). Dieser Arrest ließ sich in den vorliegenden durchgeführten Analysen bei allen Zelllinien gut reproduzieren, was als Qualitätsmerkmal für die Versuchsdurchführung allgemein angesehen werden kann. Nach kombinierter Behandlung aus Bortezomib und Bestrahlung zeigte sich ein transienter G<sub>1</sub>-Arrest in der Gruppe der HPV-positiven Zelllinien, während das Zellzyklusprofil der bestrahlten HPV-negativen Zelllinien durch Vorbehandlung mit Bortezomib nur geringfügig modifiziert wurde.

Die Beeinflussung der Zellzyklusprogression in HNSCC-Zelllinien durch Bortezomib im Allgemeinen wurde bereits zuvor beschrieben (Chen et al. 2008; Bullenkamp et al. 2014). Li et al. fanden, im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen, inkonstante Zellzyklusalterationen in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien (Li et al. 2013). Im Vergleich zum hier vorliegenden Versuchsaufbau wurden die Zellen von Li et al. jedoch mit einer geringeren Bortezomib-Konzentration von 5 nM für insgesamt 48 h inkubiert und die Zellzyklusprogression direkt im Anschluss gemessen. Dieser abweichende Versuchs-

aufbau bedingt, dass mögliche transiente Zellzyklusarreste innerhalb von 48 h nach Aussaat nicht erfasst werden konnten.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten sprechen somit in Verbindung mit den oben diskutierten proteinbiochemischen Untersuchungen dafür, dass der durch Bortezomib funktionell reaktivierte und durch Bestrahlung induzierte p53-Signalweg über das Schlüsselprotein p21 zu einem transienten G<sub>1</sub>-Arrest in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien führt. Die in der Summe unwesentlichen, im Einzelfall aber nachweisbaren Zellzyklusalterationen durch Bortezomib auch in der Gruppe der HPV-negativen Zelllinien lassen sich somit im Rahmen des Modells auch durch eine vorhandene, marginale Expression von intaktem, reaktivierbaren p53 erklären, wie dies schon proteinbiochemisch gezeigt werden konnte.

#### 4.3.3 Einfluss von Bortezomib, Cisplatin und Bestrahlung auf die Apoptose

Neben der Beeinflussung der Zellzyklusprogression ist die Induktion von Apoptose ein zentraler p53-vermittelter Mechanismus der zellulären Reaktion auf DNA-schädigende Noxen wie Cisplatin und Bestrahlung (Vogelstein et al. 2000). Da in vorherigen Untersuchungen die p53-abhängige Apoptose als wichtiger Mechanismus für die höhere Strahlensensibilität HPV-positiver HNSCC identifiziert werden konnte (Kimple et al. 2013), wurde in der vorliegenden Arbeit die Kapazität der Apoptoseinduktion von HNSCC-Zelllinien nach funktioneller p53-Reaktivierung durch Bortezomib in zwei ausgewählten Zelllinien untersucht.

Hierbei zeigte sich in der HPV-negativen Zelllinie eine eingeschränkte Kapazität zur Apoptose, während im Vergleich dazu in der HPV-positiven Zelllinie der Anteil apoptotischer Zellen nach Bestrahlung oder Cisplatin-Behandlung deutlich höher war und jeweils durch Kombination mit Bortezomib weiter verstärkt werden konnte. Die von Kimple et al. beschriebene p53-vermittelte Induktion von Apoptose in HPV-positiven HNSCC nach Bestrahlung (Kimple et al. 2013), sowie die im Gegensatz zu HPV-negativen HNSCC synergistische Induktion von Apoptose durch Cisplatin und Bestrahlung (Ziemann et al. 2015) konnten mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Analog zu den proteinbiochemisch nachweisbaren Veränderungen ergänzen sich in dieser HNSCC-Subgruppe die bestrahlungsinduzierte p53-Aktivierung und die Bortezomib-induzierte p53-Reaktivierung auch bezüglich Apoptoseinduktion synergistisch, so dass es in der Kombination zu einem vermehrten Anteil apoptotischer Zellen

kommt. Daten von Li et al. zeigten außerdem, dass in der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten HPV-positiven Zelllinie UM-SCC-47 die Disinhibition von p53 via HPV-E6/E7-Knockdown mittels *small interfering RNA* (siRNA) zu einem erhöhten Anteil apoptotischer Zellen führte (Li et al. 2013), was für den großen Stellenwert p53-abhängiger Apoptose in dieser Zelllinie spricht. Darüber hinaus muss jedoch beachtet werden, dass die Bortezomib-induzierte Apoptose auch über andere, p53-unabhängige Mechanismen, wie Inhibition von NF- $\kappa$ B, beschrieben ist (Chen et al. 2011; Pellom et al. 2012). Gemeinsam mit den gezeigten Ergebnissen zur veränderten Proteinexpression und Zellzyklusprogression HPV-positiver HNSCC-Zelllinien nach Bortezomib-Behandlung ist es in der Zusammenschau allerdings hier sehr wahrscheinlich, dass die Bortezomib-induzierte Apoptose primär p53-abhängig ist.

#### 4.4 Untersuchungen zur Effektivität der funktionellen p53-Reaktivierung

Die bisher beschriebenen Untersuchungen ergaben substantielle Unterschiede in der zellulären Reaktion auf Bortezomib in den zwei HNSCC-Subgruppen. Die damit erfassten zellulären Stoffwechselaktivitäten und Funktionsvorgänge umfassten allerdings nur Zeiträume von wenigen Stunden bis Tagen. Unter klinisch-onkologischen Gesichtspunkten ist jedoch die bleibende lokale Tumorkontrolle und somit auch *in vitro* die Quantifizierung des Zellüberlebens ein entscheidender Endpunkt, um die Effektivität eines Therapeutikums beurteilen zu können.

Der Koloniebildungstest nach Puck und Marcus (Puck et al. 1956) ist eine weit verbreitete Methode zur Beurteilung des klonogenen Zellüberlebens nach Exposition potentiell zellschädigender Noxen und stellt die Standardmethode zur Beurteilung einer Strahlensensibilisierung dar (Franken et al. 2006). Das zugrundeliegende Konzept des *klonogenen Überlebens in vitro* erfasst dabei neben der Apoptose auch andere Wege des Zelltods und korreliert somit besser mit dem Therapieansprechen *in vivo*, als die zielgerichtete Untersuchung eines spezifischen Signalwegs, wie beispielsweise die Apoptose (Brown et al. 2005).

#### 4.4.1 Koloniebildungstests mit Bortezomib

Bortezomib führte in allen untersuchten Zelllinien zu einer relevanten, konzentrations-abhängigen Reduktion der Überlebensfraktion. Die Ergebnisse waren dabei vom HPV-Status der untersuchten Zelllinien unabhängig und zeigten starke, zelllinienspezifische Unterschiede.

Soweit bekannt, liegen keine Daten zum klonogenen Überleben vor, die den direkten Vergleich von HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien nach Bortezomib-Behandlung untersuchten. Die vorliegenden Ergebnisse machen aber deutlich, dass das zelluläre Langzeitüberleben nach Behandlung mit Bortezomib nicht ausschließlich durch p53-vermittelte Mechanismen erklärbar ist, da auch in den p53-defizienten, HPV-negativen Zelllinien das klonogene Überleben deutlich herabgesetzt war. Da Bortezomib nicht als selektiver p53-Reaktivator wirkt, sondern – wie einleitend erläutert – durch Inhibition des Proteasoms den zellulären Stoffwechsel in verschiedener Weise beeinflusst, ist von einer Beeinträchtigung des klonogenen Überlebens durch p53- und HPV-unabhängige Mechanismen auszugehen. Für solide Tumoren sind verschiedene Signal- und Stoffwechselwege beschrieben, deren Funktion durch Bortezomib modifiziert wird, wie p53-unabhängige Apoptose (Lioni et al. 2008; Bullenkamp et al. 2014), Autophagie (Li et al. 2012; Chang et al. 2016), Inhibition von NF- $\kappa$ B (Chen et al. 2008) oder die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (Hong et al. 2012). Dies unterstreicht ein weiteres Mal, dass HNSCC eine biologisch heterogene Gruppe von Tumoren darstellen und die Sensitivität gegenüber Bortezomib auch durch von p53 unabhängige Faktoren determiniert wird.

#### 4.4.2 Koloniebildungstests mit Bestrahlung und Cisplatin

Die HPV-positiven Zelllinien wiesen eine signifikant höhere intrinsische Strahlensensibilität als die HPV-negativen Zelllinien auf. Dies bestätigt Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, wobei als zugrunde liegende Mechanismen insbesondere die strahleninduzierte p53-Aktivierung (Kimple et al. 2013), aber auch defiziente DNA-Doppelstrangbruchreparaturmechanismen in HPV-positiven HNSCC angesehen werden (Rieckmann et al. 2013; Arenz et al. 2014; Park et al. 2014; Nickson et al. 2017; Ziemann et al. 2017). Strahleninduzierte DNA-Schäden können demnach nur unzureichend repariert werden, was durch deren Akkumulation zu einem reduzierten klonogenen Überleben führt.



Ebenfalls war die Sensibilität gegenüber Cisplatin in der HPV-positiven Zelllinie höher als in der HPV-negativen HNSCC-Zelllinie, was bekannte Daten bestätigt (Ziemann et al. 2015). In einer eine größere Anzahl Zelllinien umfassenden Analyse konnte zuletzt gezeigt werden, dass sich die intrinsische Sensibilität gegenüber Cisplatin zwischen den beiden HNSCC-Subgruppen nicht unterscheidet – jedoch mit deutlichen individuellen Unterschieden zwischen den einzelnen Zelllinien (Busch et al. 2016). Die auch in der vorliegenden Arbeit untersuchte HPV-positive Zelllinie UM-SCC-47 zeigte sich dort als besonders Cisplatin-resistent, wobei das Therapieschema mit einer siebentägigen Inkubationszeit deutlich abwich und zugleich eine Abnahme der biologischen Aktivität von Cisplatin bei Langzeitinkubation gezeigt wurde (Busch et al. 2016).

Die insgesamt gute Korrelation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit bekannten Vorergebnissen zur intrinsischen Therapiesensibilität von HNSCC in der Zellkultur kann somit auch als Qualitätsindikator für die Durchführung der Koloniebildungstests angesehen werden.

#### 4.4.3 Untersuchungen zur Strahlen-/ Chemosensibilisierung durch Bortezomib

Eine Behandlung mit Bortezomib führte weder in den HPV-negativen, noch den HPV-positiven Zelllinien zu einer Strahlen- oder Chemosensibilisierung. Zwar ergänzten sich die einzelnen Therapeutika in ihrer Wirkung, eine Sensibilisierung im Sinne eines überadditiven Effekts blieb jedoch aus.

Entsprechende vergleichende Untersuchungen zur Therapiesensibilisierung hinsichtlich Cisplatin und Bestrahlung durch Bortezomib in HNSCC liegen bisher nicht vor.

Jedoch konnte eine Bortezomib-induzierte Strahlensensibilisierung *in vitro* in anderen Tumorentitäten, wie Prostatakarzinom (Cao et al. 2008), kolorektalem Karzinom (Russo et al. 2001), Ösophaguskarzinom (Lioni et al. 2008; Wang et al. 2016), Zervixkarzinom (Huang et al. 2012) oder dem Multiplen Myelom (Goel et al. 2005) gezeigt werden. Insgesamt war die Wirkung dabei mechanistisch stark mit p53-induzierter Apoptose verknüpft. In Fällen einer Bortezomib-induzierten Chemosensibilisierung standen Mechanismen wie p53-unabhängige Herabregulation anti-apoptotischer Proteine (Cao et al. 2008) oder Induktion von Apoptose (Kim et al. 2010; Yamashita et al. 2014) im Vordergrund. Diese Studien sind jedoch kritisch zu beurteilen, da die meisten von ihnen nur mit einer geringen Anzahl von Zelllinien und teilweise erheblich abweichendem Versuchsaufbau durchgeführt wurden, was die Möglichkeiten eines objekti-

ven Vergleichs begrenzt. An einer am Tiermodell durchgeführten Studie mit Glioblastom-Zellen erkannten Labussiere et al., dass die Fähigkeit von Bortezomib, eine Strahlensensibilisierung herbeizuführen, vom Therapieschema und dabei insbesondere der Art der Fraktionierung der Bestrahlung abhängig ist (Labussiere et al. 2011). Dies unterstreicht die Schwierigkeit des Vergleichs verschiedener Studien untereinander aufgrund vieler einflussnehmender Faktoren.

Wie bereits oben angeführt, wird der Endpunkt *klonogenes Überleben* von einer Vielzahl zellulärer Mechanismen beeinflusst und durch verschiedene Zelltodmechanismen und wachstumsverzögernde Mechanismen determiniert. Eine zu einem Stichpunkt gemessene Veränderung im Zellstoffwechsel, wie die Expression eines Proteins, lässt somit nicht direkt auf einen Einfluss auf das klonogene Überleben schließen. Die bereits diskutierten Ergebnisse zeigten, dass Bortezomib in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien zu einer funktionellen Reaktivierung des p53-Signalwegs führt. Die Funktionalität dieses Signalwegs ist eng mit der antineoplastischen Wirkung von Bestrahlung in dieser Tumorentität verknüpft (Kimple et al. 2013). Die Tatsache, dass Bortezomib in alleiniger Anwendung auch in den p53-defizienten HPV-negativen Zelllinien zu einer Verringerung des klonogenen Überlebens führte, unterstreicht die bereits in der Einleitung beschriebene, durch den Wirkmechanismus von Bortezomib bedingte, unselektive Wirkung auf den zellulären Stoffwechsel. Demnach müssen in HNSCC auch andere, in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchte Signalwege durch Bortezomib beeinflusst werden, um die gezeigten Effekte auch in HPV-negativen HNSCC-Zelllinien zu erklären. Auf dieser Grundlage – der Interaktion mit anderen Signalwegen – beruht vermutlich auch die vorliegend ausbleibende Therapiesensibilisierung durch Bortezomib. Die Aktivierung gegensätzlicher Signalwege scheint möglich. Mit den vorliegenden Daten ist keine abschließende Beurteilung dieser Thematik möglich. Zur Differenzierung p53-abhängiger Effekte auf die Therapiesensibilität scheint die Untersuchung des klonogenen Überlebens unter Disinhibition von p53 mittels HPV-E6-/E7-siRNA, wie von Li et al. bereits ansatzweise etabliert (Li et al. 2013), sinnvoll.

## 4.5 Klinische Daten zu Bortezomib in der Behandlung von HNSCC

Mit den vorgelegten Daten zeigte sich bereits am Zellkulturmodell, dass zelluläre Veränderungen nicht automatisch einen Effekt auf die lokale Tumorkontrolle und somit das tumorspezifische Überleben implizieren. Für die Anwendung am Menschen sind daher zwingend klinische Studiendaten erforderlich.

Die klinische antineoplastische Wirksamkeit von Bortezomib ist für das Multiple Myelom und das Mantelzellymphom in Studien sehr gut nachgewiesen (Chen et al. 2011). In mehreren klinischen Phase I- bis Phase II-Studien konnte allerdings kaum eine signifikante Wirksamkeit von Bortezomib in der Behandlung verschiedener solider Tumoren festgestellt werden (Buac et al. 2013).

Bezüglich HNSCC liegen nur wenige klinische Daten vor. In einer bereits 2005 publizierten Phase I-Studie wurde die kombinierte Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung an neun Patienten mit einem HNSCC-Rezidiv untersucht (Van Waes et al. 2005). Hier zeigte sich insgesamt eine moderate Verträglichkeit der Kombinationstherapie sowie laborchemisch eine nachweisbare Proteasom-Inhibition. In Tumorbiopsien von zwei der Patienten zeigte sich eine NF- $\kappa$ B-Inhibition sowie gesteigerte Apoptose und Zellzyklusveränderungen. Das Therapieansprechen war sehr unterschiedlich und reichte vom Progress bis zur partiellen Tumorreduktion in einem Fall. Aufgrund der sehr geringen Probandenzahl ist über das therapeutische Ansprechen daher keine verlässliche Aussage zu treffen. Über den HPV-Status der Tumoren wird in der Studie keine Aussage gemacht.

In einer weiteren Phase I-Studie untersuchten Kubicek et al. die Verträglichkeit von Bortezomib und einer Cisplatin-basierten Radiochemotherapie an 27 HNSCC-Patienten (Kubicek et al. 2012). Dabei wurde insgesamt eine gute Verträglichkeit der Substanz in Kombination mit den HNSCC-Standardtherapeutika, auch in vorbestrahlten Patienten, festgestellt – was somit aus klinischen Gesichtspunkten prinzipiell eine Kombination der Substanzen möglich erscheinen lässt. Diese klinischen Ergebnisse legten somit eine Grundlage für weitere präklinische Untersuchungen dieser kombinierten Anwendung der Therapeutika, wie es auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Eine Bewertung des antineoplastischen Effekts ist aufgrund des Studiendesigns nicht möglich. Auch in dieser Studie wird keine Aussage über den HPV-Status der Tumoren gemacht.

Die einzige bekannte Phase II-Studie mit Bortezomib in HNSCC untersuchte die Effektivität in Kombination mit Irinotecan versus eine Bortezomib-Monotherapie in 61 Patienten (Gilbert et al. 2013). Im Gegensatz zu den vorgenannten Studien wurde hier keine Bestrahlung angewandt. Propagierter Wirkmechanismus war die funktionelle Inhibition von NF- $\kappa$ B durch Bortezomib, was mit parallel durchgeführten laborchemischen Analysen zur Konzentrationsbestimmung beteiligter Zytokine bestätigt werden sollte. Insgesamt zeigte sich kein Unterschied im Gesamtüberleben zwischen beiden Therapiearmen, zudem zeigte sich keine Korrelation mit den gemessenen Zytokin-Konzentrationen trotz offenkundlicher, behandlungsinduzierter Alterationen. Somit zeigte sich auch in dieser Studie, ähnlich zu den in dieser Arbeit vorgelegten präklinischen Daten, eine Diskrepanz zwischen messbaren Stoffwechseleränderungen und tatsächlichem Therapieansprechen. Leider lässt die Studie keine abschließende Beurteilung der Wirksamkeit von Bortezomib zu; Daten zum HPV-Status der Tumoren sind ebenfalls nicht bekannt.

In einer von Argiris et al. durchgeführten Phase I-Studie sollte die Effektivität von Bortezomib in Kombination mit dem anti-EGFR-Antikörper Cetuximab und Bestrahlung in sieben Patienten mit HNSCC untersucht werden (Argiris et al. 2011). In vier der sieben Patienten lag ein positiver HPV-Nachweis im Tumorgewebe vor. Die Studie musste abgebrochen werden, da fünf Patienten einen Tumorprogress erlitten. Diese unerwartete Reaktion wird auf eine mögliche Bortezomib-induzierte Stabilisierung von EGFR, was die Wirkung von Cetuximab funktionell antagonisiert, zurückgeführt. Die Studie ist ein Hinweis darauf, dass die Proteasom-Inhibition durch Bortezomib – also ein nicht selektiver Mechanismus – möglicherweise nicht optimal ist, um die beschriebene funktionelle Reaktivierung von p53 zu erzielen.

Bei allen hier angeführten Studien blieb der HPV-Status für die Behandlung unberücksichtigt. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Konzept beruht aber grundlegend auf dieser Stratifizierung, da spezifisch in HPV-positiven HNSCC die Wirkung von Bortezomib aufgrund seiner Wirkung auf den p53-Signalweg untersucht wurde. Die vorhandenen *in-vivo*-Daten bezüglich Bortezomib in HNSCC lassen somit keine Aussagen zur Hypothese der vorliegenden Arbeit zu. Die klinischen Daten bestätigen jedoch die relativ gute Verträglichkeit des Medikaments auch bei morbidem Patienten, geben aber auch Hinweise auf mit verschiedenen Signalwegen wechselwirkende Effekte.

## 4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit den dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der Proteasom-Inhibitor Bortezomib *in vitro* in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien – im Gegensatz zu HPV-negativen Zelllinien – zu einer funktionellen Reaktivierung des p53-Signalwegs mit charakteristischer Aktivierung nachgeschalteter Signalwege führt. Die Untersuchungen zum klonogenen Überleben zeigten allerdings differente Ergebnisse, da Bortezomib auch in den HPV-negativen Zelllinien das klonogene Überleben reduzierte, jedoch in Kombination mit Cisplatin und Bestrahlung in beiden Entitäten zwar zu additiven Effekten, nicht jedoch zu einer Radio- oder Chemosensibilisierung führte.

Grundüberlegung aus dem klinischen Kontext heraus war, durch Kombination mit dem insgesamt gut verträglichen Bortezomib eine Reduktion der Konzentration von Cisplatin und/oder eine Reduktion der Bestrahlungsdosis zu etablieren, um bei gleichbleibendem Therapieergebnis eine geringere Toxizität für die Anwendung am Patienten zu erreichen. Aufgrund der hier vorgelegten präklinischen Untersuchungen sowie bekannter klinischer Daten ist eine derartige Kombinationstherapie nicht erfolgversprechend.

Grundsätzlich sprechen die in dieser Arbeit vorgelegten Daten für eine durch Bortezomib verursachte Aktivierung des p53-Signalwegs in HPV-positiven HNSCC, nicht aber in HPV-negativen HNSCC. Zur Verifizierung, dass die nachgeschalteten Signalwege, insbesondere die p21-Expression, durch Bortezomib-induziertes p53 und nicht Bortezomib selbst aktiviert werden, ist eine vergleichende Untersuchung mittels p53-siRNA sinnvoll.

Die ausbleibende Therapiesensibilisierung bei der Untersuchung des klonogenen Überlebens weist auf die Bedeutung anderer, in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchter Signalwege hin. Möglich ist hier, dass andere, möglicherweise die p53-Reaktivierung antagonisierende zelluläre Effekte durch den unspezifischen Prozess der Proteasom-Inhibition aktiviert werden. Hinweise dazu bietet auch die abgebrochene Studie von Argiris et al., wo die vermutlich EGFR-stabilisierende Wirkung von Bortezomib mit der Wirkung des anti-EGFR-Antikörpers Cetuximab interagierte, so dass es zu vermehrtem Tumorprogress *in vivo* kam (Argiris et al. 2011).

Um die Therapieoptionen den bekannten Daten zu Epidemiologie und Prognose anzupassen, ist die Therapiestratifikation nach HPV-Status ein erstrebenswerter Ansatz. In verschiedenen präklinischen Studien mehren sich die Hinweise darauf, dass in HPV-positiven HNSCC eine defiziente DNA-Doppelstrangbruchreparatur vorliegt

(Rieckmann et al. 2013; Nickson et al. 2017; Ziemann et al. 2017). Dahingehende Versuche einer gezielten Störung der effektiven DNA-Reparatur in HPV-negativen HNSCC mithilfe von Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1- (PARP-) Inhibitoren (Nickson et al. 2017) und CDK-Inhibitoren (Ziemann et al. 2017) könnten zukünftig einen Ansatz darstellen, die bisher schlechtere Prognose von Patienten mit HPV-negativen HNSCC zu verbessern.

Zusammenfassend konnte mit der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass die funktionelle p53-Reaktivierung durch Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien *nicht* zu einer Sensibilisierung hinsichtlich der HNSCC-Standardtherapie, einer Cisplatin-basierten Radiochemotherapie, führt. Es ist daher davon auszugehen, dass die p53-Reaktivierung *nicht* als vordergründiger Mechanismus für die höhere Strahlen- und Chemosensibilität HPV-positiver HNSCC angesehen werden kann. Diesbezüglich scheinen andere beschriebene Mechanismen wie die eingeschränkte DNA-Reparatur und Zellzyklus-Dysregulation von größerer Relevanz zu sein, was jedoch in weiteren präklinischen und später klinischen Untersuchungen noch verifiziert werden muss.

## 5 DEUTSCHSPRACHIGE ZUSAMMENFASSUNG

Beim Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC) hat sich die Einteilung in zwei ätiologisch verschiedene Subgruppen etabliert. Während Noxen-assoziierte HNSCC vorwiegend auf den Konsum von Tabak und Alkohol zurückzuführen sind, ist die Tumorprogression in mit Humanen Papillomaviren (HPV) assoziierten HNSCC durch das Wirken viraler Proteine vorangetrieben. Letztere zeigten in den vergangenen Jahren einen deutlichen Inzidenzanstieg, insbesondere im Bereich des Oropharynx. HPV-assoziierte HNSCC weisen eine deutlich bessere Prognose auf, was vor allem auf die höhere Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung zurückgeführt wird. Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind bisher noch nicht genau bekannt. Eine mögliche Ursache ist der in HPV-assoziierten HNSCC charakteristisch durch das Wirken viraler Proteine inhibierte Signalweg des Tumorsuppressorproteins p53, welches – im Gegensatz zu Noxen-assoziierten HNSCC – hier im Wildtyp vorliegt.

Ziel war es, durch Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib *in vitro* eine Reaktivierung des p53-Signalwegs sowie dessen Auswirkungen auf die Therapiesensibilität von vier HPV-positiven und drei HPV-negativen HNSCC-Zelllinien zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellviabilität, Proteinexpression, Zellzyklusprogression, Induktion von Apoptose sowie das klonogene Überleben nach Behandlung mit Bortezomib, Cisplatin und Bestrahlung analysiert.

Bortezomib führte, entsprechend dem konstatierten Modell, nur in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien zu einer funktionellen Reaktivierung von p53 mit Anstieg des Effektorproteins p21, was durch Kombination mit Bestrahlung verstärkt wurde. Konkordant zu diesen Ergebnissen zeigten sich zelluläre Veränderungen wie ein Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase sowie die Induktion von Apoptose, die mit der Wirkung des reaktivierten p53 vereinbar sind, nur in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien. Das klonogene Überleben wurde in allen Zelllinien durch Behandlung mit Bortezomib unabhängig vom HPV-Status reduziert. Eine Strahlensensibilisierung sowie Chemosensibilisierung gegenüber Cisplatin war in beiden Gruppen nicht nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass der p53-Metabolismus in HPV-positiven HNSCC charakteristisch gestört ist, jedoch potentiell reaktiviert werden kann. Die divergenten Ergebnisse beim klonogenen Überleben und die ausbleibende Therapiesensibilisierung machen jedoch deutlich, dass die erhöhte Therapiesensibilität HPV-positiver HNSCC vermutlich durch andere Mechanismen determiniert ist, als nur durch das Wirken von intaktem p53.

## 6 ENGLISCHSPRACHIGE ZUSAMMENFASSUNG

Squamous cell carcinomas of the head and neck region (HNSCC) represent a frequent tumor entity that can be divided into two aetiologically different subgroups. While noxa-induced HNSCC are caused by tobacco and alcohol abuse, the carcinogenesis of Human Papillomavirus (HPV) -associated HNSCC is driven by viral oncoproteins. Those HPV-positive HNSCC showed an impacting increase in incidence in the past years, especially in the oropharynx. Patients with HPV-positive HNSCC have a favorable prognosis caused by the tumor's higher sensitivity towards cytostatics and irradiation. To date, the underlying mechanisms are only partly understood. One possible reason could be the impaired signaling pathway of the tumor suppressor protein p53, that is – in contrast to noxa-associated HNSCC – expressed in wildtype form. In HPV-positive HNSCC, viral oncoproteins characteristically lead to a functional inhibition of the p53 pathway by accelerating its degradation by the proteasome.

The aim of this work was to achieve a functional restoration of the p53 pathway and further impact on radio- and chemosensitivity by treatment with the proteasome inhibitor bortezomib *in vitro*. Therefore, cell viability, protein expression, cell-cycle progression, induction of apoptosis as well as clonogenic survival were obtained in four HPV-positive and three HPV-negative HNSCC cell lines after treatment with bortezomib, cisplatin and irradiation.

As expected, a functional restoration of p53 with increase of downstream protein p21 expression by bortezomib was only achieved in HPV-positive cell strains and could be further enhanced by combining with irradiation. Concordant to that, a cell-cycle arrest in G<sub>1</sub> phase and enhanced induction of apoptosis that could be explained by presence of restored p53 were observed only in HPV-positive cell strains. The clonogenic survival was impaired in all cell strains independently from HPV status. Furthermore, no radio- and chemosensitization were observed, neither in HPV-positive, nor in HPV-negative cell strains.

The results show that the p53 signaling pathway is characteristically impaired in HPV-positive HNSCC cell lines and can thus be functionally restored by bortezomib treatment. The diverging results concerning clonogenic survival as well as the failed sensitization towards standard therapeutics by bortezomib give evidence that probably other mechanisms apart from intact p53 might be responsible for the higher radio- and chemosensitivity of HPV-positive HNSCC.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas T, Dutta A (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9 (6): pp. 400-14.

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363 (1): pp. 24-35.

Arenz A, Ziemann F, Mayer C, Wittig A, Dreffke K, Preising S, Wagner S, Klussmann 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. *Strahlenther Onkol* 190 (9): pp. 839-46.

Argiris A, Duffy AG, Kummar S, Simone NL, Arai Y, Kim SW, Rudy SF, Kannabiran VR, Yang X, Jang M, Chen Z, Suksta N, Cooley-Zgela T, Ramanand SG, Ahsan A, Nyati MK, Wright JJ, Van Waes C (2011). Early tumor progression associated with enhanced EGFR signaling with bortezomib, cetuximab, and radiotherapy for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 17 (17): pp. 5755-64.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008). Head and neck cancer. *Lancet* 371 (9625): pp. 1695-709.

Ballo H, Koldovsky P, Hoffmann T, Balz V, Hildebrandt B, Gerharz CD, 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. *Anticancer Res* 19 (5B): pp. 3827-36.

Bourhis J, Sire C, Graff P, Gregoire V, Maingon P, Calais G, Gery B, Martin L, Alfonsi M, Desprez P, Pignon T, Bardet E, Rives M, Geoffrois L, Daly-Schveitzer N, Sen S, Tuchsais C, Dupuis O, Guerif S, Lapeyre M, Favrel V, Hamoir M, Lusinchi A, Temam S, Pinna A, Tao YG, Blanchard P, Auperin A (2012). Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or

- without concomitant chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma (GORTEC 99-02): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 13 (2): pp. 145-53.
- Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2004). Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 96 (13): pp. 998-1006.
- Brown JM, Attardi LD (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 5 (3): pp. 231-7.
- Buac D, Shen M, Schmitt S, Kona FR, Deshmukh R, Zhang Z, Neslund-Dudas C, Mitra B, Dou QP (2013). From bortezomib to other inhibitors of the proteasome and beyond. *Curr Pharm Des* 19 (22): pp. 4025-38.
- Bullenkamp J, Raulf N, Ayaz B, Walczak H, Kulms D, Odell E, Thavaraj S, Tavassoli M (2014). Bortezomib sensitises TRAIL-resistant HPV-positive head and neck cancer cells to TRAIL through a caspase-dependent, E6-independent mechanism. *Cell Death Dis* 5: pp. 1-9.
- Busch CJ, Becker B, Kriegs M, Gatzemeier F, Kruger K, Mockelmann N, Fritz G, Petersen C, Knecht R, Rothkamm K, Rieckmann T (2016). Similar cisplatin sensitivity of HPV-positive and -negative HNSCC cell lines. *Oncotarget* 7 (24): pp. 35832-42.
- Busch CJ, Kroger MS, Jensen J, Kriegs M, Gatzemeier F, Petersen C, Munscher A, Rothkamm K, Rieckmann T (2017). G2-checkpoint targeting and radiosensitization of HPV/p16-positive HNSCC cells through the inhibition of Chk1 and Wee1. *Radiother Oncol* 122 (2): pp. 260-6.
- Cao W, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, Urbanek C, Rosser CJ (2008). Docetaxel and bortezomib downregulate Bcl-2 and sensitize PC-3-Bcl-2 expressing prostate cancer cells to irradiation. *World J Urol* 26 (5): pp. 509-16.

- Castro F, Dirks WG, Fahrnich S, Hotz-Wagenblatt A, Pawlita M, Schmitt M (2013). High-throughput SNP-based authentication of human cell lines. *Int J Cancer* 132 (2): pp. 308-14.
- Chang I, Wang CY (2016). Inhibition of HDAC6 Protein Enhances Bortezomib-induced Apoptosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) by Reducing Autophagy. *J Biol Chem* 291 (35): pp. 18199-209.
- Chao CC (2015). Mechanisms of p53 degradation. *Clin Chim Acta* 438: pp. 139-47.
- Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP (2011). Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 11 (3): pp. 239-53.
- Chen Z, Ricker JL, Malhotra PS, Nottingham L, Bagain L, Lee TL, Yeh NT, Van Waes C (2008). Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasome, nuclear factor-kappaB and activator protein-1 related mechanisms. *Mol Cancer Ther* 7 (7): pp. 1949-60.
- Chung CH, Guthrie VB, Masica DL, Tokheim C, Kang H, Richmon J, Agrawal N, Fakhry C, Quon H, Subramaniam RM, Zuo Z, Seiwert T, Chalmers ZR, Frampton GM, Ali SM, Yelensky R, Stephens PJ, Miller VA, Karchin R, Bishop JA (2015). Genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma determined by cancer gene-targeted sequencing. *Ann Oncol* 26 (6): pp. 1216-23.
- Cleary C, Leeman JE, Higginson DS, Katabi N, Sherman E, Morris L, McBride S, Lee N, Riaz N (2016). Biological Features of Human Papillomavirus-related Head and Neck Cancers Contributing to Improved Response. *Clin Oncol* 28 (7): pp. 467-74.
- Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Adv Exp Med Biol* 676: pp. 137-47.

- Dasari S, Tchounwou PB (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740: pp. 364-78.
- Dikomey E, Borgmann K, Köcher S, Kriegs M, Mansour W, Parplys AC, Rieckmann T, Rothkamm K (2016). Radiation DNA damage and use in cancer/therapeutics-translation of radiation modifiers. In: *DNA Repair in Cancer Therapy: Molecular Targets and Clinical Applications*, Second Edition. Kelley, M. R., Fishel, M. (Hrsg.), Elsevier, pp. 329-52.
- Eriksson D, Stigbrand T (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* 31 (4): pp. 363-72.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1 (5): pp. 2315-9.
- Fribley A, Zeng Q, Wang CY (2004). Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 24 (22): pp. 9695-704.
- Gilbert J, Lee JW, Argiris A, Haigentz M, Jr., Feldman LE, Jang M, Arun P, Van Waes C, Forastiere AA (2013). Phase II 2-arm trial of the proteasome inhibitor, PS-341 (bortezomib) in combination with irinotecan or PS-341 alone followed by the addition of irinotecan at time of progression in patients with locally recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (E1304): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Head Neck* 35 (7): pp. 942-8.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92 (9): pp. 709-20.
- Goel A, Dispenzieri A, Greipp PR, Witzig TE, Mesa RA, Russell SJ (2005). PS-341-mediated selective targeting of multiple myeloma cells by synergistic increase in ionizing radiation-induced apoptosis. *Exp Hematol* 33 (7): pp. 784-95.

- Greve B, Dreffke K, Rickinger A, Konemann S, Fritz E, Eckardt-Schupp F, Amler S, Sauerland C, Braselmann H, Sauter W, Illig T, Schmezer P, Gomolka M, Willich N, Bolling T (2009). Multicentric investigation of ionising radiation-induced cell death as a predictive parameter of individual radiosensitivity. *Apoptosis* 14 (2): pp. 226-35.
- Hong YS, Hong SW, Kim SM, Jin DH, Shin JS, Yoon DH, Kim KP, Lee JL, Heo DS, Lee JS, Kim TW (2012). Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1. *Int J Oncol* 41 (1): pp. 76-82.
- Huang CY, Wei CC, Chen KC, Chen HJ, Cheng AL, Chen KF (2012). Bortezomib enhances radiation-induced apoptosis in solid tumors by inhibiting CIP2A. *Cancer Lett* 317 (1): pp. 9-15.
- Huang J, Zhang J, Shi C, Liu L, Wei Y (2016). Survival, recurrence and toxicity of HNSCC in comparison of a radiotherapy combination with cisplatin versus cetuximab: a meta-analysis. *BMC Cancer* 16 (689): pp. 1-16.
- Kim J, Guan J, Chang I, Chen X, Han D, Wang CY (2010). PS-341 and histone deacetylase inhibitor synergistically induce apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 9 (7): pp. 1977-84.
- Kim KM, Lee SB, Lee SH, Lee YK, Kim KN (2005). Comparison of Validity between WST-1 and MTT Test in Bioceramic Materials. *Key Eng Mater* 284-286: pp. 585-8.
- Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, Peet CR, Lorenz LD, Nickel KP, Klingelhutz AJ, Lambert PF, Harari PM (2013). Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res* 73 (15): pp. 4791-800.
- Kofler B, Laban S, Busch CJ, Lorincz B, Knecht R (2014). New treatment strategies for HPV-positive head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271 (7): pp. 1861-7.

- Kubicek GJ, Axelrod RS, Machtay M, Ahn PH, Anne PR, Fogh S, Cognetti D, Myers TJ, Curran WJ, Jr., Dicker AP (2012). Phase I trial using the proteasome inhibitor bortezomib and concurrent chemoradiotherapy for head-and-neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83 (4): pp. 1192-7.
- Labussiere M, Pinel S, Vandamme M, Plenat F, Chastagner P (2011). Radiosensitizing properties of bortezomib depend on therapeutic schedule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 79 (3): pp. 892-900.
- Lansford CD, Grenman R, Bier H, Somers KD, Kim SY, Whiteside TL, Clayman GL, Welkoborsky H, Carey TE (2002). Head and Neck Cancers. In: *Human Cell Culture: Cancer Cell Lines Part 2*. Masters, J., Palsson, B. (Hrsg.). Dordrecht, Kluwers Academic Publishers, pp. 185-255.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11 (1): pp. 9-22.
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 (3): pp. 323-31.
- Li C, Johnson DE (2012). Bortezomib induces autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells via JNK activation. *Cancer Lett* 314 (1): pp. 102-7.
- Li C, Johnson DE (2013). Liberation of functional p53 by proteasome inhibition in human papilloma virus-positive head and neck squamous cell carcinoma cells promotes apoptosis and cell cycle arrest. *Cell Cycle* 12 (6): pp. 923-34.
- Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, Ferris RL, Lai SY (2007). Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck* 29 (2): pp. 163-88.
- Lin YC, Chen KC, Chen CC, Cheng AL, Chen KF (2012). CIP2A-mediated Akt activation plays a role in bortezomib-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol* 48 (7): pp. 585-93.

- Lioni M, Noma K, Snyder A, Klein-Szanto A, Diehl JA, Rustgi AK, Herlyn M, Smalley KS (2008). Bortezomib induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cancer Ther* 7 (9): pp. 2866-75.
- Logue SE, Elgendy M, Martin SJ (2009). Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat Protoc* 4 (9): pp. 1383-95.
- Mahmood T, Yang PC (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4 (9): pp. 429-34.
- Malm IJ, Fan CJ, Yin LX, Li DX, Koch WM, Gourin CG, Pitman KT, Richmon JD, Westra WH, Kang H, Quon H, Eisele DW, Fakhry C (2017). Evaluation of proposed staging systems for human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 123 (10): pp. 1768-77.
- Mandic R, Schamberger CJ, Muller JF, Geyer M, Zhu L, Carey TE, Grenman R, Dunne AA, Werner JA (2005). Reduced cisplatin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with mutations affecting the COOH-terminal nuclear localization signal of p53. *Clin Cancer Res* 11 (19): pp. 6845-52.
- Mandinova A, Lee SW (2011). The p53 pathway as a target in cancer therapeutics: obstacles and promise. *Sci Transl Med* 3 (64): pp. 1-7.
- Marur S, Forastiere AA (2016). Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 91 (3): pp. 386-96.
- McLaughlin-Drubin ME, Munger K (2009). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* 143 (2): pp. 195-208.
- Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S (2013). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and

- nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 35 (5): pp. 747-55.
- Mirghani H, Amen F, Blanchard P, Moreau F, Guigay J, Hartl DM, Laca St Guily J (2015). Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. *Int J Cancer* 136 (7): pp. 1494-503.
- Moreau P, Pylypenko H, Grosicki S, Karamanesht I, Leleu X, Grishunina M, Rehtman G, Masliak Z, Robak T, Shubina A, Arnulf B, Kropff M, Cavet J, Esseltine DL, Feng H, Girgis S, van de Velde H, Deraedt W, Harousseau JL (2011). Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol* 12 (5): pp. 431-40.
- Muller PA, Vousden KH (2013). p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 15 (1): pp. 2-8.
- Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsague X, Laporte L, Bosch FX, de Sanjose S, Trottier H (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 15 (12): pp. 1319-31.
- Nickson CM, Moori P, Carter RJ, Rubbi CP, Parsons JL (2017). Misregulation of DNA damage repair pathways in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma contributes to cellular radiosensitivity. *Oncotarget* 8 (18): pp. 29963-75.
- O'Neill CB, Baxi SS, Atoria CL, O'Neill JP, Henman MC, Sherman EJ, Lee NY, Pfister DG, Elkin EB (2015). Treatment-related toxicities in older adults with head and neck cancer: A population-based analysis. *Cancer* 121 (12): pp. 2083-9.
- O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, Waldron J, Zhao H, Perez-Ordóñez B, Weinreb I, Kim J, Ringash J, Bayley A, Dawson LA, Hope A, Cho J, Irish J, Gilbert R, Gullane P, Hui A, Liu FF, Chen E, Xu W (2013). Deintensification candidate subgroups



- in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol* 31 (5): pp. 543-50.
- Park JW, Nickel KP, Torres AD, Lee D, Lambert PF, Kimple RJ (2014). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein causes a delay in repair of DNA damage. *Radiother Oncol* 113 (3): pp. 337-44.
- Pellom ST, Jr., Shanker A (2012). Development of Proteasome Inhibitors as Therapeutic Drugs. *J Clin Cell Immunol S5* (5): pp. 1-13.
- Pignon JP, Bourhis J, Domette C, Designe L (2000). Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 355 (9208): pp. 949-55.
- Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM (2007). TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 357 (25): pp. 2552-61.
- Psyrrri A, Rampias T, Vermorken JB (2014). The current and future impact of human papillomavirus on treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* 25 (11): pp. 2101-15.
- Puck TT, Marcus PI (1956). Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 103 (5): pp. 653-66.
- Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, Bennett F, Pollock PM, Trent JM, Hendrix MJ, Rizzo P, Miele L, Nickoloff BJ (2005). Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 65 (14): pp. 6282-93.

- Quon H, Vapiwala N, Forastiere A, Kennedy EB, Adelstein DJ, Boykin H, Califano JA, Holsinger FC, Nussenbaum B, Rosenthal DI, Siu LL, Waldron JN (2017). Radiation Therapy for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 35 (36): pp. 4078-90.
- Riaz N, Morris LG, Lee W, Chan TA (2014). Unraveling the molecular genetics of head and neck cancer through genome-wide approaches. *Genes Dis* 1 (1): pp. 75-86.
- Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch CJ, Petersen C, Dikomey E, Kriegs M (2013). HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol* 107 (2): pp. 242-6.
- Robert-Koch-Institut ZfKi (Hrsg.) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin, 2016. 978-3-89606-279-6.
- Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, Jr., Liu R, Adams J, Elliott P, Cusack JC, Jr. (2001). Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50 (1): pp. 183-93.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75 (3): pp. 495-505.
- Sher DJ, Adelstein DJ, Bajaj GK, Brizel DM, Cohen EEW, Halthore A, Harrison LB, Lu C, Moeller BJ, Quon H, Rocco JW, Sturgis EM, Tishler RB, Trotti A, Waldron J, Eisbruch A (2017). Radiation therapy for oropharyngeal squamous cell carcinoma: Executive summary of an ASTRO Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Pract Radiat Oncol* 7 (4): pp. 246-53.

- Simard EP, Torre LA, Jemal A (2014). International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol* 50 (5): pp. 387-403.
- Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP (2009). Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)* 74 (13): pp. 1411-42.
- Strauss SJ, Higginbottom K, Juliger S, Maharaj L, Allen P, Schenkein D, Lister TA, Joel SP (2007). The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Res* 67 (6): pp. 2783-90.
- Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, Van Waes C (2001). Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7 (5): pp. 1419-28.
- Tamatani T, Takamaru N, Hara K, Kinouchi M, Kuribayashi N, Ohe G, Uchida D, Fujisawa K, Nagai H, Miyamoto Y (2013). Bortezomib-enhanced radiosensitization through the suppression of radiation-induced nuclear factor-kappaB activity in human oral cancer cells. *Int J Oncol* 42 (3): pp. 935-44.
- Tang AL, Hauff SJ, Owen JH, Graham MP, Czerwinski MJ, Park JJ, Walline H, Papagerakis S, Stoerker J, McHugh JB, Chepeha DB, Bradford CR, Carey TE, Prince ME (2012). UM-SCC-104: a new human papillomavirus-16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Head Neck* 34 (10): pp. 1480-91.
- Taylor SC, Posch A (2014). The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *Biomed Res Int* 2014: pp. 1-8.
- Tinhofer I, Budach V, Saki M, Konschak R, Niehr F, Johrens K, Weichert W, Linge A, Lohaus F, Krause M, Neumann K, Endris V, Sak A, Stuschke M, Balermpas P, Rodel C, Avlar M, Grosu AL, Abdollahi A, Debus J, Belka C, Pigorsch S, Combs SE, Monnich D, Zips D, Baumann M (2016). Targeted next-generation

- sequencing of locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck reveals druggable targets for improving adjuvant chemoradiation. *Eur J Cancer* 57: pp. 78-86.
- Van Waes C, Chang AA, Lebowitz PF, Druzgal CH, Chen Z, Elsayed YA, Sunwoo JB, Rudy SF, Morris JC, Mitchell JB, Camphausen K, Gius D, Adams J, Sausville EA, Conley BA (2005). Inhibition of nuclear factor-kappaB and target genes during combined therapy with proteasome inhibitor bortezomib and reirradiation in patients with recurrent head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63 (5): pp. 1400-12.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810): pp. 307-10.
- Wang D, Qin Q, Jiang QJ, Wang DF (2016). Bortezomib sensitizes esophageal squamous cancer cells to radiotherapy by suppressing the expression of HIF-1alpha and apoptosis proteins. *J Xray Sci Technol* 24 (4): pp. 639-46.
- Watson JV, Chambers SH, Smith PJ (1987). A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* 8 (1): pp. 1-8.
- White JS, Weissfeld JL, Ragin CC, Rossie KM, Martin CL, Shuster M, Ishwad CS, Law JC, Myers EN, Johnson JT, Gollin SM (2007). The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 43 (7): pp. 701-12.
- 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* 11: pp. 1-29.
- Wolff KD, Bootz F, Beck J, Bikowski K, Böhme P, Budach W, Burkhardt A, Danker H, Eberhardt W, Engers K, Fietkau R, Frerich B, Gauler T, Germann G, Gittler-Hebestreit N, Grötz K, Horch R, Ihrler S, Keilholz U, Lell M, Lübke A, Mantey W, Nusser-Müller-Busch R, Pistner H, Paradies K, Reichert T, Reinert S,

- Schliephake H, Schmitter M, Singer S, Westhofen M, Wirz S, Wittlinger M. S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom. Berlin, 2012.
- Yamashita AS, Baia GS, Ho JS, Velarde E, Wong J, Gallia GL, Belzberg AJ, Kimura ET, Riggins GJ (2014). Preclinical evaluation of the combination of mTOR and proteasome inhibitors with radiotherapy in malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurooncol* 118 (1): pp. 83-92.
- Yin LM, Wei Y, Wang Y, Xu YD, Yang YQ (2013). Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *Int J Med Sci* 10 (1): pp. 68-72.
- Zhao M, Sano D, Pickering CR, Jasser SA, Henderson YC, Clayman GL, Sturgis EM, Ow TJ, Lotan R, Carey TE, Sacks PG, Grandis JR, Sidransky D, Heldin NE, Myers JN (2011). Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clin Cancer Res* 17 (23): pp. 7248-64.
- Ziemann F, Arenz A, Preising S, Wittekindt C, Klussmann JP, Engenhardt-Cabillic R, Wittig A (2015). Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation +/- Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis. *Am J Cancer Res* 5 (3): pp. 1017-31.
- Ziemann F, Seltzsaam S, Dreffke K, Preising S, Arenz A, Subtil FSB, Rieckmann T, Engenhardt-Cabillic R, Dikomey E, Wittig A (2017). Roscovitine strongly enhances the effect of olaparib on radiosensitivity for HPV neg. but not for HPV pos. HNSCC cell lines. *Oncotarget* 8 (62): pp. 105170-83.
- zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2 (5): pp. 342-50.
- zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW (1974). Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13 (5): pp. 650-6.

## 8 ANHANG

### 8.1 Anhang A

Tabelle 7: Alphabetische Auflistung der verwendeten Gebrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
Deckgläser	15 mm × 15 mm	VWR, Radnor, PA, USA
Einmalspritzen	20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Flaschenaufsatzfilter	Durapore 0,22 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Gelloader-Pipettenspitzen	MultiFlex Flat Tips 0,37 mm	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Mikroreaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatten	TC-Platte 96 Well Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Soda-Glas, 150 mm	LLG Labware GmbH, Meckenheim, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen	5 ml für Durchflusszytometrie	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Membranfilter 0,2 µm PTFE	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zellkulturgefäße	TC-Schale 60 mm / 100 mm Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	16 cm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 8: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
Analoger Rollenmischer	RS-TR 5	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Chemilumineszenz-Imager	ChemoCam Imager 3.2	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator	INCO153med	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator	HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dispenser	isopenser	ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Deutschland
Durchflusszytometer	LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Elektroblotter	PerfectBlue™ 'Semi-Dry'	Peqlab, VWR International, Radnor, PA, USA
Elektrophoresevorrichtung	Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Feinwaage	Summit SI-64	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Gefrierschrank -20 °C	MediLine LKPv 6520	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Herafreeze Typ HFU 586 Basic	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Heizblock	ThermoCell CHB-202	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China
Inverses Durchlicht- mikroskop	CKX41	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Inverses Durchlicht- mikroskop	ICM 405	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kleinbrutschrank	Heraeus B 15	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kühl-Gefrier-Kombination	Comfort	Liebherr AG, Bulle, Schweiz

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
Kurzzeitmesser	TR118	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Leuchtplatte	6E	Rex Leuchtplatten, Blaustein, Deutschland
Magnetrührer	MIX 1 eco	2mag AG, München, Deutschland
Mehrkanal-Mikroliterpipette	Transferpette® S -8 200 µl	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Mikroliterpipetten	Reference® 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroliterpipetten	Research® plus 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroplattenleser	Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbach, Deutschland
Mikrozentrifuge	Heraeus FRESCO 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Netzgerät	peqPOWER 250	Peqlab, VWR International, Radnor, PA, USA
Netzgerät	ENDURO™ 300 V	Labnet International Inc., Edison, NJ, USA
Pipettierhelfer	accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhelfer	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Präzisionswaage	MXX-412	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Röntgenbestrahlungsanlage	X-RAD 320 iX	Precision X-Ray Inc., North Branford, CT, USA
Sterilbank	HERASAFE KS 12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA



Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS UW 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Universalzentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vertikaler Standautoklav	V-65	Systemec GmbH, Linden, Deutschland
Vortex-Schüttler	MX-S	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wippender Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

Tabelle 9: Alphabetische Auflistung der verwendeten Software.

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
FlowJo 7.6.5	TreeStar Inc., Ashland, OR, USA	Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA	Statistik, Visualisierung
Microsoft Office 2013 Professional	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA	Datenauswertung
QuantityOne 4.6.7	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA	Auswertung der Western Blots

Tabelle 10: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien.

<b>Bezeichnung (Abkürzung)</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Accutase®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung 37,5:1 (Rotiphorese® 30)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Alkylphenylpolyethylenglykol (Triton® X-100)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Annexin V-FITC Detection Kit	PromoKine, Heidelberg, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bortezomib (BZM)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Cell Proliferation Agent WST-1 (WST-1)	F.-Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Cis-Diammindichloridoplatin (Cisplatin, CDDP)	TEVA GmbH, Ulm, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium, ohne Magnesium (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut, unvergällt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut, vergällt	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS superior)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung (Abkürzung)	Hersteller
Glycerol, reinst	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Immobilon®-PSQ PVDF-Membran 0,2 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MEM Non Essential Amino Acids Solution 100x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10–180 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween® 20)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

<b>Bezeichnung (Abkürzung)</b>	<b>Hersteller</b>
Ribonuklease A (RNase A)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
RPMI-1640 Medium ohne L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Stabiles Glutamin 200 mM	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Tris(hydroxymethyl)aminomethan- hydrochlorid (TRIS-HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA 1x	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid 35 %	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien

---

## 8.2 Curriculum Vitae

Die Seite 92 (Curriculum Vitae) enthält personenbezogene Daten und ist daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## 8.3 Liste der Publikationen

### Originalarbeiten

Frank Ziemann, **Steve Seltz**sam, Kristin Dreffke, Stefanie Preising, Andrea Arenz, Florentine Subtil, Thorsten Rieckmann, Rita Engenhardt-Cabillic, Ekkehard Dikomey, Andrea Wittig.

Roscovitine strongly enhances the effect of olaparib on radiosensitivity for HPV neg. but not for HPV pos. HNSCC cell lines.

*Oncotarget* 2017; 8 (62): pp. 105170-83

### Publizierte Abstracts

**Steve Seltz**sam, Frank Ziemann, Stefanie Preising, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Rita Engenhardt-Cabillic, Ekkehard Dikomey, Andrea Wittig.

Funktionelle p53-Reaktivierung in HPV-positiven HNSCC-Zellen durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Radio- und Chemosensitivität.

*Vortrag beim 26. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Tübingen, Deutschland 9.-11. Februar 2017*

*Proceedings des 26. Symposiums Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie, Tübingen 2017, ISSN 1432-864X, p.62*

**Steve Seltz**sam, Frank Ziemann, Stefanie Preising, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Jens-Peter Klussmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig.

Führt Bortezomib in HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zu einer Strahlensensibilisierung?

*Posterbeitrag zur 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Mannheim, Deutschland 16.-19. Juni 2016*

*Strahlenther Oncol* 2016; 192 (S1), P04-5, p. 65

Frank Ziemann, Philip Terhorst, Stefanie Preising, **Steve Seltz**sam, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Jens-Peter Klussmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig.

CDK-Inhibition führt in HPV-negativen HNSCC durch Hemmung der homologen Rekombination zu Radiosensibilisierung.

*Vortrag zur 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Mannheim, Deutschland 16.-19. Juni 2016*

*Strahlenther Oncol* 2016; 192 (S1), V04-1, p.12

Frank Ziemann, Philip Terhorst, Stefanie Preising, **Steve Seltzsam**, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Jens-Peter Klußmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig.

Targeting CDKs sensitizes HPV-negative HNSCC cell lines to irradiation by inhibition of homologous recombination repair.

*Posterbeitrag zum 25. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden, Deutschland 11.-13. Februar 2016*

*Proceedings des 25. Symposiums Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie, Tübingen 2017, ISSN 1432-864X, p.50*

### **Kongressbeiträge**

**Steve Seltzsam**, Frank Ziemann, Kristin Dreffke, Stefanie Preising, Rita Engenhardt-Cabillic, Ekkehard Dikomey, Jens-Peter Klußmann, Andrea Wittig.  
Radio- and Chemosensitivity of HPV-associated HNSCC is Independent of Functional Restoration of p53.

*Posterbeitrag zum 2nd International Symposium on HPV Infection in Head and Neck Cancer, Leipzig, Deutschland 3.-4. November 2016, Poster Nr. 12*

Frank Ziemann, **Steve Seltzsam**, Kristin Dreffke, Stefanie Preising, Andrea Arenz, Jens-Peter Klußmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig.  
Combination of roscovitine and olaparib synergistically radiosensitizes HPV- but not HPV+ HNSCC cell lines.

*Posterbeitrag zum 2nd International Symposium on HPV Infection in Head and Neck Cancer, Leipzig, Deutschland 3.-4. November 2016, Poster Nr. 13*

---

## 8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Best, Bette, Brehm, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Depboylu, Dodel, Donner-Banzhoff, Eickmann, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Figiel, Fritz, Gress, Grundmann, Hertl, Hildebrandt, Hoffmann, Hoyer, Jaques, Jerrentrup, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, Knake, König, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maier-Giebing, Maisner, Menzler, Michl, Moll, Mutters, Müller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Nockher, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Ries, Ruchholtz, Sekundo, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schrott, Schu, Schulze, Schütz, Seifart, Seitz, Sevinc, Stahl, Steiniger, Suske, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wittig, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin.



## 8.5 Danksagung

Ohne die Unterstützung und Bestärkung auf unterschiedlichsten Wegen wäre es mir nicht möglich gewesen, dieses Projekt erfolgreich zum Abschluss zu bringen. Aus diesem Grund möchte ich die Gelegenheit nutzen, auf diesem Wege einmal „Danke“ zu sagen.

Frau Prof. Dr. Andrea Wittig danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die stete Betreuung, sowohl während der experimentellen Phase der Arbeit, als auch während der Datenauswertung und Vorbereitung der Publikationen. Insbesondere bedanke ich mich auch für die mehrmalige Möglichkeit, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf Kongressen präsentieren zu dürfen. An der Zusammenarbeit mit Frau Prof. Wittig schätze ich insbesondere die Verbindlichkeit und akkurate Arbeitsweise.

Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey, der während eines großen Teils meiner Zeit im Labor als Gastprofessor in unserer Arbeitsgruppe tätig war, danke ich für die vielen Impulse und die ehrliche Kritik, wodurch meine Arbeit erheblich vorangebracht wurde. Ich schätze seine klare, zielorientierte Art.

Ein weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic für die Möglichkeit, im Labor ihrer Klinik meine Versuche durchführen zu können. Durch die Möglichkeit einer Famulatur in ihrer Klinik habe ich zudem einen guten Einblick in die klinischen Aspekte der Strahlentherapie und insbesondere auch Eindrücke zu Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region bekommen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Frank Ziemann für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft während der Erstellung dieser Arbeit, insbesondere bei der Anleitung zu und Unterstützung bei den Laborversuchen. Durch seine kritische und querdenkerische Art, aber auch den Pragmatismus erhielt ich viele Impulse zur Lösung von Problemen und letztlich viele praktische Ratschläge, die die Fertigstellung der Arbeit erheblich beschleunigten.

Ich danke weiterhin den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, namentlich insbesondere Frau Dr. rer. nat. Kristin Dreffke und Frau Stefanie Preisling, für die freundliche Einarbeitung in die Arbeit im Labor sowie die stete Unterstützung in der Durchführung und Verbesserung der Versuche. Das tolle Arbeitsklima war nicht zuletzt einer der Gründe, warum mir die Arbeit im Labor so viel Spaß gemacht hat und ich mich immer gerne an schöne und lustige Momente zurückerinnere.

---

Den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Bernd Schmeck sowie Prof. Dr. Andreas Neubauer danke ich für die Möglichkeit, an ihren Geräten Teile der Versuche durchführen zu können.

Ein weiterer Dank gilt der Stiftung P. E. Kempkes für die finanzielle Drittmittelunterstützung des Projekts.

Zuletzt gilt ein großer Dank meiner Mutter sowie meinen Großeltern für die immerwährende persönliche Unterstützung und Begleitung während des gesamten Studiums.

## 8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss der Bortezomib-induzierten p53-Reaktivierung auf die Strahlen- und Chemosensibilität HPV-assoziiierter Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region“ in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. Andrea Wittig mit Unterstützung durch Dr. med. Frank Ziemann, Dr. rer. nat. Kristin Dreffke und Stefanie Preising ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

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

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

### **Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:**

**Steve Seltz** sam, Frank Ziemann, Stefanie Preising, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Rita Engenhardt-Cabillic, Ekkehard Dikomey, Andrea Wittig.

Funktionelle p53-Reaktivierung in HPV-positiven HNSCC-Zellen durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Radio- und Chemosensitivität.

*Vortrag beim 26. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Tübingen, Deutschland 9.-11. Februar 2017*

*Proceedings des 26. Symposiums Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie, Tübingen 2017, ISSN 1432-864X, p.62*

**Steve Seltz** sam, Frank Ziemann, Kristin Dreffke, Stefanie Preising,

Rita Engenhardt-Cabillic, Ekkehard Dikomey, Jens-Peter Klußmann, Andrea Wittig.

Radio- and Chemosensitivity of HPV-associated HNSCC is Independent of Functional Restoration of p53.

*Posterbeitrag zum 2nd International Symposium on HPV Infection in Head and Neck Cancer, Leipzig, Deutschland 3.-4. November 2016, Poster Nr. 12*

---

**Steve Seltz**am, Frank Ziemann, Stefanie Preising, Kristin Dreffke, Andrea Arenz, Jens-Peter Klussmann, Ekkehard Dikomey, Rita Engenhardt-Cabillic, Andrea Wittig.

Führt Bortezomib in HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zu einer Strahlensensibilisierung?

*Posterbeitrag zur 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Mannheim, Deutschland 16.-19. Juni 2016*

*Strahlenther Oncol 2016; 192 (S1), P04-5, p. 65*

---

Ort, Datum, Unterschrift

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

---

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer