

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Claus Belka

**Einfluss des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps für die  
Radioresistenz von Plattenepithelkarzinomen der  
Kopf-Hals-Region**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr. med. dent. Steffen Spörl

aus

Nördlingen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Kirsten Lauber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Horst Zitzelsberger  
Prof. Dr. Olivier Gires

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2021

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>AUFLISTUNG DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN.....</b>	<b>5</b>
	TABELLEN.....	5
	ABBILDUNGEN .....	6
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>13</b>
	5.1 PLATTENEPIHELKARZINOME DER KOPF-HALS-REGION – EIN ÜBERBLICK.....	13
	5.2 RISIKOFAKTOREN IN DER TUMORIGENESE DES HNSCCS .....	14
	5.3 THERAPIE VON PLATTENEPIHELKARZINOMEN DER KOPF-HALS REGION – STRAHLENTHERAPIE IM FOKUS.....	18
	5.4 BIOLOGISCHE STRAHLENFOLGEN UND ZELLULÄRE SENESZENZ – EIN ÜBERBLICK.....	23
	5.5 DER SENESZENZ-ASSOZIIERTE SEKRETORISCHE PHÄNOTYP: SASP .....	26
	5.6 RADIORESISTENZ IM HNSCC: GRUNDLAGEN UND THERAPEUTISCHE ÜBERLEGUNGEN.....	29
<b>6</b>	<b>ZIELSETZUNG DES PROJEKTS.....</b>	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
	7.1 METHODEN .....	33
	7.1.1 Zellkultur .....	33
	7.1.2 Heterotopes Xenograftmodell in der Maus.....	35
	7.1.3 In-vitro-Bestrahlung .....	35
	7.1.4 RNA-Isolation aus HNSCC-Zelllinien.....	36
	7.1.5 RNA-Isolation aus HNSCC-Xenograft-Tumoren.....	36
	7.1.6 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	37

7.1.7	<i>Reverse Transkription</i> .....	37
7.1.8	<i>Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)</i> .....	40
7.1.9	<i>Genexpressionsanalysen an einer HNSCC-Patientenkohorte</i> .....	42
7.1.10	<i>Proteinbestimmung durch Multiplex-ELISA</i> .....	43
7.1.11	<i>Statistik</i> .....	43
7.2	<b>MATERIAL</b> .....	44
7.2.1	<i>Verwendete Kits/Reagenzien</i> .....	44
7.2.2	<i>DNA-Primer-Sequenzen</i> .....	44
7.2.3	<i>Medien und Zusätze für die Zellkultur</i> .....	45
7.2.4	<i>Chemikalien und sonstige Reagenzien</i> .....	45
7.2.5	<i>Verbrauchsmaterial</i> .....	46
7.2.6	<i>Verwendete Geräte</i> .....	46
<b>8</b>	<b>VORARBEITEN UND RESULTATE</b> .....	<b>48</b>
8.1	VORARBEITEN .....	48
8.2	RESULTATE .....	50
<b>9</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>64</b>
9.1	SASP UND SENESZENZ: EINFLUSS AUF DIE RADIORESISTENZ IM HNSCC .....	64
9.2	CXCR2 UND LIGANDEN – BEDEUTUNG BEI MALIGNOMEN .....	66
9.3	METFORMIN: THERAPEUTISCHE ÜBERLEGUNGEN IM MALIGNOM .....	68
9.4	SASP: BEDEUTUNG IM MODELL DER ANTAGONISTISCHEN PLEIOTROPIE.....	72
9.5	AUSBLICK.....	73
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>75</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>82</b>
<b>12</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>84</b>

# 1 Auflistung der Tabellen und Abbildungen

## Tabellen

Tabelle 1	Mix 1 zur Reversen Transkription
Tabelle 2	Mix 2 zur Reversen Transkription
Tabelle 3	Einzelne Schritte des für die Reverse Transkription verwendeten Protokolls
Tabelle 4	qRT-PCR MM Berechnung
Tabelle 5	qRT-PCR Protokoll
Tabelle 6	Verwendete Kits/Reagenzien
Tabelle 7	DNA-Primer-Sequenzen
Tabelle 8	Medien und Zusätze für die Zellkultur
Tabelle 9	Chemikalien und sonstige Reagenzien
Tabelle 10	Verbrauchsmaterial
Tabelle 11	Verwendete Geräte

## Abbildungen

- Abbildung 1: HNSCC - Überblick sowie Risikofaktoren
- Abbildung 2: Klinik sowie Therapie des HNSCCs
- Abbildung 3: Strahleninduzierte Seneszenz im Tumor
- Abbildung 4: SASP: Chemokine und deren Zielrezeptoren
- Abbildung 5: Vorarbeiten
- Abbildung 6: Genexpressionsanalyse relevanter SASP-Faktoren nach Bestrahlung *in vitro*
- Abbildung 7: Genexpressionsanalyse relevanter SASP-Faktoren nach Bestrahlung *in vivo*
- Abbildung 8: Genexpression relevanter SASP-Faktoren nach Bestrahlung und Metformingabe *in vitro*
- Abbildung 9: *In-vitro*-Analyse der strahleninduzierten Proteinsekretion relevanter SASP-Faktoren mit und ohne Inhibition durch Metformin
- Abbildung 10: Radiosensibilisierung von Tumoren humaner HPV-neg. HNSCC-Zellen (Cal-33) im Xenograftmodell der Maus
- Abbildung 11: Klinische Relevanz des CXCR2 in einer HNSCC-Patientenkohorte
- Abbildung 12: Mögliche Mechanismen zur Erklärung des tumorsuppressiven Effekts von Metformin

## 2 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
b2M	β2-Mikroglobulin
C12-FDG	5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranosid
CCL	CC-Motiv-Chemokin-Ligand
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>

FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Gy	Gray
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMGU	Helmholtz-Zentrum München für Gesundheit und Umwelt
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
IL	Interleukin
IMRT	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
MDR1	<i>Multidrug resistance 1</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MM	<i>Mastermix</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-kappa B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>



NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PS	Penicillin-Streptomycin
Py	<i>Pack years</i>
RNA	Ribonukleinsäure
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
STD	<i>Sexually transmitted diseases</i>
TX	TrypLE™ Express (Trypsin-Formulierung)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	<i>World Health Organization</i>

***In Dankbarkeit  
an meine Eltern...***

# 3 Eidesstattliche Versicherung

---

## Eidesstattliche Versicherung

Steffen Spörl

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

"Einfluss des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps für die Radioresistenz von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region"

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Regensburg, 11.05.2021

---

Ort, Datum

Steffen Spörl

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

## 4 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) stellen die sechsthäufigste Tumorentität weltweit dar. Neben der Resektion nimmt die Strahlentherapie, meist in Form einer simultanen Radiochemotherapie, eine wichtige Stellung im Rahmen der Behandlung ein. Eine zentrale Herausforderung stellt jedoch die hohe intrinsische Strahlenresistenz (Radioresistenz) der Karzinome dar. So war aus Vorarbeiten bekannt, dass zwar die Anzahl nicht-proliferativer, seneszenten HNSCC-Zellen post Radiatio ansteigt, das Ausmaß der strahleninduzierten Seneszenz jedoch mit dem Grad der Radioresistenz positiv korreliert. Im Rahmen des vorliegenden Projekts konnte gezeigt werden, dass besonders strahlenresistente HNSCC-Zellen nach Bestrahlung eine große Bandbreite verschiedener Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine, den sogenannten Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP), freisetzen. Diese Daten konnten gleichermaßen *in vitro* als auch *in vivo* unter Verwendung von heterotopen Xenograftmodellen der Maus bestätigt werden. Dabei wurden deutliche Unterschiede auffällig, einerseits in der Ausprägung des SASP, andererseits in der Seneszenz-Antwort per se, wobei beide in strahlensensiblen HPV-positiven Zelllinien vermindert ausgeprägt waren. In einer Kohorte von HNSCC-Patienten wurde abschließend die Genexpression des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 2 (CXCR2), eines zentralen SASP-Faktor-Rezeptors, analysiert. Dabei zeigte sich eine negative Assoziation der Überexpression von CXCR2 mit dem Gesamtüberleben der Patienten.

# 5 Einleitung

## 5.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region – Ein Überblick

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) zählen derzeit weltweit zu den häufigsten onkologischen Krankheitsbildern. So wurden nach einer Erhebung des Robert Koch-Instituts aus dem Jahr 2015 Malignome der Mundhöhle und des Rachens als siebthäufigste Tumorlokalisation bei Männern in Deutschland klassifiziert <sup>1</sup> (Abb.1A). Die WHO beziffert die Inzidenz des HNSCCs in der Weltbevölkerung derzeit auf knapp 700.000 Patienten pro Jahr (Abb.1B), wobei erhebliche Unterschiede in der lokalen Häufigkeit auftreten <sup>2</sup>. Die Mortalität liegt weltweit bei knapp 400.000 Patienten pro Jahr, ein Großteil entfällt hierbei auf unterentwickelte Länder <sup>3</sup>. Interessant ist zudem die Verteilung des HNSCCs auf beide Geschlechter: So liegt die Inzidenz beim männlichen Geschlecht weltweit betrachtet bei über einer halben Million Neupatienten pro Jahr, beim weiblichen Geschlecht beträgt diese hingegen nur ca. 173.000 <sup>3</sup>. Vor allem aufgrund der klinischen Präsenz dieser malignen neoplastischen Erkrankung wurde in den vergangenen Jahren/Jahrzehnten umfangreiche Forschung zur Erlangung neuer Erkenntnisse zu Ätiologie und Pathogenese des HNSCCs betrieben: So lässt sich an einem Großteil des Patientenkollektivs eine Historie des (starken) Rauchens und des erhöhten Alkoholkonsums anamnestizieren. Erstaunlicherweise gibt es jedoch ein stetig zunehmendes Patientenkollektiv, in welchem obige Risikofaktoren fehlen, oder zumindest nur geringfügig ausgeprägt sind. Vielmehr konnte bei diesen Patienten eine Infektion mit Hochrisiko-HPV-Genotypen nachgewiesen werden <sup>4</sup>. Trotz dieser Entdeckungen bleibt das HNSCC weiterhin eine häufig letal verlaufende Erkrankung mit einem kumulativen Fünfjahresüberleben von nur 40-50% in lokal fortgeschrittenen Stadien <sup>4</sup>.

## 5.2 Risikofaktoren in der Tumorigenese des HNSCCs

Das HNSCC kann, wie auch eine Vielzahl anderer Malignome spontan, d.h. beispielsweise durch ubiquitäre Umwelteinflüsse wie freie Sauerstoffradikale in der Umgebungsluft, durch Exposition gegenüber ionisierender Strahlung in unserer Umwelt, sowie durch Akkumulation genetischer Mutationen mit steigendem Lebensalter entstehen. Als weitere Ursachen sind Keimbahnmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise FANCA oder TP53, zu nennen<sup>5 6</sup>. Darüber hinaus zählen auch individuelle Alterationen des Immunsystems oder bereits stattgehabter Kontakt mit medikamentösen Therapien, beispielsweise Zytostatika oder Immunsuppressiva, zu den Ursachen für die Entstehung eines HNSCC<sup>7</sup>. Epidemiologisch am relevantesten sind aber zivilisationsbedingte Angewohnheiten, deren Konsequenzen klar mit der Kanzerogenese des HNSCCs in Verbindung gebracht werden können:

### HNSCC und chronischer Nikotin- / Alkoholabusus:

Über Jahrzehnte hinweg herrschte klinisch ein Konsens bezüglich der Entstehung von HNSCCs: Dieser wurde zum einen in einer tiefen Raucheranamnese, welche meist über Jahre oder gar Jahrzehnte eruiert wurde, beschrieben. So konnten bis heute mehr als 60 verschiedene karzinogene Wirkstoffe im Tabakrauch detektiert werden. Entsprechend steigt das Risiko, durch Rauchen ein HNSCC zu entwickeln, um den Faktor  $10^8$ .

Neben der Raucheranamnese tritt im klinischen Alltag am HNSCC-Patientenkollektiv noch eine weitere Noxe, der chronische Missbrauch von Alkohol, sehr häufig in

Erscheinung. Aufgrund einer, für den Patienten oft sehr unangenehmen Stigmatisierung, unterbleiben nicht selten Angaben zur Häufigkeit der Alkohol-Exposition, oder es werden hierzu weniger umfangreiche Angaben getroffen. Ähnlich zu den potentiell karzinogenen Eigenschaften des Zigarettenrauchs konnte auch bei fortwährendem Alkoholmissbrauch ein direkter Zusammenhang mit der Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen werden <sup>9</sup>. Insbesondere die Kombination von Rauchen und Alkoholabusus hat drastische Auswirkungen auf die Entstehung von HNSCCs sowie auf das Überleben der Patienten (vgl. Abb.1D). Daher ist die dringliche Forderung von Präventionsmaßnahmen, im besten Fall nach Primärprävention zur Verhinderung der Initialausbildung entsprechender Malignome, gerade aus klinischer Sicht nachvollziehbar.

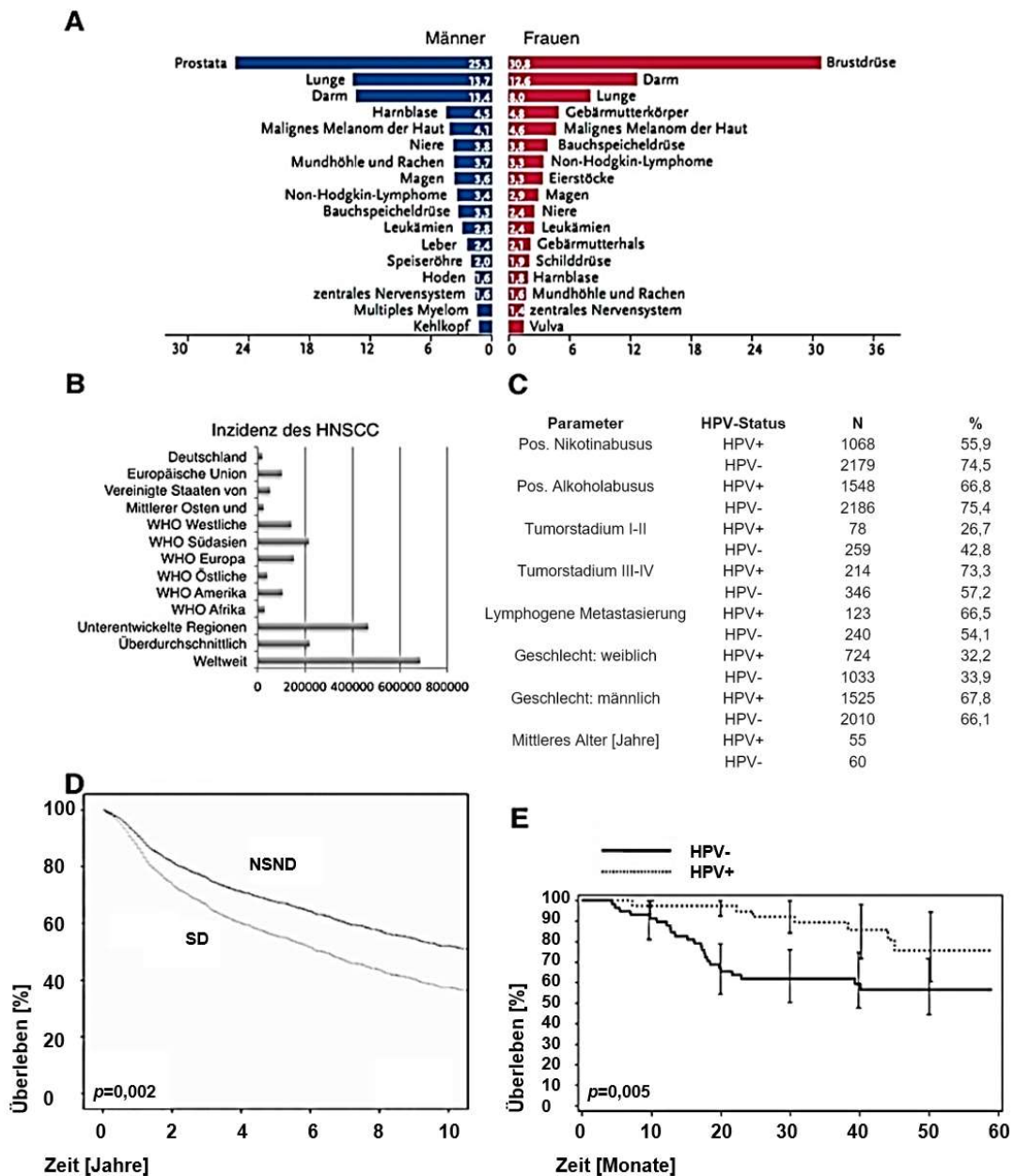
#### HNSCC und Hochrisiko-HPV-Typen:

Neben den genannten klassischen Risikofaktoren gibt es eine zunehmende Population von HNSCC-Patienten, denen keine der bekannten Noxen zugeordnet werden konnte. Bereits 1977 wurde durch die Arbeitsgruppe von Harald zur Hausen das kanzerogene Potential von humanen Papillomviren (HPV) im Zusammenhang mit der Kanzerogenese im Bereich der Mundhöhle nachgewiesen <sup>10</sup>. In einer Vielzahl von Studien wurde in den vergangenen Jahren die Bedeutung der HPV-Infektion hinsichtlich der Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich untersucht: So wurde beispielsweise gezeigt, dass sich HPV-positive HNSCCs nicht nur durch molekulare Alterationen von HPV-negativen Tumoren unterscheiden, sondern dass sich zusätzlich unterschiedliche Verteilungsmuster je nach HPV-Status nachweisen lassen: Während HPV-negative Plattenepithelkarzinome an nahezu allen Positionen innerhalb der Kopf-Hals-Region vorkommen, findet man HPV-

positive HNSCCs vorwiegend im Bereich des Oropharynx, mit einem Häufigkeitsgipfel an den Tonsillen sowie der Zungenbasis <sup>11</sup>.

So kristallisiert sich zunehmend eine Auftrennung der HNSCC-Tumore aufgrund ihres HPV-Status heraus <sup>12</sup>. Beispielsweise präsentieren sich HPV-positive HNSCCs klinisch häufig mit bereits erfolgter lymphogener Metastasierung (vgl. Abb.1C), das Gesamtüberleben der Patienten stellt sich jedoch meist bedeutend besser dar (vgl. Abb.1E). Dass HPV-positive Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle eine klinisch relevante Rolle einnehmen, wurde in zahlreichen Metaanalysen eindrücklich belegt <sup>13</sup>. Folglich gerieten nun ehemals weniger bedeutsame Tumormanifestationsstellen in den Vordergrund, beispielsweise Tonsillenkarzinome, welche ebenfalls eine starke Assoziation mit Hochrisiko-HPV-Typen aufweisen <sup>13</sup>.





**Abb.1: HNSCC – Überblick sowie Risikofaktoren.** **A:** Prozentuale Verteilung der häufigsten Lokalisationen von Tumoren bei Männern und Frauen in Deutschland, entnommen und adaptiert aus <sup>14</sup>; **B:** Inzidenz des HNSCCs im Ländervergleich <sup>2</sup>; **C:** Metaanalyse bezüglich der Assoziation von HPV-Status mit klinischen Parametern, Tabelle modifiziert nach <sup>12</sup>; **D:** Gesamtüberleben in einer Patientenkohorte (n=1829) dichotomisiert nach Rauchen und Alkoholabusus (SD) sowie deren Absenz (NSND). Es zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil im Falle einer Noxenabstinenz (p=0,002), entnommen und adaptiert aus <sup>15</sup>; **E:** Überlebenswahrscheinlichkeit in einer Patientenkohorte mit fortgeschrittener Tumorerkrankung (Stadium III und höher) dichotomisiert nach HPV-Status. Hierbei zeigt sich ein signifikant erhöhtes Fünfjahresüberleben im Falle eines positiven HPV-Status (p=0,005). Die Fehlerbalken bilden das 95%-Konfidenzintervall ab, entnommen und adaptiert aus <sup>16</sup>.

### 5.3 Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region – Strahlentherapie im Fokus

Ein inspektorisch sowie palpatorisch malignomsuspekter Befund sollte generell zunächst histopathologisch untersucht werden, um einerseits die Dignität, zum anderen aber auch den Differenzierungsgrad der Tumorerkrankung (*Grading*) bestimmen zu können <sup>17</sup>. Neben der klinischen Evaluation der lokalen Tumorausdehnung, wird zusätzlich der Lymphknotenstatus bestimmt, wobei eine lymphogene Metastasierung bereits bei bis zu 40% der Patienten erfolgt ist <sup>18</sup>. Mittels einer Schnittbildgebung wie der Computertomographie (CT) oder der Magnetresonanztomographie (MRT) kann zudem eine hämatogene Metastasierung bildmorphologisch ausgeschlossen werden <sup>18</sup>.

Wenn die Diagnosesicherung und die klinische Einstufung des Tumors (*Staging*) erfolgt sind, können adäquate Therapieoptionen anhand der lokalen Tumorausbreitung sowie etwaiger entfernter maligner Befunde diskutiert werden: Es stehen diverse kurative, jedoch auch einige palliative Therapieoptionen zur Verfügung, welche im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz gegeneinander abgewogen werden sollten <sup>18</sup>. Da die Therapie zudem unterschiedliche Toxizitäten und Einschränkungen mit sich bringt, muss der Patientenwunsch einerseits, andererseits aber auch die jeweilige individuelle Konstitution evaluiert werden: Während Patienten mit langjährigem Nikotin- und Alkoholabusus nicht selten diverse Grunderkrankungen aufweisen, zeigt das HPV-positive Kollektiv häufig eine negative Raucheranamnese, in der Regel einen besseren Allgemeinzustand, weniger Komorbiditäten und ein niedrigeres Alter <sup>19</sup>. Prognostisch wird aktuell ein positiver HPV-Status im HNSCC als relevanter Faktor hinsichtlich des 5-Jahres-Überlebens angesehen <sup>18</sup>.

Ebenso bietet die *High-Risk*-HPV-Infektion den zur Zeit einzigen validierten tumorbiologischen Stratifizierungsmarker für HNSCCs <sup>20</sup>. Daher sollten therapierelevante tumorbiologische Gesichtspunkte neben klassischen *Staging*-Kriterien im klinischen Alltag vermehrt Anwendung finden.

Auf den ersten Blick erscheint das chirurgische Vorgehen zur Therapie des HNSCCs als Methode der Wahl. Handelt es sich nach erfolgtem *Staging* ausschließlich um einen lokalen Befall mit zu erwartender Resektion im Gesunden und spricht der Allgemeinzustand der Patienten nicht gegen eine chirurgische Intervention, so ist primär ein chirurgisches Vorgehen anzustreben <sup>18</sup>.

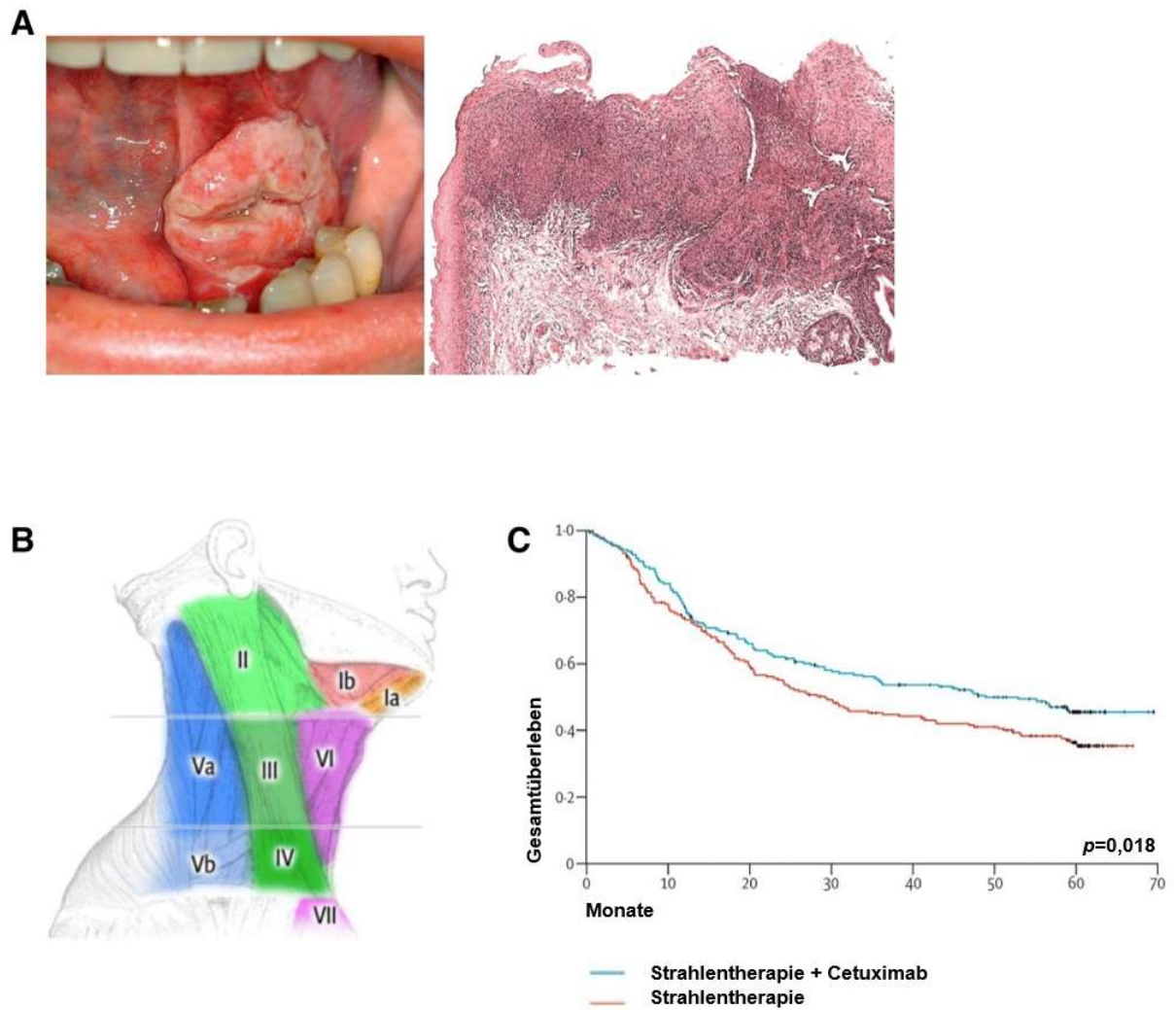
Neben dem vereinfachten Fall eines ausschließlich lokalen Tumorbefalls ist jedoch auch die bereits beschriebene, häufig auftretende lymphogene Metastasierung zu beachten, weshalb die Indikation zur elektiven *Neck Dissection* in der Therapie der HNSCCs relativ breit gestellt werden sollte <sup>18,21</sup>.

Jenseits chirurgischer Therapiekonzepte kommt der Strahlentherapie (Radiotherapie) in der kurativen als auch in der palliativen Therapie des HNSCCs die bedeutsamste Rolle zu <sup>22</sup>. Grundsätzlich kann die Therapie von HNSCCs über perkutane oder auch invasive Verfahren, z.B. der sogenannten interstitiellen Brachytherapie, durchgeführt werden. Physikalisch gesehen bieten sich verschiedene Strahlenarten an. Am häufigsten wird harte Röntgenstrahlung im MeV-Bereich, die von Linear-Beschleunigern generiert und perkutan appliziert wird, eingesetzt. Für brachytherapeutische Ansätze werden verschiedene Radionuklide, wie <sup>192</sup>Ir oder <sup>125</sup>I verwendet <sup>23</sup>. Zudem finden sich klinische Studien zur Protonen- und Schwerionentherapie in der Therapie des HNSCCs in klinischer Testung <sup>24 25</sup>. Für die primäre als auch adjuvante Radiatio werden Dosen von

meist 70 Gray (Gy) empfohlen, eine Gesamtstrahlendosis von unter 60 Gy sollte im kurativen Setting vermieden werden <sup>18</sup>. Die Applikation der Gesamtdosis erfolgt in Fraktionen, bedingt durch die begrenzte Strahlentoleranz des gesunden Begleitgewebes, wobei die konventionelle Fraktionierung eine Applikation von fünf Einzeldosen in Höhe von 1,8 – 2,0 Gy pro Behandlungswoche vorsieht. Alterierende Therapieschemata stellen beispielsweise die akzelerierte oder hyperfraktionierte Strahlentherapie dar, wobei akzelerierte Bestrahlungskonzepte letztlich eine verkürzte Behandlungszeit bedingen, wodurch dieses Therapieschema vor allem bei der Therapie schnell wachsender Malignome indiziert ist. Hyperfraktionierte Konzepte zeichnen sich daneben durch eine mehrmalige Bestrahlung pro Behandlungstag, beispielsweise mit Dosen von 1,1 – 1,2 Gy aus <sup>18</sup>. Insgesamt kann durch die Hyperfraktionierung die applizierte Gesamtdosis deutlich erhöht werden. In der Literatur wurde beiden Modifikationen eine verbesserte lokale Tumorkontrolle attestiert, zudem erhöhte sich in einigen Studien das Gesamtüberleben im Falle einer alterierenden Fraktionierung <sup>18 26</sup>.

Die biologisch größte Wirkung entfaltet die Strahlentherapie an Zellverbänden mit hoher Teilungsrate, vordergründig Tumorzellen. Leider liegen oft auch andere Gewebe im Bestrahlungsfeld, welche ebenso einem hohen *Turnover* unterliegen, wie beispielsweise Schleimhäute. Eine Schädigung dieser Gewebe durch die Bestrahlung ist der Hauptgrund für auftretende Nebenwirkungen, wie Mukositiden oder eine Xerostomie der Speicheldrüsen, und kann eine nachträgliche Dosislimitation oder sogar einen vorzeitigen Therapieabbruch bedingen. Erfreulicherweise können diese Nebenwirkungen der Radiatio heutzutage in vielen Fällen deutlich reduziert werden, beispielsweise durch den Einsatz der intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) <sup>27</sup>.

Einen besonderen Stellenwert nimmt die Strahlentherapie als Kombinationsbehandlung in Verbindung mit einer simultan verabreichten Chemotherapie ein, welche, als Monotherapie appliziert, lediglich im palliativen Setting eine Therapieoption im HNSCC darstellt <sup>18</sup>. Hierbei ist es gleichermaßen möglich, die Chemotherapie neoadjuvant, adjuvant oder begleitend zur Strahlentherapie zu applizieren <sup>22</sup>. In einem kurativen Ansatz haben sich hierbei Platinderivate, wie Cisplatin oder Carboplatin, aber auch Pyrimidinanaloga wie 5-FU als erfolgsversprechend erwiesen <sup>28 29</sup>. Molekular zielgerichtete Therapieansätze, die bei einigen hämatopoetischen Neoplasien große Erfolge erzielen konnten <sup>30</sup>, wurden klinisch auch für HNSCCs getestet <sup>31</sup>. So konnte Cetuximab, ein monoklonaler Antikörper gegen den EGFR, in Kombination mit Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Radiatio eine Verlängerung des Gesamtüberlebens um etwa 20 Monate erzielen (Abb.2C) <sup>31</sup>.



**Abb.2 Klinik und Therapie des HNSCCs:** **A:** Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, links: Intraorales Foto (Regio 34-36); rechts: Histologisches Präparat in HE-Färbung, entnommen aus <sup>20</sup>; **B:** Übersicht über die Lymphknotenstationen des Halses, entnommen und adaptiert aus <sup>32</sup>; **C:** Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten unter Strahlentherapie (n=213) oder der Kombination aus Radiatio und Cetuximab mit einem signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit der Kombinationstherapie aus Radiatio und Cetuximab vs. alleiniger Radiatio (n=211) (HR 0,73, 95% CI 0,56-0,95; p=0,018), entnommen aus <sup>31</sup>.

## 5.4 Biologische Strahlenfolgen und zelluläre Seneszenz – Ein Überblick

Die in der Strahlentherapie verwendete ionisierende Strahlung bedingt verschiedenste zelluläre Schäden und hat einen weitreichenden Einfluss auf die zelluläre Homöostase. So verursachen die hochenergetischen Strahlen vor allem gravierende Schäden im Genom der Zielzellen: Potentiell entstehen Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenschäden sowie Kombinationen verschiedener Schäden auf engem Raum, die sogenannten *bulky lesions*.

In der bestrahlten Zelle wird daraufhin die DNA-Schadensantwort (DNA *Damage Response*, kurz: DDR) aktiviert, welche unterschiedlichste zelluläre Mechanismen umfasst<sup>33</sup>: So stehen beispielsweise im Falle eines Doppelstrangbruches mehrere Reparatursysteme zur Verfügung, auf der einen Seite die langsame und fehlerarme Homologe Rekombination, auf der anderen Seite das *Non-homologous end-joining*, welche zwar schneller, aber folglich auch fehleranfälliger z.B. durch die Insertion oder Deletion weniger Basenpaare agiert<sup>34</sup>. Die DNA-Schadensantwort wird durch zwei Kinasen, ATM und ATR reguliert, welche unter anderem durch die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 agieren. Physiologischerweise ist p53 ohne intrazelluläre DNA-Schäden relativ gering exprimiert, bedingt durch die Ubiquitin-Ligase MDM2 (*Mouse Double Minute-2*), welche zur Ubiquitinierung von p53 führt<sup>33</sup>. Wird nun durch die DDR der ATM/ATR-Signalweg aktiviert, so erfährt p53 eine Phosphorylierung durch die aktivierten Kinasen und folglich eine verminderte Ubiquitinierung<sup>35</sup>.

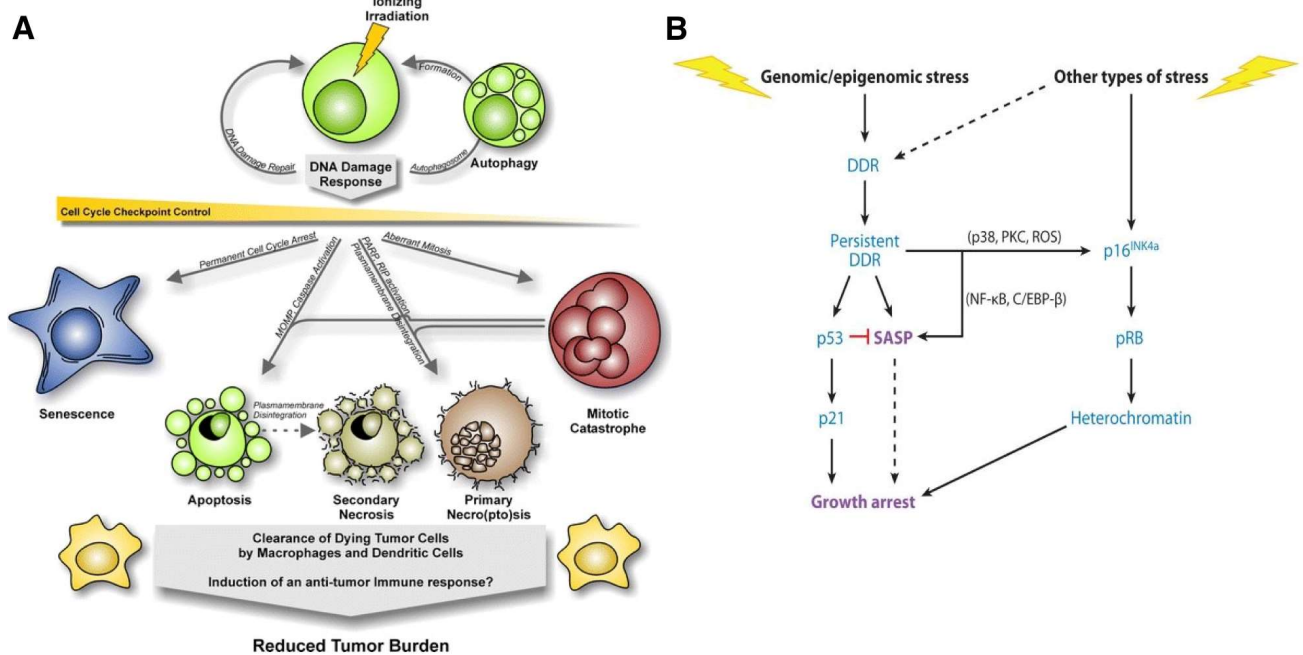
Die Aktivierung von p53 kann die verstärkte Expression pro-apoptotischer Mitglieder der B-cell lymphoma 2-Familie (BCL-2) bewirken und durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol die Apoptoseinduktion bedingen. Andere zelluläre

Reaktionen auf ionisierende Strahlung sind die zelluläre Nekrose und die zelluläre Seneszenz <sup>33</sup>.

Die Erstbeschreibung der zellulären Seneszenz erfolgte bereits 1965, als Hayflick und Kollegen feststellten, dass Zellen nach einer gewissen Anzahl an Mitosen ihr Wachstum nicht mehr fortsetzten <sup>36</sup>. Heute gilt als bewiesen, dass durch die Anzahl an Replikationszyklen eine fortschreitende Verkürzung der Telomere der DNA erfolgt, welche von der Zelle als persistierender DNA-Schaden erkannt wird. Dadurch kann es zur Induktion der Seneszenz, d.h. zum Verlassen des proliferativen Zellzyklus durch die Zelle kommen <sup>33</sup>.

Neben diesem, als "replikative Seneszenz" beschriebenen Prozess, wird der Seneszenz eine weitere bedeutsame Rolle im Hinblick auf die Tumorsuppression zugesprochen <sup>37</sup>. Mechanistisch sind unterschiedliche Wege der Seneszenzinduktion möglich, nach Campisi führen demnach mindestens zwei Tumorsuppressorpathways in die zelluläre Seneszenz <sup>38</sup>: So imponiert ein potentieller Weg in die Seneszenz über die Aktivierung von p53 und p21. Andere Mechanismen umfassen die Seneszenzinduktion über p16 und pRB oder andere, bisher nicht im Detail bekannte Regulatoren (vgl. Abb.3B) <sup>38</sup>.





**Abb.3 Strahleninduzierte Seneszenz im Tumor: A: Mechanismen des Zelltodes nach ionisierender Radiatio, entnommen aus <sup>33</sup>; B: Verschiedene Wege in die zelluläre Seneszenz; entnommen aus <sup>38</sup>.**

Über die letzten Jahre wurde die Beteiligung der zellulären Seneszenz an einer Vielzahl biologischer Prozesse untersucht: So wurden bedeutende Zusammenhänge im Rahmen der Tumorsuppression wie auch der Tumorigenese, des biologischen Alterns, als auch der Embryogenese publiziert <sup>39</sup>. Aus onkologischer Sicht sind sicherlich zwei Formen der Seneszenz, die Onkogen-induzierte Seneszenz, als auch die Therapie-induzierte Seneszenz interessant: Die Onkogen-induzierte Seneszenz kann vereinfacht als Schutzmechanismus im Falle einer onkogenen Stimulation, vordergründig durch Ras- bzw. Raf-Proteine, gesehen werden <sup>40</sup>. Ähnlich wie der Onkogen-induzierten Seneszenz wurde der erst kürzlich bekannten Therapie-induzierten Seneszenz eine p53/pRB-unabhängige Aktivierung attestiert. Hierbei wurden vorwiegend klassische

Chemotherapeutika wie auch strahlentherapeutische Interventionen als Auslöser diskutiert <sup>41</sup>.

Phänotypisch imponiert eine seneszente Zelle mit einer granulären Struktur, die Größe der Zelle nimmt zu, ebenso steigt der Anteil an Lysosomen in seneszenten Zellen an <sup>42</sup>. Nach heutigem Stand der Forschung gilt die Vorstellung, dass eine seneszente Zelle im Zellverbund "ruht", als überholt. Vielmehr bleibt die jeweilige Zelle metabolisch aktiv und sezerniert diverse Chemokine, Zytokine sowie Wachstumsfaktoren in ihre Umgebung, welche wiederum einen bedeutenden Einfluss auf benachbarte Zellverbände haben können <sup>33</sup>.

### **5.5 Der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp: SASP**

Wie schon erwähnt, ist die zelluläre Seneszenz nicht auf betroffene Zellen beschränkt, sondern übt einen weitreichenden Einfluss auf benachbarte Zellen/Strukturen aus. So geben seneszente Zellen an ihr umgebendes Milieu ein Konglomerat verschiedener Botenstoffe ab, wie beispielsweise Interleukine, proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, welches als Seneszenz-assoziiertes sekretorisches Phänotyp (SASP) zusammengefasst wird. Die explizite Zusammensetzung der verschiedenen SASP-Faktoren scheint hierbei in einem hohen Ausmaß vom Zelltyp abzuhängen <sup>43</sup>.

Obgleich verschiedene Wege der Seneszenzinduktion untersucht wurden, konnte lange Zeit kein belastbarer Mechanismus zur SASP-Ausprägung propagiert werden. Heute gilt als etabliert, dass der SASP unabhängig von bekannten Regulatoren der Seneszenz wie p53, p16 oder pRB auftritt <sup>44</sup>. Diesbezüglich konnte kürzlich der Zusammenhang zwischen zytoplasmatischem Chromatin und der SASP-Induktion veranschaulicht werden: So

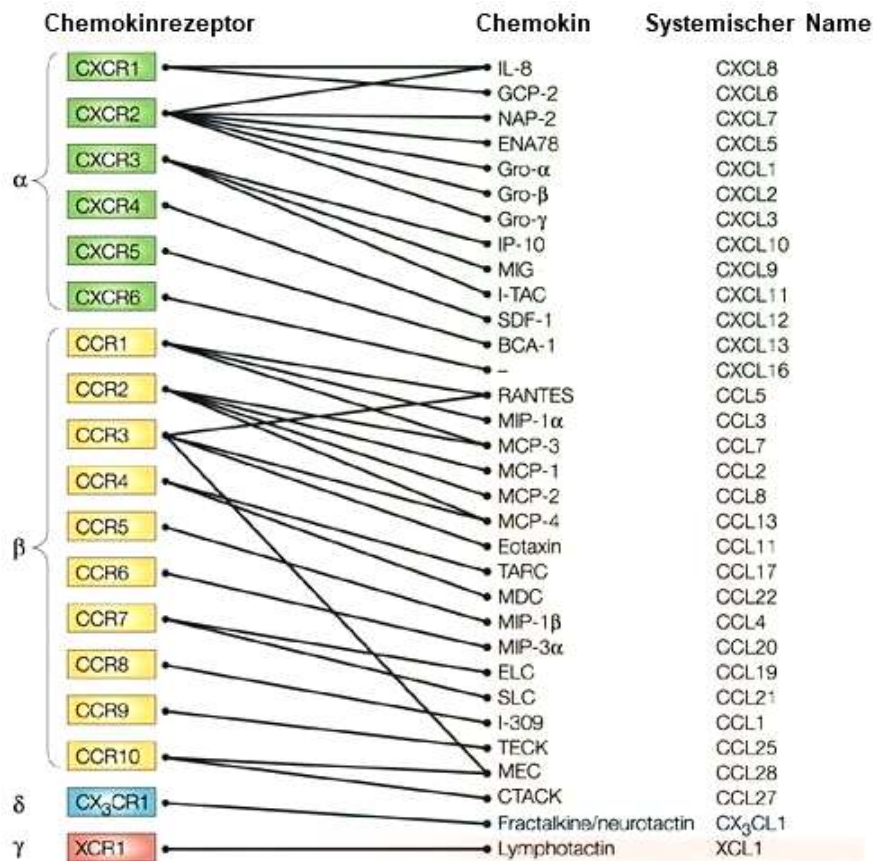
wurde gezeigt, dass zytoplasmatische Chromatinfragmente über den cGAS-Sting-Signalweg, ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems <sup>45</sup>, die Induktion verschiedenster SASP-Faktoren bedingen <sup>46</sup>.

Die Bandbreite der sezernierten Faktoren bewirkt Folgen in der direkten Umgebung der seneszenten Zelle: So zählen neben klassischen Interleukinen und Chemokinen, wie IL1a, IL1b, IL6, IL8 und weiteren CXCR1/2-Liganden auch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der pro-angiogenetisch wirkt, zu den Bestandteilen des SASP <sup>43</sup>. Darüber hinaus sind diverse Enzyme, zum Beispiel Matrixmetalloproteasen (MMPs), Bestandteile des SASP, wodurch der umgebende Gewebeverbund stark beeinflusst werden kann. Weiterhin findet man auch nicht-proteinogene Bestandteile, beispielsweise NO, sowie nichtlösliche Faktoren wie Fibronectin und Kollagene unter den Komponenten des SASP <sup>43</sup>. Da die Wirkung der sezernierten Faktoren vor allem durch den vermittelnden Rezeptor bedingt wird, ist eine Kenntnis der jeweiligen Interaktionspartner von essentieller Bedeutung. Abbildung 4 bietet diesbezüglich einen kurzen Überblick über die verschiedenen CXC-Liganden und ihre korrespondierenden Rezeptoren.

Vor allem der CXC-Rezeptor 2 (CXCR2) nimmt hierbei eine bedeutsame Rolle als einer der zentralen Rezeptoren des Chemokinsignalwegs in der zellulären Interaktion ein <sup>47</sup>. Die sezernierten Faktoren rufen letztlich eine Vielzahl von zellulären Antworten hervor: So unterstützen sie einerseits den Organismus, potentiell entartete Zellen über die Induktion einer Immunantwort zu beseitigen <sup>48</sup>. Andererseits fördert der SASP aber auch eine Vielzahl pro-neoplastischer Prozesse, wie beispielsweise gesteigerte Gewebsregenerierung, Metastasierung und Angiogenese, sowie die Induktion einer

spezifischen Tumormikroumgebung, wodurch sich letztlich therapieresistente Klone von Tumorzellen entwickeln können, die zur Entstehung neuer klinischer Manifestationen führen können <sup>49</sup>.

Zusammenfassend lassen sich bezüglich des SASP also pleiotrope Effekte feststellen, die je nach sezerniertem Ligand, involvierten Rezeptoren und Zellart, durchaus tumorsupportiv wirken können <sup>43</sup>.



**Abb.4: SASP: Chemokine und deren Zielrezeptoren: Übersicht über die verschiedenen Chemokinrezeptoren und ihre Liganden, entnommen und adaptiert aus <sup>47</sup>.**

## 5.6 Radioresistenz im HNSCC: Grundlagen und therapeutische Überlegungen

Die Strahlentherapie, meist verabreicht in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika bzw. zielgerichteten Therapien, stellt wie bereits beschrieben einen grundlegenden Ansatz in der Erstlinientherapie des HNSCCs dar<sup>18</sup>. Leider tritt ein nicht unerheblicher Anteil der Karzinome auf, welcher nur unzureichend auf die jeweilige Therapie anspricht. Im klinischen Alltag findet sich derzeit lediglich der HPV-Status als prädiktiver Marker für die zu erwartende Radio- / Chemosensitivität im HNSCC<sup>50</sup>.

Ein häufig beleuchteter und intensiv erforschter Ansatz ist sicherlich in der Tumorphypoxie zu sehen. Wie in vielen anderen soliden Malignomen, konnten auch im HNSCC hypoxische Areale detektiert werden, meist bedingt durch rapides Tumorstadium und insuffiziente Gefäßversorgung<sup>51</sup>. Fällt der Sauerstoffpartialdruck deutlich unter die physiologische Norm, so erfolgt als zelluläre Antwort die verstärkte Transkription verschiedener Gene, um eine Anpassung des Gewebes an die Sauerstoffminderversorgung zu gewährleisten<sup>52</sup>. Während unter physiologischen Sauerstoffbedingungen der Hypoxie-induzierte Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) durch Ubiquitinierung nur bedingt akkumuliert, ermöglicht die Hypoxie eine Dimerisierung aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  und konsekutiv die Bindung an HREs (*hypoxia response elements*) mit der veränderten Expression einer Vielzahl von Genen<sup>52</sup>. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  die vermehrte Expression des MDR1- (*multidrug resistance 1*) Komplexes bedingt, wodurch letztlich die intrazelluläre Akkumulation verschiedenster Pharmaka und Chemotherapeutika limitiert wird<sup>53 52</sup>.

Ein weiterer, gerade im Hinblick auf die Radioresistenz des HNSCCs relevanter Signalweg, ist der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt/*mammalian target of rapamycin* (mTOR) Signalweg. Die Aktivierung dieses Signalweges im Rahmen der Strahlentherapie gilt als gesichert <sup>50</sup>, zudem stellen aktivierende Mutationen im mTOR-Gen einen Teil der bekannten genetischen Alterationen im HNSCC dar <sup>54</sup>. Die durch den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg affizierten zellulären Prozesse reichen von Angiogeneseinduktion, T-Zell-Stimulierung, bis hin zur DNA-Schadensreparatur und Apoptoseregulation <sup>50</sup>. Durch die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges infolge der Bestrahlung konnte eine verstärkte DNA-Schadensreparatur, eine Inhibition von Apoptose und letztlich damit eine Zunahme der Radioresistenz belegt werden <sup>55</sup>.

Therapeutisch scheint der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg eine vielversprechende Zielstruktur zur Verminderung der Radioresistenz im HNSCC darzustellen, sodass sich aktuell eine Vielzahl zielgerichteter Therapien diesbezüglich in klinischer Erprobung befinden <sup>56</sup>. Leider war bisher die Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs am HNSCC wenig erfolgreich. So konnte im Rahmen einer Phase II-Studie an 19 HNSCC-Patienten lediglich in einem Fall ein deutliches Ansprechen auf den Akt-/PI3K-Inhibitor verzeichnet werden <sup>57</sup>. Unter Umständen kann jedoch jenseits der Monotherapie bei fortgeschrittenem HNSCC die klinische Applikation von Akt-/PI3K-Inhibitoren im Rahmen der kurativen Radiochemotherapie einen relevanten Therapieansatz zur Verminderung der Therapieresistenz in Zukunft darstellen.

Ein therapeutisch deutlich weitreichender Ansatz läge sicherlich darin, bereits prätherapeutisch das individuelle Ansprechen eines Patienten auf eine Radio- bzw. Radiochemotherapie im HNSCC vorhersagen zu können. Aktuell findet sich diesbezüglich

jedoch, jenseits des HPV-Status, kein klinisch etablierter Stratifizierungsmarker, sodass die Radioresistenz, welche beschriebenermaßen in ca. 15% aller HNSCCs auftritt, eine fundamentale Herausforderung für aktuelle Therapieschemata darstellt <sup>58</sup>. Ein interessantes Konzept um das Ansprechen einer Strahlentherapie bereits prätherapeutisch zu prognostizieren konnte bereits 2014 durch Akervall und Kollegen aufgezeigt werden. Hier wurden vor einer definitiven Radiatio im HNSCC Gewebeprobe entnommen, mittels "cDNA-Microarrays" analysiert und letztlich mit dem Therapieergebnis post Radiatio korreliert. Für Patienten mit einer Überexpression von Yap-1 sowie c-Met konnte diesbezüglich ein signifikant verschlechtertes Ansprechen auf die Radiatio aufgezeigt werden <sup>58</sup>. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten zudem Hess und Kollegen <sup>59</sup> mit der Korrelation von HNSCC MicroRNA-Signaturen und dem individuellen Patientenoutcome. Hierbei konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass bei Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC anhand von spezifischen MicroRNA-Signaturen eine belastbare Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens als auch für die Rezidivwahrscheinlichkeit getroffen werden kann <sup>59</sup>.

Schlussendlich demonstrieren die exemplarisch vorgestellten Forschungsansätze die Notwendigkeit sowie vor allem gerade das Potential, das individuelle Ansprechen eines Patienten prätherapeutisch evaluieren als auch im weiteren Therapieverlauf verbessern zu können. Im Endeffekt stellt die Thematik der Radioresistenz im HNSCC eine fundamentale Herausforderung sowohl für die Grundlagenforschung als auch im klinischen Alltag dar. Das Ziel künftiger translationaler Forschung läge diesbezüglich in der routinemäßigen Applikation von personalisierten Therapieoptionen, welche letztlich ein deutlich verbessertes *Outcome* für den jeweiligen Patienten versprechen.

## 6 Zielsetzung des Projekts

Im Rahmen dieses Projekts sollte die Bedeutung des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps für die Radioresistenz des HNSCCs evaluiert werden. Ausgangspunkt bildeten Vorergebnisse, die zeigten, dass spezifische Faktoren durch seneszente Zellen freigesetzt werden, welche das klonogene Überleben umliegender Zellen fördern. Neben der Identifizierung dieser Faktoren *in vitro* sollte auch deren Einfluss *in vivo* untersucht werden. Zudem beinhaltet die Zielsetzung die Identifikation von Inhibitoren, welche die Ausschüttung der – im Hinblick auf das Tumorwachstum pro-tumorigenen – Faktoren zu limitieren vermögen.

Übergeordnet widmet sich dieses Projekt also den mechanistischen Grundlagen der Radioresistenz des HNSCCs und daraus abgeleiteten, neuartigen therapeutischen Konzepten zur Behandlung dieser Gruppe von Malignomen.



# 7 Material und Methoden

## 7.1 Methoden

### 7.1.1 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte mit kultivierten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien Cal-27, Cal-33, UPCI-SCC-040, UPCI-SCC-099, UPCI-SCC-131, UPCI-SCC-154 (alle Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) UD-SCC-2 (Prof. Dr. T. Hoffmann, Universitätsklinikum Ulm) sind etablierte, kommerziell erhältliche Plattenepithelkarzinomzelllinien aus der Kopf-Hals-Region, welche sich u.a. in Ihrem HPV-Status unterscheiden. Zudem wurden neben Tumorzelllinien immortalisierte Mundschleimhautkeratinozyten (OKF6, Rheinwald Laboratory, Brigham and Woman's Hospital, Boston, USA) verwendet. Die Zellauthentizität wurde revalidiert durch STR- (*short tandem repeat*) Analyse (DSMZ).

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit einem Nährmedium, bestehend aus 90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10% fetalem Kälberserum (FCS) (beide von Thermo Fisher Scientific, Schwerte) sowie einer Penicillin-Streptomycin-Mischung (Lonza AG, Köln) (100 U/ml, respektive 0,1 mg/ml) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im befeuchteten Inkubator bei 7,5% CO<sub>2</sub>. Ein Mediumwechsel wurde je nach Konfluenz alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien wurden auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht und konnten letztlich als mykoplasmenfrei getestet werden.

Sobald die Zellen eine lichtmikroskopisch bestimmte Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten, erfolgte die Ablösung der Zellen mittels TrypLE™ Express (TX) (Thermo Fisher

Scientific), gefolgt von der Inaktivierung des Enzyms durch FCS-haltiges Medium. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei ca. 200 g wurde das erhaltene Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und weiter passagiert. Die lichtmikroskopische Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Hierbei wurden 10 µl einer Zellsuspension zwischen Kammer und Deckglas pipettiert. Die Zählung wurde stets in allen 4 Quadranten durchgeführt. Zur späteren Analyse der Genexpression wurden HNSCC-Zellen mittels Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst, in eiskaltem PBS gewaschen und durch Zentrifugation bei 13.000 rpm (60 s) gesammelt. Das trockene Zellpellet wurde bei -80°C gelagert, die Isolation der Nukleinsäuren zur weiteren Analyse erfolgte stets zeitnah.

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese in einem Gefriermedium, bestehend aus 90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim) resuspendiert und die Zellsuspension in ein CryoTube transferiert. Anschließend erfolgte über 24h ein langsames Abkühlen auf -80°C und letztlich die Einlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Diese nun eingefrorenen Zellaliquots fungierten als sog. *Master Stocks*, hiervon ausgehend wurden konsekutiv *Working Stocks* für die Durchführung unmittelbarer *In-vitro*-Experimente generiert, um Kontaminationen vorzubeugen und die Authentizität gewährleisten zu können. Für die Applikation von Metformin (Sigma-Aldrich) wurde stets eine frische Metforminlösung (500 mM) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Thermo Fisher Scientific) hergestellt und sterilfiltriert, die letztlich applizierte Metforminkonzentration im Zellmedium betrug 5 mM.

### **7.1.2 Heterotopes Xenograftmodell in der Maus**

Sämtliche *In-vivo*-Experimente wurden in Anlehnung an die FELASA-Richtlinien sowie nach erfolgter Genehmigung durch die Aufsichtsbehörden vorgenommen. Diese wurden am Institut für Zellbiologie am Universitätsklinikum Essen in Kollaboration mit Prof. Dr. Verena Jendrossek und PD Dr. Diana Klein durchgeführt. Als Versuchstiere wurden NMRI (*Naval Medical Research Institute*) athymische Nacktmäuse gewählt, welche durch ihre T-Zell-Defizienz eine probate Grundlage für Xenograftmodelle bieten. Es wurden 500.000 humane HNSCC-Tumorzellen in 50µl Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel an den Hinterlauf der Maus transplantiert. Sobald die Tumore ein Volumen von ca. 100 mm<sup>3</sup> erreicht hatten (nach 3-5 Tagen), wurden diese fraktioniert mit einem Collimator am "RS320 X-Ray" Kabinett bestrahlt (X-Strahl, 300 kV, 10 mA, 0.5 mm Cu-filter, ~1.53 Gy/min), im Fall einer Behandlung mit Metformin wurden 250µg/g KG Metformin gelöst in 100-150µl PBS intraperitoneal appliziert. Bei Erreichen eines kritischen Tumolvolumens (1500mm<sup>3</sup>), die Tumolvolumenbestimmung erfolgte 3x / Woche, oder eines kritischen Gewichtsverlusts, wurden die Tiere durch eine letale Isoflurandosis aus dem Versuch genommen. Die Tumore, welche in der vorliegenden Arbeit für qRT-PCR als auch Multiplex-ELISA Analysen verwendet wurden, konnten nach Explantation sofort bei -80°C schockgefroren und für die Analyse auf Trockeneis nach München versandt werden.

### **7.1.3 In-vitro-Bestrahlung**

Die Bestrahlung von Zelllinien erfolgte mittels eines X-Strahl Strahlenkabinetts RS225 (Dosisleistung: 0,95 Gy/min, 200 kV, 10 mA, Thoräus-Filter: 1 mm Aluminium, 0,4 mm Zinn und 0,2 mm Kupfer). Hierfür wurden die Zellen in Multiwellplatten ausgebracht und

nach Adhärenz sowie konsekutivem Mediumwechsel mit den angegebenen Dosen bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte bei Raumtemperatur, anschließend wurden die Zellkulturplatten weiter inkubiert.

#### **7.1.4 RNA-Isolation aus HNSCC-Zelllinien**

Die Isolation der RNA aus asservierten Zellpellets erfolgte mittels NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend der Angaben des Herstellers. Nach Lyse der Zellen wurde die genomische DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt, und die RNA an eine Silika-Säule gebunden. Es folgte ein Verdau der DNA mittels DNase sowie mehrmaliges Waschen der RNA. Danach wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

#### **7.1.5 RNA-Isolation aus HNSCC-Xenograft-Tumoren**

Zur Isolation von RNA aus humanen HNSCC-Xenograft-Tumoren wurden diese zunächst in 100 µl TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) bei Raumtemperatur mechanisch homogenisiert. Das den bereits homogenisierten Tumor umgebende TRIzol™ wurde für die analysierten Tumormassen (ca. 100 mg) auf ein finales Volumen von 500 µl gebracht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Chloroform und 120 µl RNase-freiem Wasser. Die Phasen wurden nun mittels eines Vortex-Mixers gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde das Lysat bei 12.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die dabei entstehende Schichtung der einzelnen Phasen erlaubte es, die RNA-haltige obere Phase zu isolieren und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,7 ml) zu transferieren. Um die

Formation eines späteren RNA-Pellets zu verbessern und dessen visuelle Detektion zu erleichtern, wurde GlycoBlue (Thermo Fisher Scientific) als Kopräzipitant sowie 280 µl kaltes Isopropanol zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 12.000 g. Das entstandene RNA-Pellet wurde mehrfach mit 75% Methanol gewaschen und letztlich luftgetrocknet. Je nach Pelletgröße wurde die RNA in 10-30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **7.1.6 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration**

Um die Konzentration der resuspendierten RNA zu evaluieren, wurde ein NanoDrop-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) benutzt. Die Messung wurde hierbei zunächst um das Lösemittel, im vorliegenden Fall RNase-freies Wasser, Leerwert korrigiert, ehe anschließend ein Volumen von 1,0 µl auf dessen RNA-Konzentration untersucht wurde. Hinsichtlich der Qualitätsbeurteilung der isolierten RNA wurde die optische Dichte durch Beurteilung des 260/280-Wertes beurteilt, wobei ausschließlich Proben mit einer 260/280-Ratio > 1,6 für weitere Analysen verwendet wurden. Während der gesamten Messung befanden sich die Proben auf Eis.

#### **7.1.7 Reverse Transkription**

Zur Durchführung von quantitativer PCR aus isolierter RNA wurde diese zunächst in cDNA umgeschrieben. Dieser Zwischenschritt, Reverse Transkription genannt, benötigt als Enzym die reverse Transkriptase (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific). Neben dem Enzym kamen *Random*-Hexamere, OligodT<sub>18</sub>, dNTPs,

sowie ein RNase-Inhibitor (Ribolock RNase-Inhibitor) von (Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz.

Um ein Mikrogramm RNA in cDNA umzuschreiben, wurde der in Tab.1 und Tab.2 dargestellte Ansatz verwendet. Hierbei wurde zügig auf Eis gearbeitet, um die thermolabile RNA nicht zu schädigen. Anschließend wurde der Ansatz verschlossen und kurz bei 400 g zentrifugiert.

---

**Mix1 zur Reversen Transkription**

**Oligo(dT)<sub>18</sub> (5 µM)**

**Random-Hexamere (50 µM)**

**dNTP Mix (500 µM)**

**1 µg RNA**

---

**Tab.1:** *Mix 1 zur Reversen Transkription*

Anschließend erfolgte die Denaturierung der RNA für 15 Minuten bei 65°C, ein rasches Herunterkühlen des Ansatzes, gefolgt von der umgehenden Zugabe der in Tab.2 genannten Substanzen sowie ein weiterer kurzer Zentrifugationsschritt bei 400 g.

<b>Mix 2 zur Reversen Transkription</b>	<b>Volumen in <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>Nuklease-freies Wasser</b>	2,5
<b>RiboLock RNase-Inhibitor (1,6 U/<math>\mu\text{l}</math> stock)</b>	0,5 ( $\cong$ 0,8U)
<b>5x Reaktionspuffer</b>	4
<b>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/<math>\mu\text{l}</math> stock)</b>	1 ( $\cong$ 200U)

**Tab.2:** *Mix 2 zur Reversen Transkription*

Die Reverse Transkription wurde unter Verwendung des in Tab.3 gezeigten Temperaturverlaufs durchgeführt. Die entstandene cDNA konnte nach Abschluss des Protokolls bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder aber direkt für weitere Versuche verwendet werden.

<b>Protokoll der Reversen Transkription</b>	<b>Temperatur in <math>^{\circ}\text{C}</math></b>
<b>Schritt 1: 10 min</b>	25
<b>Schritt 2: 60 min</b>	42
<b>Schritt 3: 10 min</b>	10
<b>Schritt 4: <math>\infty</math></b>	4

**Tab.3:** *Einzelne Schritte des für die Reverse Transkription verwendeten Protokolls*

### 7.1.8 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Das Ziel der quantitativen Real-time PCR (qRT-PCR) ist es, die Quantität von Nukleinsäuren in einer Probe zu bestimmen. Das Verfahren kann vereinfacht als Weiterentwicklung einer regulären PCR betrachtet werden <sup>60</sup>. Hierbei wird ein fluoreszentes Signal emittiert (eingesetzt wurde die SYBR Green-basierte Detektion von dsDNA), welches proportional zur Menge des generierten Amplicons über den zeitlichen Verlauf an Intensität zunimmt. Die qRT-PCR zeichnet sich durch eine annähernd exponentielle Kinetik aus, die letztlich stark abflacht, wenn Nukleotide und Enzym limitierend werden und wenn inhibierende Produkte angereichert sind.

Die eingesetzte Menge an cDNA (20 ng pro Reaktionsansatz) wird im Probenansatz, dem sog. Mastermix (MM) mit 300 nM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, einem zweifach konzentrierten Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) und Nuklease-freiem Wasser kombiniert.

<b>qPCR-Ansatz: Totalvolumen</b>	<b>20 µl</b>
<b>SYBR Green (2X)</b>	10µl
<b>Vorwärtsprimer (300 nM final)</b>	3 µl
<b>Rückwärtsprimer (300 nM final)</b>	3 µl
<b>cDNA (20 ng, variabel je nach Expressionshöhe)</b>	2 µl
<b>Wasser</b>	2 µl

**Tab.4:** qRT-PCR MM Berechnung



Während der Herstellung des Mastermixes wurde stets auf Eis gearbeitet. Nach dem Versiegeln der Mikrotiterplatte erfolgte ein kurzes Zentrifugieren bei 400 g, anschließend wurde die Analyse an einem LightCycler 480 II (Roche Life Science, Penzberg) durchgeführt. Tab.5 zeigt hierbei die verschiedenen Zyklen des verwendeten Protokolls zur qRT-PCR.

<b>Zyklus : 1x</b>	<b>Zyklus 2: 45x</b>	
<b>95°C; 10:00</b>	95°C; 0:15	60°C; 0:30

**Tab.5:** qRT-PCR Protokoll

Um das Genexpressionsniveau relativ quantifizieren zu können, wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode angewandt. Für die Genexpressionsanalyse in der HNSCC-Patientenkohorte wurde sich der Standardkurvenmethode bedient. Bei den hier gezeigten Versuchen wurden mehrere Referenzgene, sog. *Housekeeping Genes* für die Quantifizierung herangezogen. Die Anforderung an solch ein Referenzgen ist hierbei seine konstante Expression, welche nicht, oder nur sehr gering, von der jeweiligen Behandlung, also beispielsweise einer ionisierenden Bestrahlung, verändert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden als Referenzgene 18S RNA,  $\beta$ 2-Mikroglobulin (b2m), ALAS, sowie  $\beta$ -Aktin verwendet, wobei beispielsweise die Expressionshöhe der 18S RNA bekanntermaßen weitaus höher liegt als die der meisten untersuchten Gene <sup>61</sup>. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Referenzgene miteinander kombiniert und das jeweils zu untersuchende Gen auf deren Mittelwert normalisiert.

### 7.1.9 Genexpressionsanalysen an einer HNSCC-Patientenkohorte

Untersuchungen am primären Patientenmaterial wurde nach Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der LMU sowie nach erfolgter Aufklärung und Genehmigung durch die Patienten durchgeführt. Alle Experimente basieren auf den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (1964) sowie deren Revisionen.

Die Analyse der Genexpression und darauf aufbauende Berechnungen wurden an Paraffin-fixierten Operationspräparaten primär resezierter HNSCCs durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lagen histologische Präparate und pseudonymisierte klinische Datensätze von insgesamt 86 Patienten vor. Diese Patientenkohorte wurde im Rahmen der klinischen Kooperationsgruppe (KKG) "Personalisierte Radiotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren" in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Strahlenzytogenetik des Helmholtz-Zentrums München für Gesundheit und Umwelt (HMGU, Neuherberg), der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der LMU München, sowie der Pathologie und der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (jeweils LMU München) etabliert <sup>29</sup>. Die Patienten wurden anhand klinischer Kriterien, beispielsweise dem HPV-Status (HPV16), charakterisiert und in Gruppen eingeteilt, welche nach der Genexpressionsanalyse für statistische Berechnungen herangezogen wurden. Die cDNA von Tumoren der HNSCC-Patientenkohorte wurde vom HMGU (Neuherberg) zur Verfügung gestellt. Zur Genexpressionsanalyse wurden Pseudotriplicate in verschiedenen Verdünnungsstufen zur Effizienzkorrektur erstellt. Zielgen der Genexpressionsanalyse war der CXCR2. Zur Korrelation der Genexpressionsanalyse mit den Überlebensdaten der Patienten wurde als Endpunkt einerseits der Todeszeitpunkt des Patienten, oder das letzte *Follow-up* gewertet.

### 7.1.10 Proteinbestimmung durch Multiplex-ELISA

Um zu den unterschiedlichen Erntezeitpunkten des *Timecourse*-Experiments eine Konfluenz von 60-80% gewährleisten zu können, wurden UPCI-SCC-040-Zellen in unterschiedlichen Densitäten gesät. Je nach Stimulus erfuhren die Zellen eine pharmakologische Behandlung mit 5 mM Metformin, singuläre Bestrahlung mit 10 Gy, bzw. im Fall der Kontrollgruppe keinen Stimulus. Die Zellüberstände wurden an Tag 0, 1, 2, 3 und 4 des Experiments geerntet und umgehend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  schockgefroren. Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand wurden am Institut für Pathologie der Charité Berlin durch den "Bio-Plex Pro Human Chemokine Assay" auf einem "Bio-Plex 200" Auslesegerät nach den Vorgaben des Herstellers erhoben (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen).

### 7.1.11 Statistik

Daten aus qRT-PCR, FACS sowie Multiplex-Elisa wurden als Mittelwerte  $\pm$  SD gezeigt, sofern nicht anders vermerkt. Die statistische Auswertung für unabhängige Stichproben erfolgte mittels Student-t-Test bzw. unter Zuhilfenahme des Wilcoxon-Tests, wobei ein  $p$ -Wert  $<0.05$  als statistisch signifikant erachtet wurde. Zur Überlebenszeitanalyse wurde sich der Kaplan-Meier-Methode bedient <sup>62</sup>.

Statistische Vergleiche von Überlebenszeitkurven wurden mittels Log-Rang-Test durchgeführt, es wurde zweiseitig getestet, wobei ein  $p$ -Wert  $<0.05$  als statistisch signifikant erachtet wurde.

## 7.2 Material

### 7.2.1 Verwendete Kits/Reagenzien

Kit/ Reagenz	Verwendung	Hersteller
GlycoBlue Coprecipitant (15 mg/mL)	RNA-Isolation	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
NucleoSpin RNA Kit	RNA-Isolation	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II Kit	RNA-Isolation	Macherey-Nagel, Düren
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Reverse Transkription	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SYBR Green PCR Master Mix	qRT-PCR	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
TRIzol Reagent 200ml	RNA-Isolation	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Tab.6: Verwendete Kits/Reagenzien

### 7.2.2 DNA-Primer-Sequenzen

qRT-PCR-Primer	Sequenz FP	Sequenz RP
18S rRNA	5'CGGCTACCACATCCAAGGAA3'	5'GCTGGAATTACCGCGGCT3'
ALAS	5'TCCACTGCAGCAGTACACTACCA3'	5'ACGGAAGCTGTGTGCCATCT3'
B2m	5'TGCTCGCGCTACTCTCTCTTT3'	5'TCTCTGCTGGATGACGTGAGTAAAC3'
Beta-Actin	5'CCTGGCACCCAGCACAATG3'	5'GCCGATCCACACGGAGTACTT3'
CCL1 (I309),	5'GCTTGGTGCTAGCTGGGATGT3'	5'CTCCGCAAATGAGAAGCAACA3'
CCL3 (MIP1a)	5'CACCATGGCTCTCTGCAACC3'	5'AATCTGCCGGGAGGTGTAGC3'
CCL8 (MCP2)	5'GCTGGAGAGCTACACAAGAATCAC3'	5'GCCCCGTTTGGTCTTCAA3'
CCL13 (MCP4)	5'AGGCTGAAGAGCTATGTGATCACCC3'	5'CCTTGCCCAGTTTGGTTCTG3'
CCL25 (TECK)	5'GAGCGGGAGCTGCAATCTG3'	5'GGGTTCCACACACCTTCT3'
CXCL1 (Gro-a)	5'AAGCTTGCCTCAATCCTGCAT3'	5'TGGATTTGTCAGTGTTCAGCATC3'
CXCL2 (MIP2a)	5'CGCATCGCCCATGGTTAA3'	5'CAGTTGGATTTGCCATTTTTTCAG3'
CXCL3 (MIP2b)	5'CCCATGGTTCAGAAAATCATCG3'	5'GTTGGTGCTCCCCTTGTTC3'
CXCL5 (ENA78)	5'ATCCAGAAGCCCCTTTTCTAAAG3'	5'TTTCCTTGTTCACCGTCC3'
CXCL6	5'AAACTGCAGGTGTTCCCG3'	5'TTCTTGTTCCTACTGTCCAAAAT3'
CXCL7	5'CAAGTCGAAGTGATAGCCACACT3'	5'TCTGGGAGCATCTGGGTCC3'
CXCL10 (IP10)	5'TGGCATTCAAGGAGTACCTCTCT3'	5'GTAGCAATGATCTCAACACGTGG3'
CXCL11 (ITAC)	5'TGTTCAAGGCTTCCCATGT3'	5'GAGGCTTCTCAATATCTGCCAC3'
CXCL12 (SDF1)	5'TGCTGGTCCTCGTGCTGAC3'	5'TGGCAACATGGCTTTCAA3'
CXCR2	5'AAGCCCAGCGACCCAGTC3'	5'AGGGATTCTGGTTCACATGGG3'
EGF	5'GGGCCCCTACTACTACAGGACTCAG3'	5'GGCAAGAGGACATCCCATCC3'
GMCSF	5'CTAGAGACACTGCTGCTGAGATG3'	5'CTCCTGGAGGTCAAACATTTCTG3'
HGF	5'ACTTCCATTCATTGCAAGGCT3'	5'CTCCACTTGACATGCTATTGAAG3'
Il1a	5'GCTTCTGAGCAATGTGAAATAC3'	5'CAAATTTCACTGCTTCATCCAGA3'
Il1b	5'CCTGAGCTCGCCAGTCAAAT3'	5'TTTAGGGCCATCAGCTTCAAAG3'
Il6	5'GGTACATCCTCGACGGCATCT3'	5'AGTGCCTCTTGTGCTTTTCA3'

<b>II8</b>	5'TGGCAGCCTTCCTGATTCT3'	5'TGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCA3'
<b>MIF</b>	5'TGCACAGCATCGGCAAGAT3'	5'ATGTAGACCCTGTCCGGGCT3'
<b>VEGF</b>	5'GGCAGAATCATCACGAAGTGGT3'	5'GGGTCTCGATTGGATGGCA3'

*Tab.7: DNA-Primer-Sequenzen*

### 7.2.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
<b>BPM</b>	<i>Life Technologies, Karlsruhe</i>
<b>DMEM</b>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<b>FCS</b>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<b>GlutaMAX</b>	<i>Life Technologies, Karlsruhe</i>
<b>Metformin</b>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<b>PS</b>	<i>Lonza AG, Köln</i>
<b>rec hEGF</b>	<i>Life Technologies, Karlsruhe</i>
<b>TrypLE Express</b>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>

*Tab.8: Medien und Zusätze für die Zellkultur*

### 7.2.4 Chemikalien und sonstige Reagenzien

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Bafilomycin A1</b>	<i>Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt</i>
<b>C12FDG</b>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<b>DMSO</b>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<b>Ethanol</b>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<b>F12</b>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<b>Methylenblau</b>	<i>Panreac AppliChem GmbH, Darmstadt,</i>
<b>PBS</b>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<b>Metformin</b>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>

*Tab.9: Chemikalien und sonstige Reagenzien*

## 7.2.5 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Art	Hersteller
Röhrchen mit Rundboden	FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Tissue Culture Plate (6 Well, 24 Well)	Multiwell Platten	Falcon by Corning, Kaiserslautern
Blaubrand-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
PCR Kombi 8er SoftStrips 0.2ml	PCR-Strips sowie Verschlüsse	Biozym Biotech Trading GmbH, Hessisch Oldenburg
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Platten für qRT-PCR	Roche Applied Science, Penzberg
Research plus	Pipetten	Eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S. Standard/Bulk	Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S. Dualfilter	Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy	Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences AG, Biebertal
Multipipette plus	Pipettierhilfe für Pipettierserien	Eppendorf, Hamburg
Combitips advanced	Aufsätze für Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Stripette	Serologische Pipetten	Corning, Kaiserslautern
Minisart NML 0,2µl	Spritzenvorsatzfilter zur Sterilfiltration	Sartorius AG, Göttingen
Corning Zellkulturflaschen	Zellkulturflaschen	Corning, Kaiserslautern
Zentrifugenröhrchen	Zentrifugenbehältnis	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Zell-Spatel, steril - Weich-Polyethylen	Zellschaber	Semadeni AG, Düsseldorf

Tab. 10: Verbrauchsmaterial

## 7.2.6 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Art	Hersteller
RS225	Strahlenkabinett	Xstrahl Life Science, Ratingen
Heracell 240i CO <sub>2</sub> Inkubator	Zellkulturinkubator	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
LSR II Flow Cytometer	Durchflusszytometer (FACS)	BD Biosciences, Heidelberg
Analysenwaage ABJ-NM	Feinwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Primo Vert	Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Heraeus Pico 17	Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
LightCycler 480 II	qRT-PCR Thermocycler	Roche Applied Science, Penzberg
Mastercycler pro	RT-PCR Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Maxisafe 2020	Klasse II Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

<b>Heraeus Oven Function Line UT20</b>	Trockenschrank	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<b>Reagenzglasmixer Vortex 7-2020</b>	Vortexmixer	<i>NeoLab, Heidelberg</i>
<b>Inkubations-/Inaktivierungsbad 1003</b>	Wasserbad	<i>GFL, Burgwedel</i>
<b>Heraeus Multifuge X3R</b>	Zentrifuge	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<b>NanoDrop 2000</b>	Spektralphotometer zur Nukleinsäurequantifikation	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>

**Tab.11:** *Verwendete Geräte*

## 8 Vorarbeiten und Resultate

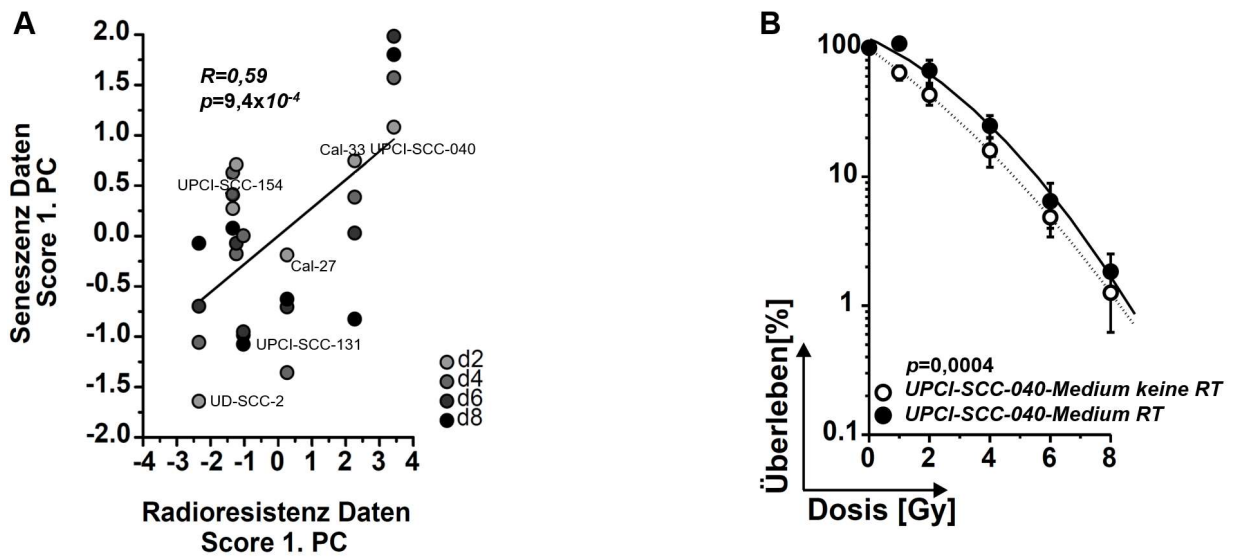
### 8.1 Vorarbeiten

Die Grundlage dieses Projekts bildeten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe "Molekulare Onkologie" zu den molekularen Mechanismen, die die inhärente Strahlenresistenz von HNSCC-Zellen regulieren und wie diese auf biologischer Ebene therapeutisch adressiert werden können. Dazu wurde zunächst das klonogene Überleben einer Sammlung von etablierten HNSCC-Zelllinien nach Bestrahlung ermittelt und zelllinienspezifische Strahlenindizes extrahiert. Eine eingehende Analyse der Dynamik von DNA-Schadensreparatur, Zelltod- und Seneszenz-Induktion ergab eine unerwartete positive Korrelation zwischen Seneszenzinduktion und Radioresistenz ( $R=0,81$ ,  $p=0,026$ ) (Abb.5A).

Zusätzlich konnte anhand von Mediumtransfer-Experimenten gezeigt werden, dass Zellkulturüberstände von bestrahlten HNSCC-Zelllinien (UPCI-SCC-040) mit einer starken Seneszenzantwort eine signifikante Erhöhung ( $p<0,001$ ) des klonogenen Überlebens von HNSCC-Zelllinien mit einer endogen eher geringen Seneszenzantwort vermitteln (vgl. Abb.5B).

Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass radioresistente HNSCC-Zellen nach Bestrahlung Faktoren ins Medium freisetzen, die einen pro-proliferativen Effekt auf umliegende Zellen haben. Dieser Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden.





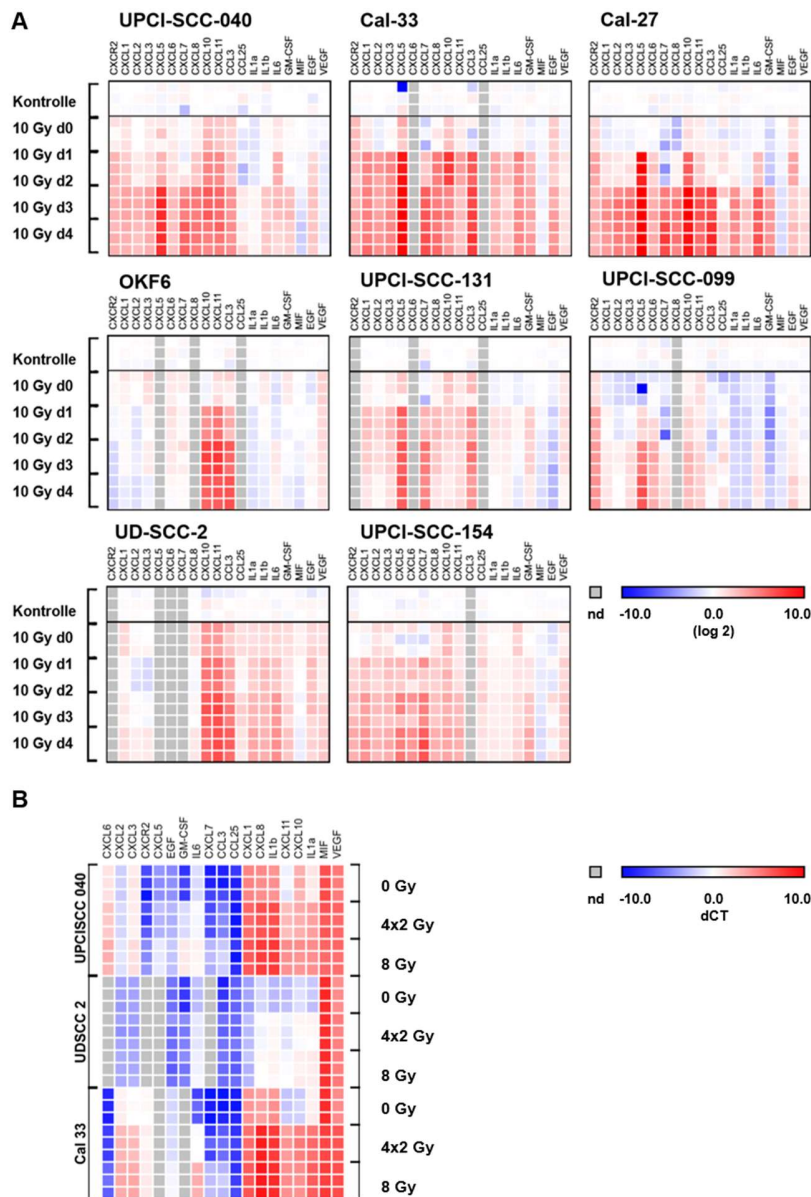
**Abb.5 Vorarbeiten:** **A:** Korrelationsstudie basierend auf der Hauptkomponentenanalyse von Radioresistenz und Seneszenz-Induktion: Hierbei wurden die Scores der ersten Hauptkomponente (PC) der Radioresistenz mit der ersten Hauptkomponente der Seneszenzinduktion zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert (Korrelationskoeffizient nach Pearson:  $R=0,59$ ,  $p=9,4 \times 10^{-4}$ ); **B:** Klonogenes Überleben nach Bestrahlung von Cal-27 Zellen welche mit Medienüberständen von bestrahlten (RT) und unbestrahlten (keine RT) UPCI-SCC-040 Zellen konditioniert wurden. Es wurden hierbei Dosen von 0 bis 8 Gy appliziert, drei unabhängige Wiederholungen wurden jeweils durchgeführt ( $p < 0,001$ ).

## 8.2 Resultate

Basierend auf der beobachteten Übertragbarkeit der Radioresistenz durch konditioniertes Medium von radioresistenten HNSCC-Zellen stellte sich die Frage, welche Mediatoren in diesen Überständen dafür verantwortlich sind. Da die mit DNA-Schaden verbundene Seneszenz bekanntermaßen mit der Sezernierung von Faktoren des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) einhergeht <sup>63</sup>, lag das primäre Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf der Analyse dieser Faktoren. Dafür wurden mehrere etablierte HNSCC-Zelllinien mit einer Dosis von 10 Gy bestrahlt und die Genexpression von verschiedenen, in der Literatur beschriebenen SASP-Faktoren <sup>43,64</sup> über die Zeit mittels qRT-PCR analysiert. Um die in Vorversuchen nachgewiesene erhöhte Koloniebildung nach dem Transfer von Zellkulturüberständen bestrahlter HNSCC-Zellen näher untersuchen zu können, fanden insbesondere Chemokine und Zytokine, welche erwiesenermaßen proliferativ auf Zellverbände wirken, Beachtung <sup>43</sup>.

Es zeigte sich für alle untersuchten HNSCC-Zelllinien im zeitlichen Verlauf ein Anstieg der Expression verschiedener SASP-Faktoren, jedoch mit unterschiedlichem Ausmaß. Die stärksten Effekte waren zwischen den Tagen zwei und vier zu beobachten (vgl. Abb.6A). Darüber hinaus konnten hinsichtlich des HPV-Status deutliche Unterschiede in der Genexpression der SASP-Faktoren detektiert werden: Während einige HPV-negative Tumorzelllinien eine starke Induktion entsprechender SASP-Faktoren zeigten (vgl. UPCI-SCC-040, Cal-33, Cal-27, Abb. 6A), war dieser Effekt bei HPV-positiven Tumorzelllinien deutlich schwächer ausgeprägt (vgl. UD-SCC-2, UPCI-SCC-154, Abb.6A), teilweise waren die beschriebenen Faktoren in der qRT-PCR nicht nachweisbar. Betrachtet man nun die identifizierten Faktoren etwas näher, so wird deutlich, dass ein Großteil dieser

Faktoren, beispielsweise CXCL1, CXCL3 und CXCL8, hinsichtlich ihrer Wirkweise mit einem spezifischen Chemokinrezeptor, dem CXCR2, assoziiert sind (vgl. Abb.6A, Abb.4). Zudem wurde jenseits einer einmaligen Bestrahlung mit 10 Gy die fraktionierte Radiatio *in vitro* simuliert, welche deutlich näher an der klinischen Situation einer, teilweise in über 33 Fraktionen verabreichten Gesamtstrahlendosis, liegt. Hierbei zeigte sich eine, verglichen mit der einmaligen Radiatio, vergleichbare Expression verschiedenster SASP-Faktoren bei fraktionierter Bestrahlung mit 4x2 Gy (Abb.6B). Zudem präsentierte sich analog zu den Ergebnissen der singulären Radiatio eine deutlich verminderte Genexpression von SASP-Faktoren durch die Applikation einer ionisierenden Bestrahlung, sei es fraktioniert oder als singuläre Verabreichung der Gesamtdosis von 8 Gy, in der HPV-positiven Tumorzelllinie (UD-SCC-2) (Abb.6B).

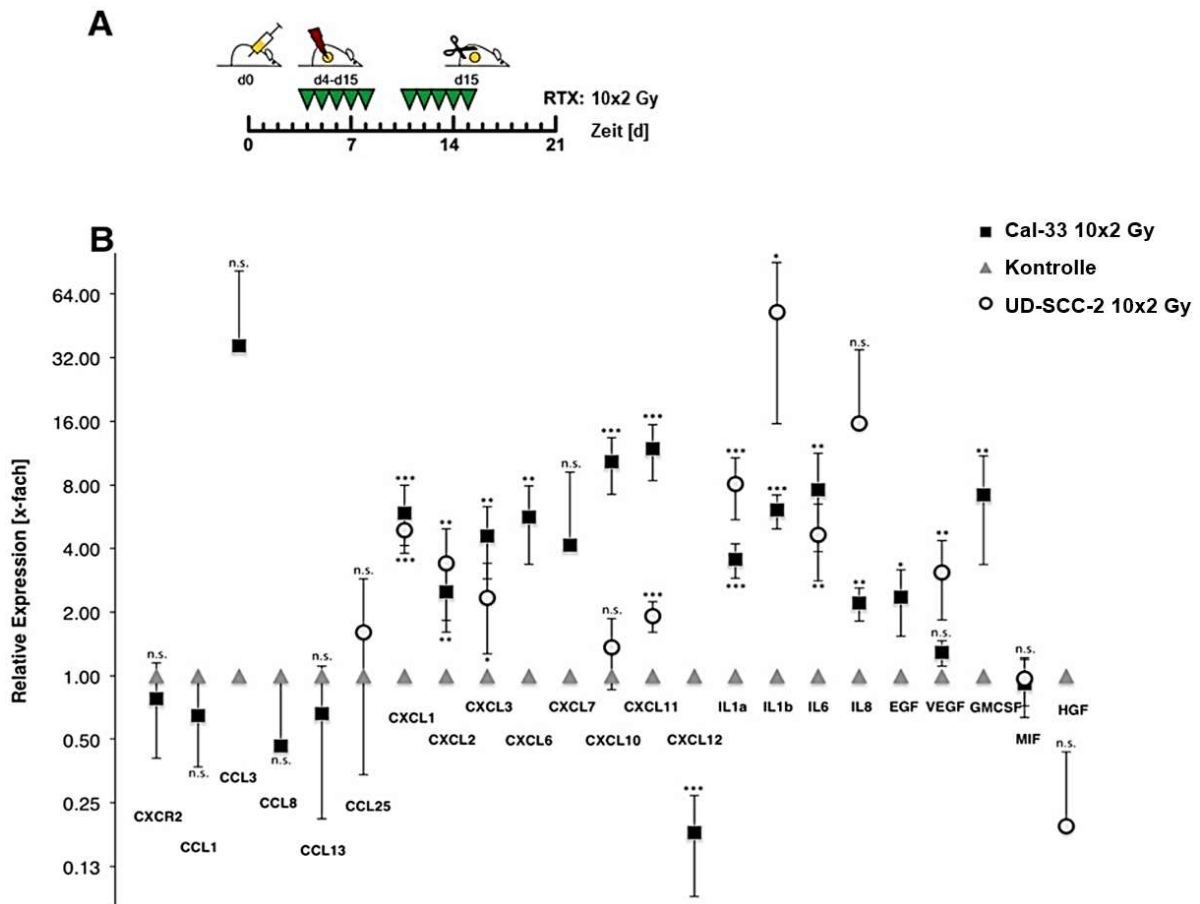


**Abb.6: Genexpressionsanalyse relevanter SASP-Faktoren nach Bestrahlung in vitro:**

Genexpressionslevel sind als Heatmap dargestellt und farblich markiert (blau: Niedrige Expression, rot: Hohe Expression, grau: Keine Detektierbarkeit des Zielgens mittels qRT-PCR). Alle Ergebnisse beziehen sich auf drei unabhängige Replikate. **A:** Normierung der Resultate auf die Housekeepermatrix (18s rRNA, b2M, ALAS) sowie Kalibrierung auf die unbehandelte Kontrolle, Kinetik der Genexpression in 5 HPV-negativen (UPCI-SCC-040, UPC-SCC-131, UPCI-SCC-099, Cal-27 und Cal-33) sowie 2 HPV-positiven HNSCC Zelllinien (UPCI-SCC-154, UD-SCC-2) als auch der Keratinozytenlinie OKF6. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und von d0 bis d4 nach Bestrahlung analysiert; **B:** Genexpression nach unterschiedlichen Bestrahlungsmodalitäten. Die Zelllinien UPCI-SCC-040, Cal-33 und UD-SCC-2 wurden einmalig mit 8 Gy oder fraktioniert mit 4x2 Gy an Tag 0 des Experiments bestrahlt. Die Analyse erfolgte 4 Tage nach Bestrahlung. Darstellung der dCT-Werte, keine Kalibrierung.

Obwohl die erhobenen *In-vitro*-Daten eine deutliche Induktion der Expression von SASP-Faktoren nach Bestrahlung und gleichzeitig deren Abhängigkeit vom HPV-Status nahelegten, simuliert die Zellkultur letztlich nur ein vereinfachtes Tumormodell. Daher bestand der nächste Schritt zur Evaluierung der SASP-Ausprägung nach Bestrahlung in dessen Untersuchung unter *In-vivo*-Bedingungen. Hierzu wurden heterotope Xenotransplantate einer HPV-positiven (UD-SCC-2) und einer HPV-negativen Tumorzelllinie (Cal-33) in athymischen Nacktmäusen verwendet. Bevor ein Tumolvolumen von 100mm<sup>3</sup> erreicht wurde, der zeitliche Rahmen variierte hierbei zwischen drei und fünf Tagen nach Inokulation, erfolgte unter Ausschluss einer gleich beschaffenen Kontrollgruppe die fraktionierte Bestrahlung mit 10x2 Gy (vgl. Abb.2A). Entgegen der einmaligen Bestrahlung mit 10 Gy unter *In-vitro*-Bedingungen, sollte hier die klinische Situation einer fraktionierten Bestrahlung bestmöglich simuliert werden. Die Tumore wurden an Tag 15 des Experiments explantiert, die Expression von SASP-Faktoren wurde anschließend durch qRT-PCR analysiert (vgl. Abb.7B).

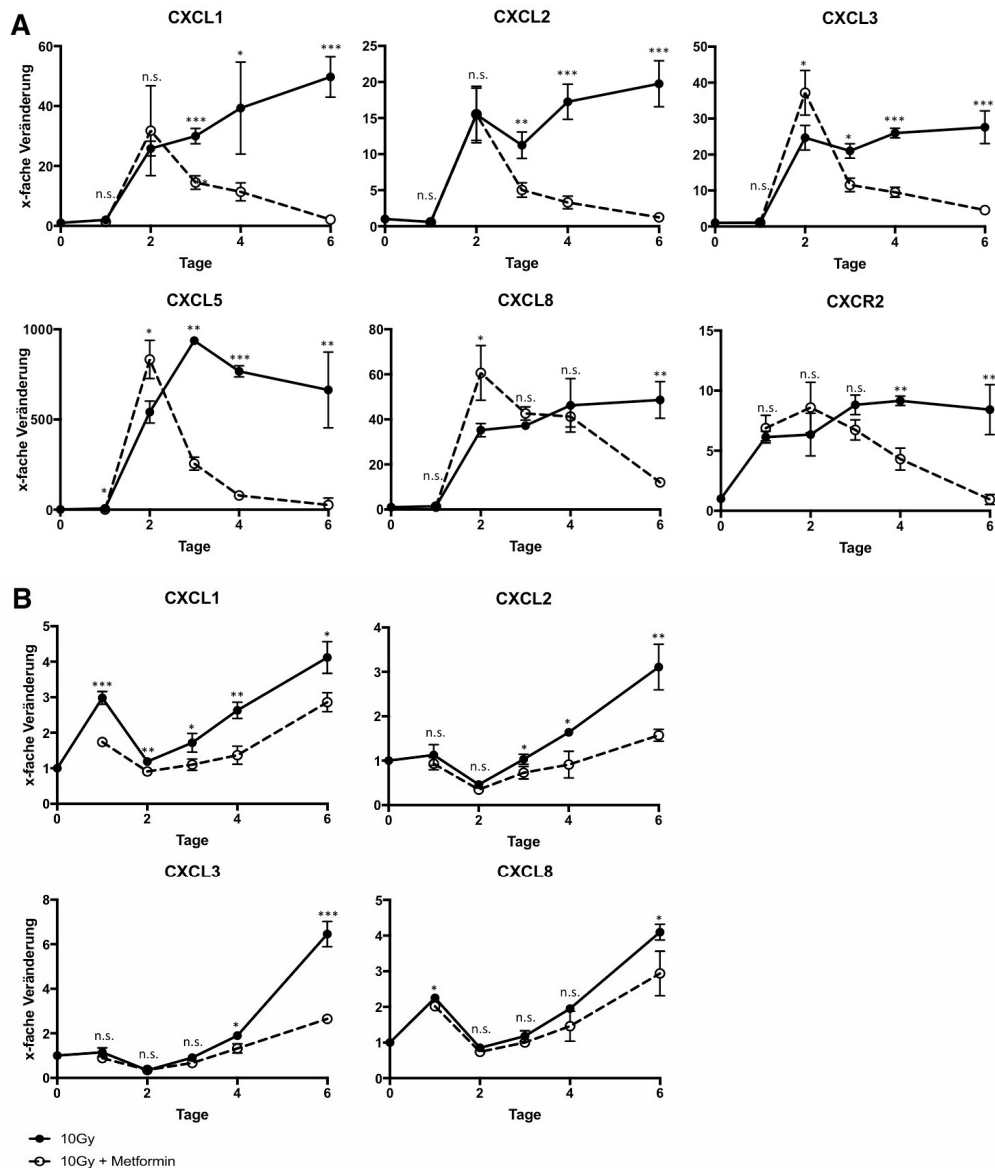
Ähnlich zu den *In-vitro*-Versuchen zeigten beide HNSCC-Zelllinien eine SASP-Induktion nach Bestrahlung, wiederum mit unterschiedlichem Ausmaß. Im Falle der HPV-negativen Zellen waren auch *in vivo* meist höhere Expressionswerte auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den HPV-positiven Tumorzellen zu beobachten. Während nach einmaliger Bestrahlung mit 10 Gy *in vitro* für bestimmte SASP-Faktoren, beispielsweise für CXCL5, CXCL8 oder CXCL10, Expressionswerte von weit über dem hundertfachen der ursprünglichen Ausgangswerte gemessen werden konnten (vgl. Abb.6A), wurden bei fraktionierter Bestrahlung *in vivo* deutlich geringere Anstiege der Genexpressionen verzeichnet (vgl. Abb.7B).



**Abb.7: Genexpressionsanalyse relevanter SASP-Faktoren nach Bestrahlung in vivo:**  
**A:** Piktogramm des Xenograftmodells in der Maus; Inokulation von humanen HPV-negativen (Cal-33) und HPV-positiven (UD-SCC-2) HNSCC-Zellen an d0. Die Behandlung startete sobald ein Tumolvolumen von 100mm<sup>3</sup> erreicht wurde (Tag 3 bis 5 nach Inokulation). Nach fraktionierter Radiatio (10x2 Gy, zweitägige Bestrahlungspause nach 5x2 Gy) erfolgte die Explantation der Tumore am letzten Tag der Behandlung (d14-16); **B:** SASP-Induktion nach Bestrahlung mit 10x2 Gy relativ zur unbestrahlten Kontrolle in HNSCC-Tumoren in vivo. Alle Ergebnisse beziehen sich auf fünf Versuchstiere pro Behandlungsgruppe. Die Quantifizierung erfolgte anhand der ddCT-Methode, für die Normalisierung wurde sich einer Housekeepermatrix (18s rRNA, b2M, ALAS) bedient. Die Kalibrierung erfolgte auf die unbestrahlten Kontrollen der jeweiligen Zelllinie. Signifikanzangaben im Diagramm: n.s. = nicht signifikant; \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Nachdem die Induktion des SASP sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Ausprägung des SASP nach Bestrahlung pharmakologisch inhibiert werden kann. Diese Fragestellung ist nicht nur zum mechanistischen Verständnis des SASP interessant, vielmehr ist sie auch aus klinischer Perspektive von Bedeutung,

da dem SASP neben tumorsuppressiven <sup>65</sup> auch deutliche tumorsupportive Eigenschaften zugeordnet werden <sup>43</sup>. Bezüglich einer Blockierung des SASP kommen verschiedene Strategien in Frage. So könnten mit Hilfe von RNA-Interferenz-Ansätzen einzelne Komponenten gezielt blockiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings ein breiterer, weniger spezifischer aber pleiotroper Ansatz gewählt: Das klinisch jahrzehntelang als Antidiabetikum in der Klinik eingesetzte Medikament Metformin, das u.a. über die Blockade des NF-kappaB-Signalweges die Genexpression verschiedener SASP-Faktoren inhibiert <sup>66</sup>. *In vitro* konnte durch Zugabe von 5 mM Metformin in HPV-negativen HNSCC-Zellen eine deutliche Reduktion der Expression der SASP-Faktoren nach Bestrahlung mit 10 Gy erzielt werden (vgl. Abb.8A). Insbesondere die Induktion der CXCR2 Liganden CXCL1-3, CXCL5 und CXCL8 nach Bestrahlung wurde durch Metformin-Zugabe signifikant reduziert. Zudem war die Induktion von CXCR2 nach Bestrahlung in Gegenwart von Metformin deutlich reduziert (vgl. Abb.8A). In Anlehnung an die *In-vitro*-Experimente in HPV-negativen HNSCC-Zelllinien (Cal-33), wurden vergleichbare Versuche auch in HPV-positiven HNSCC-Tumorzellen (UD-SCC-2) durchgeführt. Auch hier ist die SASP-blockierende Wirkung von Metformin deutlich erkennbar, jedoch fällt die absolute SASP-Induktion und das Ausmaß der Inhibition durch Metformin deutlich geringer aus als im Fall der HPV-negativen Zellen (vgl. Abb.8A/B). Darüber hinaus lag die Expression verschiedener SASP-Faktoren als auch des CXCR2 in diesen Zellen unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

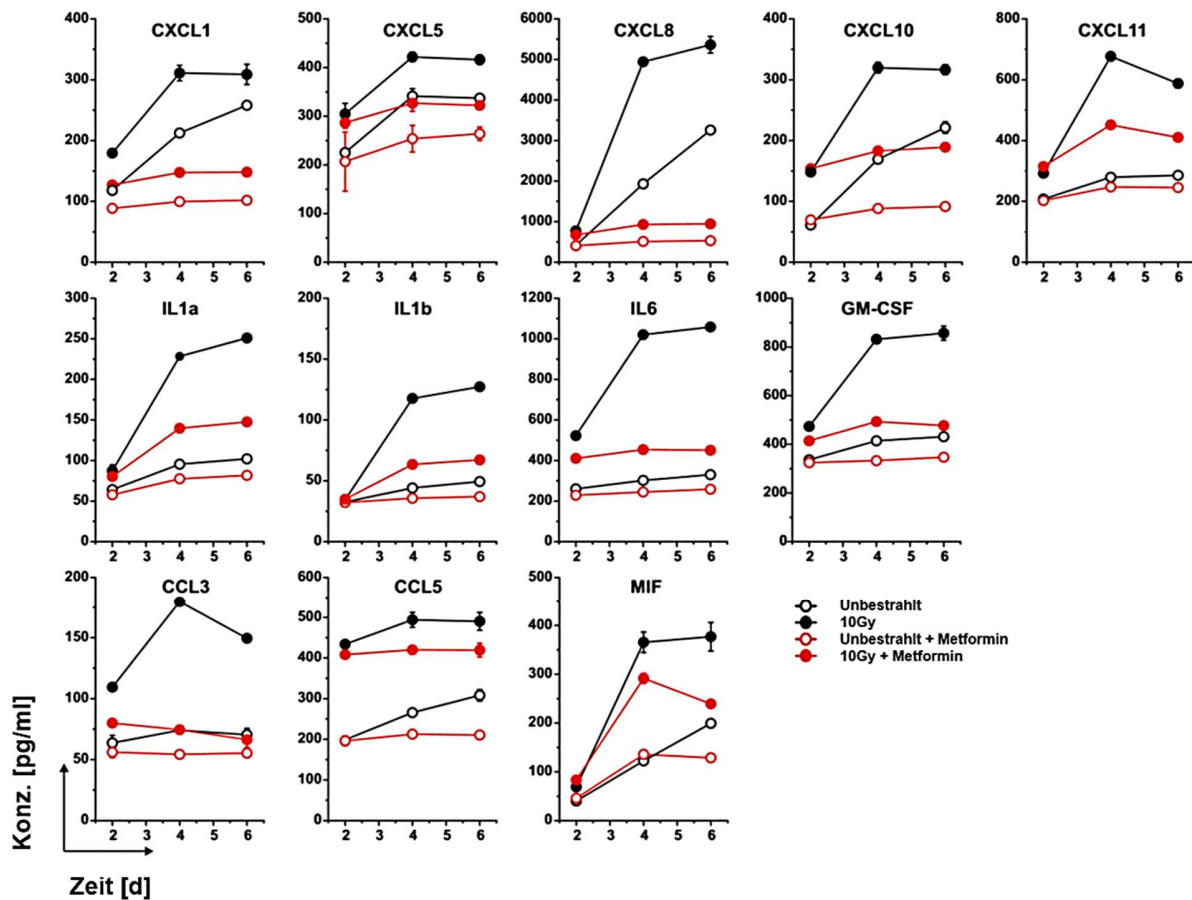


**Abb. 8: Genexpression relevanter SASP-Faktoren nach Bestrahlung und Metformingabe in vitro:**

Die HNSCC Zellen wurden an d0 mit 10 Gy bestrahlt oder zusätzlich mit 5 mM Metformin vor Bestrahlung behandelt. Die zeitaufgelöste Analyse erfolgte an Tag 0,1,2,3,4 und 6 nach Bestrahlung. Alle Ergebnisse beziehen sich auf drei unabhängige Replikate. Die Quantifizierung und Normalisierung erfolgte anhand der ddCT-Methode mit einer Housekeepermatrix (18s rRNA, b2M, ALAS), gefolgt von einer Kalibrierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, DMSO). **A:** Zielgenspezifische signifikante Reduktion der Genexpression relevanter Zytokine in einer HPV-negativen Tumorzelllinie (Cal-33) durch die simultane Metforminapplikation im zeitlichen Verlauf; **B:** Signifikant veränderte Expressionslevel relevanter Zytokine in einer HPV-positiven Tumorzelllinie (UD-SCC-2) durch die simultane Metforminapplikation im zeitlichen Verlauf; n.s. = nicht signifikant, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



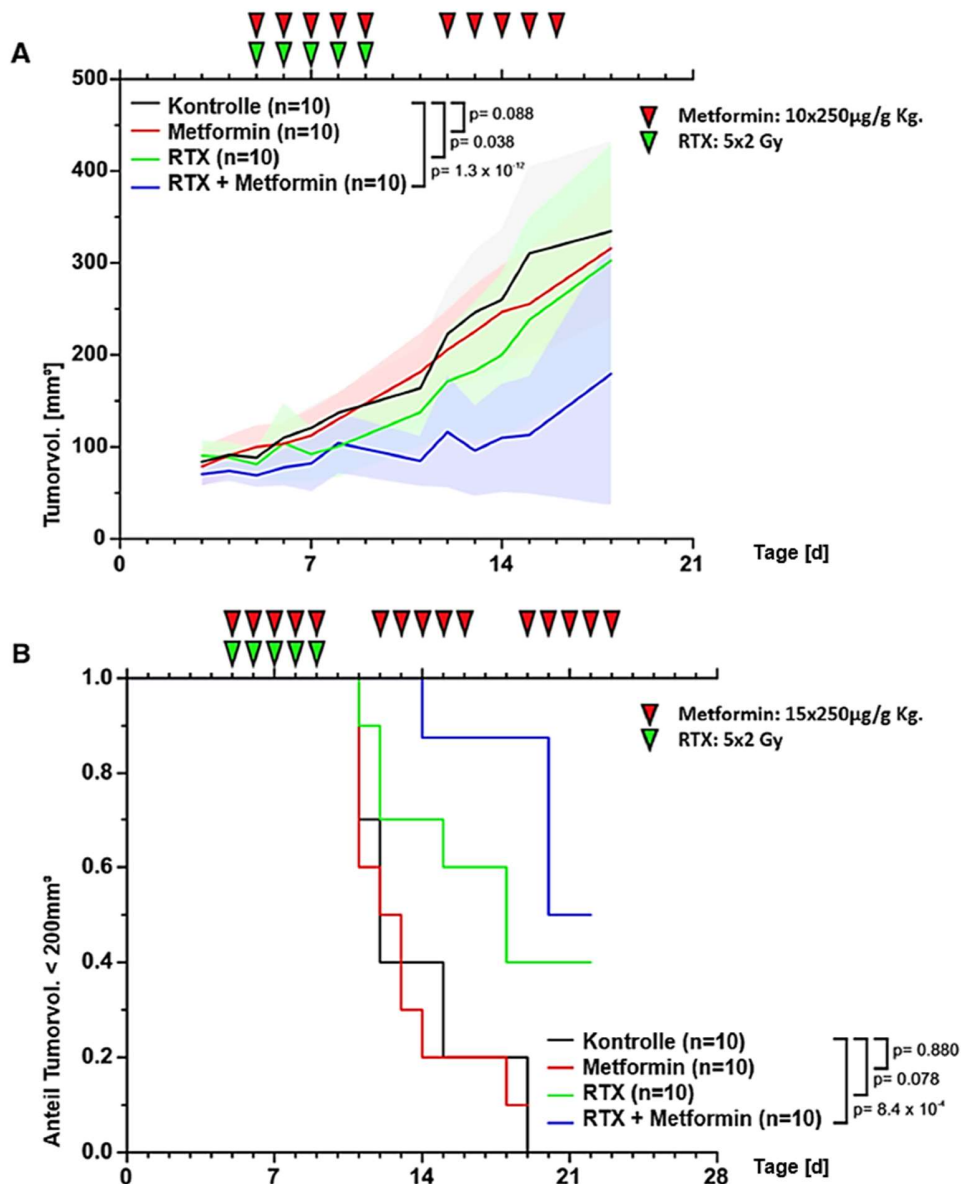
Da die Genexpression auf mRNA-Ebene nur bedingte Aussagen über die Proteinmenge der sezernierten SASP-Faktoren zulässt, wurde diese im nächsten Schritt anhand von Multiplex-ELISA-Messungen bestimmt (in Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Charité Berlin). Ähnlich zu den bisherigen *In-vitro*-Experimenten wurde die Evaluation in HPV-negativen und HPV-positiven Plattenepithelkarzinomzellen im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung mit 10 Gy in An- oder Abwesenheit von 5 mM Metformin durchgeführt. Auf Sekretomebene konnte die auf mRNA-Ebene beobachtete Induktion der Expression von SASP-Faktoren zwischen Tag zwei und vier post Radiatio bestätigt werden – mit unterschiedlicher Intensität (vgl. Abb.9). Zudem zeigten diverse CXCR2-Liganden, wie beispielsweise CXCL1, CXCL5, CXCL8 oder CXCL10, verminderte Proteinspiegel post Radiatio in Anwesenheit von Metformin (vgl. Abb.9).



**Abb.9: In-vitro-Analyse der strahleninduzierten Proteinsekretion relevanter SASP-Faktoren mit und ohne Inhibition durch Metformin:** Die HPV-negativen Plattenepithelkarzinomzellen (UPCI-SCC-040) wurden nach 0 Gy oder 10 Gy Bestrahlung mit 5 mM Metformin bzw. derselben Menge Lösungsmittel (DMSO) behandelt. Im zeitlichen Verlauf über 6 Tage wurde die Freisetzung der Proteine ins Medium mittels Multiplex-ELISA gemessen. Einzelne Messpunkte repräsentieren drei unabhängige Replikate mit Angabe der Standardabweichung.

Nachdem die Metformin-Zugabe *in vitro* in einer deutlich verminderten Expression von SASP-Faktoren, insbesondere auf Sekretom-Ebene, resultierte (vgl. Abb.9) und dem SASP unter anderem tumorsupportive Eigenschaften zugesprochen werden <sup>43</sup>, stellte sich nun die Frage, ob die Applikation von Metformin den therapeutischen Erfolg einer Bestrahlung *in vivo* verstärken kann.

Analog zu bisher durchgeführten Xenograft-Experimenten in der Maus wurden Cal-33 Zellen heterotop auf Nacktmäuse transplantiert. Die Tiere wurden randomisiert vier Behandlungsgruppen zugeordnet: Bestrahlung (5x2 Gy), Behandlung mit Metformin (täglich je 250 µg/g Körpergewicht), Bestrahlung plus Metformin und eine Vehikel-behandelte Kontrollgruppe. Primäre Endpunkte waren der zeitliche Verlauf des Tumorzvolumens und die Zeit bis zum Erreichen eines Tumorzvolumens von >200 mm<sup>3</sup>. Erwartungsgemäß zeigte die Bestrahlung der Tumore eine signifikante Hemmung des Tumorzwachstums, während die Applikation von Metformin als Einzeltherapie keinen relevanten Effekt erzielte (vgl. Abb.10). Wurde jedoch die Verabreichung von Metformin mit einer simultanen Radiatio kombiniert, so zeigte sich eine deutlich stärkere Hemmung des Tumorzwachstums über die Zeit des *Follow-ups* gegenüber der entsprechenden unbehandelten Kontrolle (vgl. Abb.10).



**Abb.10: Radiosensibilisierung von Tumoren humaner HPV-neg. HNSCC-Zellen (Cal-33) im Xenograftmodell der Maus: A:** Evaluation der Tumorumfängen nach unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten; nach Inokulation im Bestrahlungsarm (RTX) und Tumor Engraftment Applikation einer fraktionierten Bestrahlung (5 Behandlungstage mit jeweils 2 Gy) sowie im Falle der Applikation eines SASP-Inhibitors Gabe von Metformin (250 µg/g Körpergewicht, 10 Behandlungstage mit einer zweitägigen mittleren Behandlungspause); Darstellung der Mittelwerte der Tumorumfänge als Kurven (n=10 je Behandlungsgruppe), die farblich gefüllte Fläche zeigt das 95% Konfidenzintervall; **B:** Darstellung des Anteils der Versuchstiere je Behandlungsmodalität mit einem Tumorumfang <200mm<sup>3</sup>. Nach Inokulation im Bestrahlungsarm (RTX) Applikation einer fraktionierten Bestrahlung (5 Behandlungstage mit jeweils 2 Gy) sowie im Falle der Applikation eines SASP-Inhibitors Gabe von Metformin (250 µg/g Körpergewicht, 15 Behandlungstage mit zweitägigen Behandlungspausen nach je 5 Tagen).

Abschließend sollte in einer retrospektiven Analyse überprüft werden, ob es einen prognostischen Zusammenhang zwischen der Expression von SASP-Faktoren bzw. deren Rezeptoren und dem klinischen Verlauf von HNSCC-Tumoren nach adjuvanter Bestrahlung gibt. Im Rahmen der klinischen Kooperationsgruppe (KKG) "Personalisierte Radiotherapie von Kopf-Hals-Tumoren" wurde Paraffinmaterial von primär resezierten HNSCC-Tumoren gesammelt. Neben der umfangreichen Charakterisierung der individuellen Patienten, beispielsweise hinsichtlich etwaiger Noxen oder des HPV-Status, wurde der klinische Verlauf retrospektiv analysiert. Die HNSCC-Tumore der 86 Patienten zeichneten sich durch unterschiedliche Tumorlokalisationen aus: So wurde bei 45 Patienten ein Oropharynxkarzinom, bei 14 Patienten ein Hypopharynxkarzinom, bei 8 Patienten ein Larynxkarzinom sowie bei 19 Patienten ein Mundhöhlenkarzinom, diagnostiziert (vgl. Abb.11A). Das Geschlechterverhältnis lag bei 58:28 (männlich:weiblich), ca. 24% der Tumore waren HPV-positiv (vgl. Abb.11A).

In Kooperation mit dem HMGU (Neuherberg) wurde aus den Tumor-Paraffin-Proben RNA extrahiert und revers transkribiert. Die so generierte cDNA wurde in qRT-PCR-Analysen für verschiedene SASP-Faktoren sowie für den Rezeptor (CXCR2) eingesetzt. Belastbare Ergebnisse konnten nur für CXCR2 erzielt werden, da die Expressionsspiegel der Liganden oftmals an bzw. unter der Nachweisgrenze lagen. Die Verteilung der CXCR2-mRNA-Expressionswerte ist in Abbildung 11B dargestellt. Tendenziell höhere Werte waren in HPV-negativen Tumoren zu beobachten, dies erreichte jedoch bei Weitem keine statistische Signifikanz.

Zunächst wurde mittels qRT-PCR die Expression des CXCR2 evaluiert, es wurde zur Unterscheidung zwischen Über- und Unterexpression ein medianer *Cutoff* gewählt. Die

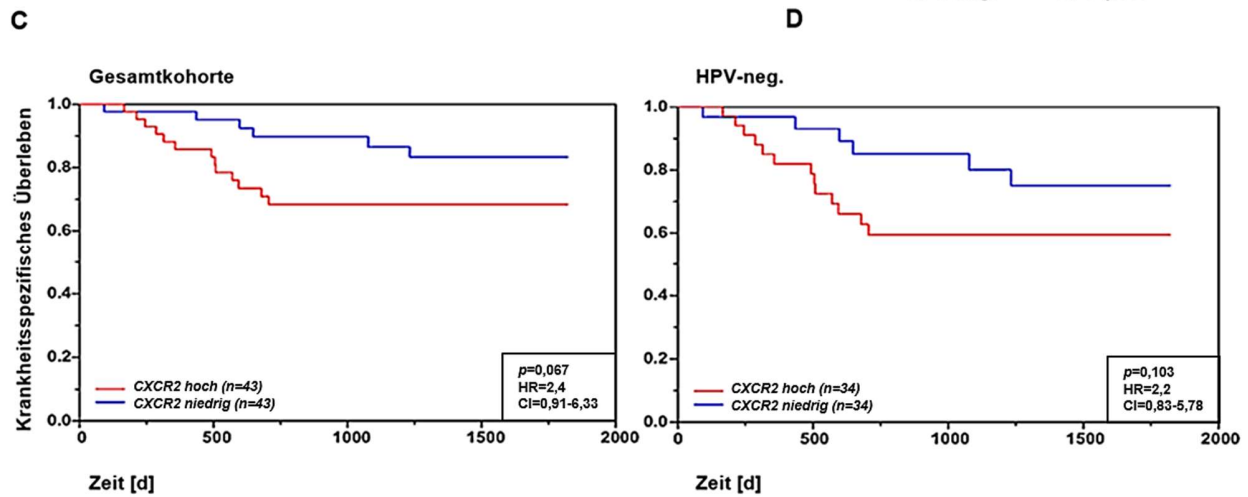
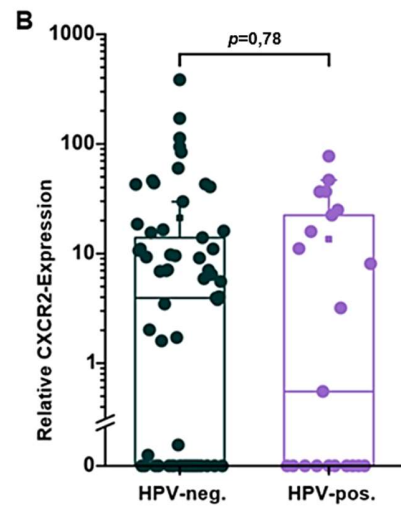
dabei erhobenen Daten wurden anschließend in Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben des jeweiligen Patienten gebracht.

Betrachtet man zunächst die gesamte Kohorte, so zeigt sich ein Überlebensnachteil im Falle einer Überexpression von CXCR2 im HNSCC (vgl. Abb.11C). Während bei einer Überexpression von CXCR2 ein Fünfjahresüberleben von unter 70% zu verzeichnen war, korrelierte die verminderte Expression des Chemokinrezeptors auf mRNA-Ebene mit einem deutlich verbesserten krankheitsspezifischen Fünfjahresüberleben (vgl. Abb.11C).

In der Subgruppenanalyse am HPV-negativen Teilkollektiv der HNSCC-Kohorte konnten die Beobachtungen der Gesamtkohorte bestätigt werden: Hier zeigt sich ein beeindruckender Unterschied im krankheitsspezifischen Fünfjahresüberleben in Abhängigkeit von der CXCR2-Genexpression (vgl. Abb.11D). Da jedoch sowohl für das Gesamtkollektiv als auch für die Subgruppenanalyse am HPV-negativen Teilkollektiv relativ geringe Fallzahlen inkludiert wurden, kann statisch keine Signifikanz attestiert werden, viel eher kann jedoch ein deutlicher Trend beobachtet werden.

**A**

Patientencharakteristik der Kohorte		n	%
Anzahl der Patienten		86	100
Alter bei Diagnosestellung		Median	Bandbreite
		62	20-84
Geschlecht	welblich	28	33
	männlich	58	67
Lokalisation des Primarius	Hypopharynx	14	16
	Larynx	8	9
	Mundhöhle	19	22
	Oropharynx	45	52
UICC-Stadium	I	1	1
	II	8	9
	III	24	28
	IV	53	62
HPV-Status (p16/HPV-DNA)	negativ	65	76
	positiv	21	24
Kombinierte Radiochemotherapie	ja	57	66
	nein	29	34



**Abb.11: Klinische Relevanz des CXCR2 in einer HNSCC-Patientenkohorte:** **A:** Klinische Parameter der Patientenkohorte aus adjuvant therapierten HNSCC-Patienten (n=86); **B:** Boxplot zur relativen Genexpression von CXCR2 in HPV-negativen (n=65) und HPV-positiven (n=21) Tumoren. Die Quantifizierung erfolgte über qRT-PCR aus FFPE-Tumormaterial. Technische Triplikate wurden normalisiert auf eine Housekeepermatrix (18s rRNA, Beta-Actin) und die relative Genexpression nach Standardkurvenmethode berechnet; p-Werte wurden unter Anwendung des zweiseitigen Wilcoxon-Rank-Test berechnet; **C:** Kaplan-Meier-Analyse des krankheitsspezifischen Überlebens; zur Dichotomisierung der Gesamtkohorte (n=86) wurde als Cutoff der Median der CXCR2-Genexpression gesetzt; p-Werte wurden unter Zuhilfenahme des Log-Rank-Tests berechnet, das Konfidenzintervall (CI) als auch die Hazard Ratio (HR) sind angeführt: p=0,067, HR=2,4, CI=0,91-6,33; **D:** Kaplan-Meier-Analyse des krankheitsspezifischen Überlebens in der Subgruppe mit negativem HPV-Status (n=65), analog zu der Auswertung aus 11C, p=0,103, HR=2,2, CI=0,83-5,78.

## 9 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des SASP im Fokus der Radioresistenz im HNSCC analysiert. Hierbei konnte *in vitro* wie auch *in vivo* eine deutliche Induktion verschiedenster SASP-Faktoren nach ionisierender Bestrahlung auf Genexpressions- wie auch Proteinebene gezeigt werden. Abhängig vom HPV-Status waren signifikant veränderte Ausprägungsmuster des SASP in der Zellkultur wie auch im Xenograftmodell der Maus auffällig. Aufgrund der induzierten SASP-Ausprägung nach ionisierender Bestrahlung und der in Vorexperimenten gezeigten Assoziation zwischen zellulärer Seneszenz und Radioresistenz, wurde sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* die Inhibition des SASP angestrebt. Diesbezüglich zeigte sich Metformin, ursprünglich jahrzehntelang als Antidiabetikum in klinischer Anwendung, als potenter SASP-Inhibitor mit vielversprechendem therapeutischen Potential. Mechanistisch wurde zudem die Expression des Chemokinrezeptors CXCR2 mit dem krankheitsspezifischen Überleben in einer HNSCC-Patientenkohorte korreliert, wobei sich ein deutlich negativer Trend im Patienten-*Outcome* bei Überexpression von CXCR2 zeigte.

### 9.1 SASP und Seneszenz: Einfluss auf die Radioresistenz im HNSCC

Die Radioresistenz ist ein essentielles Problem in der Tumortherapie. Aktuell findet sich jenseits des HPV-Status kein verlässlicher Marker zur Prädiktion der individuellen Radiosensibilität im HNSCC <sup>50</sup>. Selbstverständlich liegt deshalb ein fundamentales



Interesse der strahlenbiologischen Forschung an der Identifikation und Adaptation von Radioresistenzmechanismen im HNSCC.

Neu ist hierbei, eine Assoziation der Radioresistenz mit der Ausschüttung verschiedenster Faktoren nach ionisierender Bestrahlung, zusammengefasst als SASP, zu untersuchen.

Die Rolle des SASP in der Genese von Malignomen, insbesondere im Hinblick auf Tumorzellproliferation und –inhibition, ist nicht umfassend geklärt und bleibt Gegenstand mehrerer Studien und wissenschaftlicher Arbeiten. Die Datenlage zum SASP in der Tumorgenese sowie Therapieresistenz ist kontrovers. So beschrieben etwa Kuilman und Kollegen eine deutlich induzierte Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 8 (IL8), im Falle einer durch onkogene Mechanismen hervorgerufener Seneszenz <sup>48</sup>. Dabei wies IL6 gleichwohl tumorsupportive Eigenschaften, wie z.B. ein deutliches pro-mitotisches Potential auf. Auf der anderen Seite jedoch verfügt IL6 auch über anti-tumorigene Eigenschaften wie beispielsweise die Induktion der Onkogen-induzierten-Seneszenz, welche Zellproliferation und damit verbunden die Tumorprogression limitiert <sup>48</sup>.

In diesem Kontext versuchten wir anhand der vorliegenden Arbeit die Rolle des SASP und der darin inkludierten Faktoren im Hinblick auf die Radioresistenz von Kopf-Hals-Tumoren intensiver zu untersuchen. Hierbei konnten Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine des SASP als proliferationsbegünstigende sowie letztlich auch therapierelevante Faktoren *in vitro* wie auch *in vivo* im HNSCC identifiziert werden. Vor allem in Zelllinien bzw. Tumoren mit positivem HPV-Status war deren Expression im Vergleich zu HPV-positiven HNSCCs deutlich vermindert. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits durch Guerrero und Kollegen an Serumproben von HNSCC-Patienten

publiziert: Hierbei präsentierten Tumorpatienten mit positivem HPV-Status (HPV-16), analog zu den hier vorliegenden Ergebnissen aus *In-vivo*- und *In-vitro*-Experimenten, deutlich verminderte Serumproteinspiegel von IL6, verglichen mit denen der HPV-negativen Pendanten<sup>67</sup>. Diese Beobachtung spielt vor allem therapeutisch eine beachtenswerte Rolle, da HPV-positive HNSCCs bekanntermaßen ein deutlich besseres Ansprechen auf eine Radio- bzw. Radiochemotherapie im Vergleich zu deren Korrelaten ohne Nachweis einer Hochrisiko-HPV-Infektion präsentieren<sup>18</sup>. Prognostisch konnte dies bereits beispielhaft an IL6 als beschriebene SASP-Komponente aufgezeigt werden: Die erhöhte Expression von IL6 im Primärtumor von HNSCC Patienten wurde diesbezüglich an verschiedenen Patientenkohorten mit einem signifikant verminderten Gesamtüberleben sowie einer induzierten Radio- sowie Radiochemotherapieresistenz korreliert<sup>68 69</sup>.

## **9.2 CXCR2 und Liganden – Bedeutung bei Malignomen**

Chemokine spielen in der Tumorentstehung sowie im Wachstum von Malignomen im allgemeinen eine entscheidende Rolle<sup>70</sup>. Sie sind letztlich essentiell an der Angiogenese oder der Leukozyteninfiltration beteiligt. Besondere Bedeutung haben bei der Entstehung verschiedener Tumoren der Chemokinrezeptor CXCR2 sowie seine Liganden, beispielsweise CXCL1, 3, 5, IL6 und IL8, erlangt. Im Prostatakarzinom wurde diesbezüglich eine CXCR2-Überexpression im malignen Gewebe beschrieben, zudem präsentierten CXCR2-defiziente Mäuse deutlich kleinere Tumore, verglichen mit dem Wildtyp<sup>71</sup>. Im malignen Melanom wurde zudem gezeigt, dass eine Überexpression der CXCR2-Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL3 die Tumorentstehung begünstigt<sup>72</sup>. IL8

(CXCL8) war in dieser Tumorentität verstärkt exprimiert, wobei sich eine deutliche Korrelation zwischen der IL8-Überexpression und einer hämatogenen Metastasierung des malignen Melanoms ergab <sup>73</sup>. Auch im HNSCC konnte die Bedeutung von IL8 und dessen Rezeptor belegt werden. In Schleimhautbiopsaten von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinom war IL8 und der korrespondierende Chemokinrezeptor CXCR2 im Vergleich zu den Kontrollbiopsaten deutlich erhöht <sup>74</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Expression verschiedener Chemokine und Chemokinrezeptoren im HNSCC analysiert. Neben der deutlichen Induktion entsprechender Faktoren nach ionisierender Bestrahlung wurden Unterschiede in Bezug auf den HPV-Status der untersuchten HNSCC-Linien deutlich (vgl. Abb.6): Vor allem bei HPV-negativen Varianten im HNSCC war die Genexpression entsprechender Chemokine und Zytokine nach Bestrahlung induziert, während HPV-positive HNSCCs eine deutlich geringere Ausprägung zeigten. In diesem Zusammenhang spielt vor allem der Chemokinrezeptor CXCR2 eine wichtige Rolle, da ein Großteil der erhöhten Faktoren über diesen Rezeptor auf die jeweiligen Zielzellen wirkt (vgl. Abb.4).

Dass jenseits der bindenden Liganden der Chemokinrezeptor CXCR2 selbst als prognoserelevanter Faktor erscheint, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Genexpressionsanalysen an einer Kohorte von HNSCC-Patienten gezeigt werden: Hierbei korrelierte die CXCR2-Überexpression mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben, mit deutlichen Unterschieden in Abhängigkeit des HPV-Status: Während in HPV-negativen HNSCCs die Überexpression von CXCR2 mit einem eingeschränkten krankheitsfreien Überleben einhergeht, konnte bei positivem HPV-Status keine eindeutige Aussage getroffen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der doch recht geringen

Fallzahlen (n=86) in der gezeigten Patientenkohorte, konnte sowohl für die Gesamtkohorte, als auch in der Subgruppenanalyse bei negativem HPV-Status, keine signifikante Aussage zur prognostischen Relevanz von CXCR2 getroffen werden.

Obwohl bisher nur wenige Daten zu CXCR2 als prognostisch bedeutsamen Faktor im HNSCC vorliegen, konnte dessen Bedeutung im Larynxkarzinom bereits belegt werden: Eine Überexpression von CXCR2 wurde hierbei mit einem höheren lymphogenen Metastasierungsrisiko, einem deutlich fortgeschrittenen Tumorstadium sowie letztlich auch mit verkürztem Gesamtüberleben korreliert <sup>75</sup>.

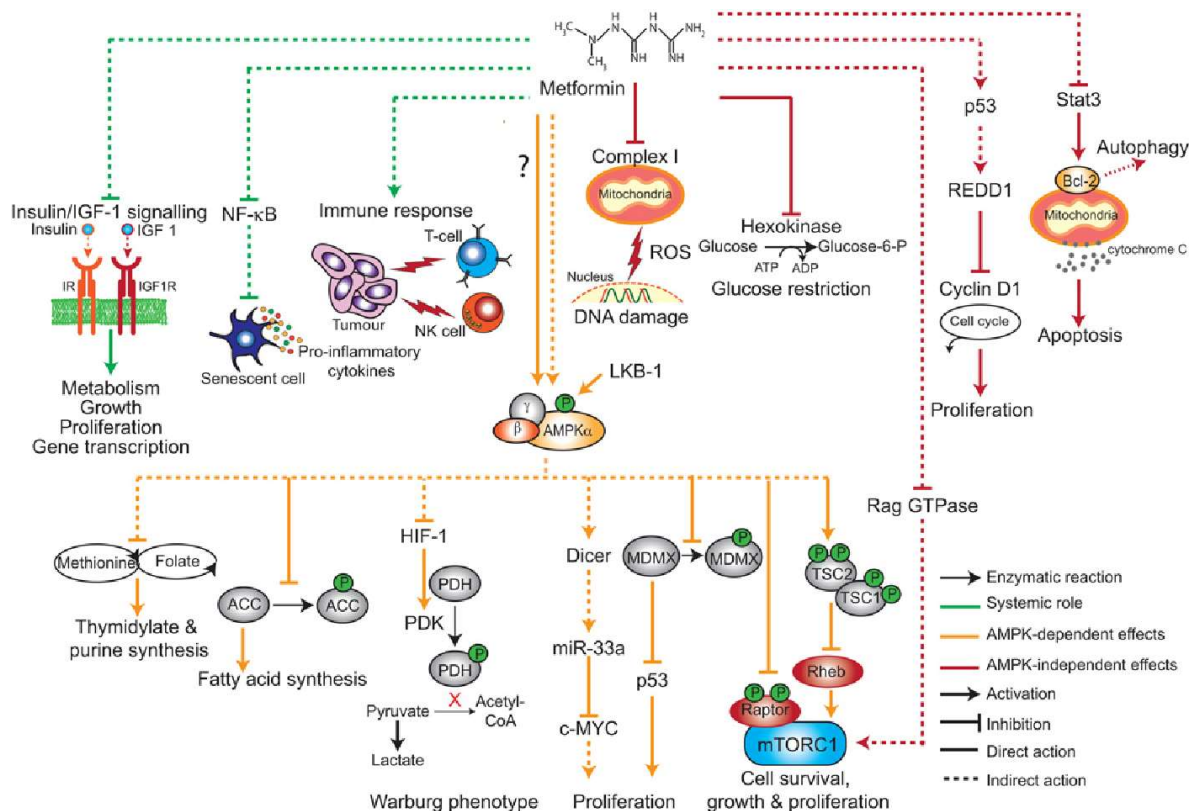
### **9.3 Metformin: Therapeutische Überlegungen im Malignom**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits vielfältige, prognostisch unerwünschte Aspekte dem SASP attribuiert werden. Daher erscheint es unumgänglich, nach Optionen der therapeutischen SASP-Inhibition zu suchen. Hierbei bieten sich unterschiedlichste Ansätze, beispielsweise der Einsatz neutralisierender Antikörper oder auch siRNA-Oligonukleotiden, die mit SASP-Faktoren interferieren, therapeutisch an. Klinisch ist dies jedoch relativ komplex, da letztlich nach Generierung einer klinisch sicher anwendbaren Substanz umfangreiche, z.T. mehrjährige Zulassungsstudien durchlaufen werden müssen. Somit ist die routinemäßige Anwendung von siRNAs derzeit noch keine therapeutische Option.

Allerdings rücken aktuell wieder klinisch bereits etablierte Substanzen, welche in einem neuen Kontext Verwendung finden könnten, in den Fokus der translationalen Forschung. In diesem Zusammenhang konnten Moiseeva und Kollegen das über Jahrzehnte eingesetzte Antidiabetikum Metformin als potenten SASP-Inhibitor identifizieren <sup>66</sup>.

Metformin zählt als orales Antidiabetikum zur Klasse der Biguanide und ist eines der am häufigsten verordneten Präparate zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. Während der Wirkmechanismus von Metformin lange Zeit unklar war, wird heute angenommen, dass ein Großteil der blutzuckersenkenden Wirkung auf einer Hemmung der hepatischen Adenylylcyclase und der hieraus resultierenden verminderten hepatischen Glukoneogenese basiert <sup>76,77</sup>.

Jenseits der Indikation als blutzuckersenkende Therapie hat Metformin in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit als potentiell tumorsuppressives Medikament, beispielsweise im Prostatakarzinom oder im triple-negativen Mammakarzinom <sup>78,79</sup>, erlangt: So konnte die Interaktion von Metformin mit verschiedenen Signalwegen aus DNA-Schadensantwort, Zellwachstum und Zellproliferation sowie Apoptoseregulation gezeigt werden (vgl. Abb.12) <sup>80</sup>. Auch beim HNSCC wurde die Einnahme von Metformin und die daraus resultierenden, antineoplastisch agierenden Mechanismen, untersucht. So fanden Rêgo und Kollegen bei HNSCC-Patienten unter Einnahme von Metformin ein niedrigeres Metastasierungsrisiko sowie ein deutlich längeres krankheitsfreies Überleben <sup>81</sup>. Über den Mechanismus dieser tumorsuppressiven Eigenschaft besteht in der aktuellen Literatur kein Konsens: Als potentielle Mechanismen wird ein Zellzyklusarrest im HNSCC unter Metformintherapie sowie die vermehrte Induktion der zellulären Apoptose diskutiert <sup>82</sup>.



**Abb.12: Mögliche Mechanismen zur Erklärung des tumorsuppressiven Effekts von Metformin:** Tumorsuppression durch Inhibition des Insulin/IGF-1-Signalwegs sowie NF-κB-bedingter SASP-Sekretion; Immunantwort durch Metformin bedingt durch natürliche Killer Zellen (NK Zellen) und zytotoxische T-Zellen; zudem resultieren aus der Metforminanwendung direkte tumorsuppressive Effekte, größtenteils bedingt durch AMPK. Entnommen aus: <sup>80</sup>.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die tumorsuppressiven Eigenschaften von Metformin im HNSCC näher untersucht: So konnte eine Reduktion der Genexpression verschiedener SASP-Faktoren, insbesondere der CXCR2-Liganden, nach Metformingabe sowie ionisierender Radiatio *in vitro* detektiert werden (vgl. Abb.8). Ebenso wurde in einem HNSCC-Xenograftmodell der Maus ein deutlicher antineoplastischer Effekt nach oraler Verabreichung von Metformin beobachtet, auch hier in Kombination mit einer simultan applizierten Radiatio (vgl. Abb.10).

Die molekulare Wirkung der SASP-Inhibition durch Metformineinnahme wird zusätzlich durch die Arbeit von Moiseeva und Kollegen charakterisiert, in welcher die Auswirkung von Metformin auf die Seneszenz sowie den SASP in benignen humanen Lungenfibroblasten untersucht wurde <sup>66</sup>. Hierbei wurde gezeigt, dass Metformin dosisabhängig den NF-κB-Signaltransduktionsweg und konsekutiv die Expression verschiedener Chemokine und Zytokine hemmt <sup>66</sup>. Darauf aufbauend konnte in dieser Arbeit veranschaulicht werden, dass die Genexpression der CXCR2-Liganden CXCL2, CXCL3, IL8 und CXCL10 nach Metformingabe (im HPV-negativen HNSCC) deutlich reduziert und nachhaltig supprimiert wird. Basierend auf den Erkenntnissen von Gao sowie Schutter und Kollegen <sup>68,69</sup>, welche eindrucksvoll den Überlebensnachteil von HNSCC-Tumorpatienten im Falle einer erhöhten Expression verschiedener SASP-Faktoren zeigten, bietet sich nun die Option, den Überlebensnachteil durch vermehrte Produktion von SASP-Faktoren therapeutisch zu adressieren. Gerade im Hinblick auf die Therapieresistenz im HNSCC nach applizierter Radio- bzw. Radiochemotherapie zeigt sich nunmehr eine weitere therapeutisch nutzbare Stellschraube auf. Leider präsentiert sich die Prävalenz von Metformineinnahme bei Diabetes mellitus und vorliegendem HNSCC in der Klinik als eher gering. Foreman und Kollegen publizierten diesbezüglich Daten einer groß angelegten retrospektiven Monocenter-Kohortenstudie an 2498 HNSCC-Patienten, worin die Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 bei 12,8% lag <sup>83</sup>. Da neben Metformin noch weitere orale Antidiabetika sowie parenteral verabreichte Therapeutika zur Routinemedikation bei Typ 2 Diabetes zählen, ist die Prävalenz der Metformineinnahme bei HNSCC-Patienten gewiss deutlich unter 10% anzusiedeln. Interessant ist in diesem Kontext sicherlich eine klinische Analyse dieser Patienten, wobei es neben einer möglichst groß zu wählenden Patientenpopulation gleichzeitig das sehr

heterogene Patientenkollektiv im HNSCC zu bedenken gilt. Letztlich erscheint die Datenlage zur prognostischen Relevanz von Metformin im HNSCC durchaus inkonsistent: So konnte kürzlich an Hypopharynxkarzinomen erkrankten Diabetikern unter Metformineinnahme ein signifikant verbessertes Überleben festgestellt werden <sup>84</sup>. Andererseits konnten Lee und Kollegen in einer retrospektiven Kohortenstudie an 329 HNSCC-Patienten keine Assoziation zwischen einem verbessertem Überleben und der Einnahme von Metformin belegen <sup>85</sup>, sodass hier sicherlich weiterführende klinische Studien, vor allem mit Adjustierung relevanter Kovariablen sowie Begleiterkrankungen, nötig sind.

#### **9.4 SASP: Bedeutung im Modell der antagonistischen Pleiotropie**

An mehreren Stellen wurden bisher die schädlichen Einflüsse des SASP im HNSCC beschrieben. Dennoch sollte dessen Rolle auch jenseits maligner Geschehen beleuchtet werden. So liegt gerade im jungen Lebensalter die Hauptfunktion der beschriebenen Zytokine/Chemokine nicht primär auf der Kontrolle neoplastischer Veränderungen, sondern vor allem auf der Funktion physiologischer Abläufe im Organismus, beispielsweise der Wundheilung <sup>86</sup>. Hierfür beschleunigt die SASP-vermittelte Sekretion von Wachstumsfaktoren wie dem *Platelet-derived growth factor A* (PDGF-A) die Myofibroblastendifferenzierung und gewährleistet somit einen komplikationslosen Heilungsprozess <sup>87</sup>. Im erhöhten Lebensalter jedoch stehen nicht die physiologischen Abläufe des Organismus im Vordergrund. Durch die rekurrente Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren, den Hauptfaktoren des SASP, ergibt sich im Organismus die Tendenz zur Entwicklung diverser Pathologien <sup>86,88</sup>.



In diesem Kontext steht das Auftreten verhältnismäßig radioresistenter Malignome der Kopf-Hals-Region. Ein Erklärungsversuch in diesem Zusammenhang stellt das Modell der antagonistischen Pleiotropie dar, das 1957 durch George Williams als Evolutionsmodell beschrieben wurde. Es basiert auf der Vorstellung, dass ein einzelnes Gen unterschiedliche, auch einander entgegen gerichtete Effekte während einer Lebensspanne inne haben kann <sup>89</sup>. So zeigen bestimmte Gene einen Überlebensvorteil in jungen Jahren, im Alter hingegen imponieren die Effekte dann überwiegend als negativ für den jeweiligen Organismus. Dieser Effekt könnte für den SASP durchaus zutreffend sein: während in jungen Jahren die Faktoren des SASP durch ihre immunstimulatorische Wirkung einen deutlich positiven Effekt haben, steht im erhöhten Lebensalter eine vermehrte Tumorentwicklung, nicht zuletzt deutlich radioresistenter maligner Neoplasien, im Vordergrund. Die antagonistische Pleiotropie stellt schließlich einen Schlüsselmechanismus dar, der die oft durchaus komplex erscheinenden Zusammenhänge zwischen alternden Organismen sowie der Entstehung verschiedenster Pathologien vereinigt.

## **9.5 Ausblick**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des SASP in der Radioresistenz des HNSCCs näher beleuchtet. Vor allem dessen unterschiedliche Ausprägung in Abhängigkeit vom HPV-Status bietet einen weiteren Erklärungsansatz für die erhöhte Radiosensibilität von HPV-positiven HNSCCs. Jenseits etablierter Therapieregime wurde die Bedeutung von Metformin als Kotherapeutikum zur Radiatio deutlich. Selbstverständlich gilt es, diese Daten in substantiellen, bestenfalls prospektiven

Patientenkohorten zu verifizieren, gerade weil einige retrospektive Arbeiten bisher uneinheitliche Ergebnisse zur therapeutischen Bedeutung von Metformin im HNSCC zeigten. Schlussendlich veranschaulicht die vorliegende Arbeit vor allem auch das Potential zielgerichteter Therapien. In diesem Kontext gilt es nun, klinisch relevante therapeutische *Targets*, wie den CXCR2, näher zu untersuchen, um so neue zielgerichtete Therapien in der Behandlung des HNSCCs zu etablieren und letztlich den vielfach begrenzten Therapieerfolg verbessern zu können.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Registerdaten RKI-Zf. Krebs in Deutschland 2011/2012 [press release]. 2015 2015.
2. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer; 2013. Accessed 2017.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-386.
4. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(1):9-22.
5. Hess J, Unger K, Orth M, et al. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. *Cancer letters*. 2017;386:87-99.
6. Castellanos MR, Pan Q. Novel p53 therapies for head and neck cancer. *World journal of otorhinolaryngology - head and neck surgery*. 2016;2(2):68-75.
7. Norbert Schwenzer ME. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. Stuttgart: Thieme; 2002.
8. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-1435.
9. Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *Journal of chronic diseases*. 1972;25(12):711-716.
10. Gillespie MB, Rubinchik S, Hoel B, Sutkowski N. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer: what you need to know in 2009. *Current treatment options in oncology*. 2009;10(5-6):296-307.
11. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(9):709-720.
12. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & neck oncology*. 2010;2:15.
13. Mallen-St Clair J, Alani M, Wang MB, Srivatsan ES. Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1866(2):141-150.
14. Registerdaten RKI-Zf. Krebs in Deutschland 2011/2012. In: Vol 10. Berlin: RKI; 2015.
15. Farshadpour F, Kranenborg H, Calkoen EV, et al. Survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma: influence of smoking and drinking. *Head & neck*. 2011;33(6):817-823.

16. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(4):261-269.
17. Fortin A, Couture C, Doucet R, Albert M, Allard J, Tetu B. Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(21):4107-4116.
18. Wolff K.-D. BF, Beck J., Bikowski K., Böhme P., Budach W., Burkhardt A., Danker H., Eberhardt W., Engers K., Fietkau R., Frerich B., Gauler T., Germann G., GittlerHebestreit 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. . "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms". *Leitlinienprogramm Onkologie* 2012.
19. Westra WH, Lewis JS, Jr. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head and neck pathology*. 2017;11(1):41-47.
20. Wolff K-D, Follmann M, Nast A. Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. *Dtsch Arztebl International*. 2012;109(48):829-835.
21. Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS. Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 1994;120(7):699-702.
22. AWMW DKeVuDKeV. Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. In. Berlin: Leitlinienprogramm Onkologie; 2012.
23. Stannard C, Maree G, Tovey S, Hunter A, Wetter J. Iodine-125 brachytherapy in the management of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Brachytherapy*. 2014;13(4):405-412.
24. Eekers DBP, Roelofs E, Jelen U, et al. Benefit of particle therapy in re-irradiation of head and neck patients. Results of a multicentric in silico ROCOCO trial. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2016;121(3):387-394.
25. Mizoe JE, Hasegawa A, Jingu K, et al. Results of carbon ion radiotherapy for head and neck cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2012;103(1):32-37.
26. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9538):843-854.
27. Hoffmann M, Saleh-Ebrahimi L, Zwicker F, et al. Long term results of postoperative Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT) in the treatment of Squamous Cell Carcinoma (SCC) located in the oropharynx or oral cavity. *Radiation oncology (London, England)*. 2015;10:251.
28. Wendt TG, Grabenbauer GG, Rodel CM, et al. Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized multicenter

- study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(4):1318-1324.
29. Maihofer C, Schuttrumpf L, Macht C, et al. Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck - clinical results from the cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiation oncology (London, England)*. 2018;13(1):123.
  30. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2001;344(14):1031-1037.
  31. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The Lancet Oncology*. 2010;11(1):21-28.
  32. Gaillard F. Lymph node levels. 2009; <https://radiopaedia.org/cases/lymph-node-levels>, 2019.
  33. Orth M, Lauber K, Niyazi M, et al. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiation and environmental biophysics*. 2014;53(1):1-29.
  34. Pilie PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2019;16(2):81-104.
  35. Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature reviews Cancer*. 2009;9(10):714-723.
  36. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental cell research*. 1965;37:614-636.
  37. Sager R. Senescence as a mode of tumor suppression. *Environmental health perspectives*. 1991;93:59-62.
  38. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*. 2013;75:685-705.
  39. Perez-Mancera PA, Young AR, Narita M. Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(8):547-558.
  40. Bianchi-Smiraglia A, Nikiforov MA. Controversial aspects of oncogene-induced senescence. *Cell Cycle*. 2012;11(22):4147-4151.
  41. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(20):1536-1546.
  42. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*. 2000;113 ( Pt 20):3613-3622.
  43. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*. 2010;5:99-118.

44. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*. 2009;11(8):973-979.
45. Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature Immunology*. 2016;17:1142.
46. Dou Z, Ghosh K, Vizioli MG, et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*. 2017;550(7676):402-406.
47. Tran PB, Miller RJ. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003;4(6):444-455.
48. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008;133(6):1019-1031.
49. Ghosh K, Capell BC. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(11):2133-2139.
50. Perri F, Pacelli R, Della Vittoria Scarpato G, et al. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications. *Head & neck*. 2015;37(5):763-770.
51. Overgaard J. Hypoxic modification of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck--a systematic review and meta-analysis. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2011;100(1):22-32.
52. Gammon L, Mackenzie IC. Roles of hypoxia, stem cells and epithelial-mesenchymal transition in the spread and treatment resistance of head and neck cancer. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2016;45(2):77-82.
53. Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, Osaki T. The involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *International journal of cancer*. 2007;120(2):268-277.
54. Lui VW, Hedberg ML, Li H, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer discovery*. 2013;3(7):761-769.
55. Zhan M, Han ZC. Phosphatidylinositide 3-kinase/AKT in radiation responses. *Histology and histopathology*. 2004;19(3):915-923.
56. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular cancer*. 2019;18(1):26.
57. Argiris A, Cohen E, Karrison T, et al. A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer biology & therapy*. 2006;5(7):766-770.

58. Akervall J, Nandalur S, Zhang J, et al. A novel panel of biomarkers predicts radioresistance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2014;50(3):570-581.
59. Hess J, Unger K, Maihoefer C, et al. A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV Infection. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(5):1505-1516.
60. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*. 1993;11(9):1026-1030.
61. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*. 2013;54(4):391-406.
62. Terry M, Therneau PMG. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model - 2000* New York: Springer.
63. Jeon HY, Kim JK, Ham SW, et al. Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(5):5857-5867.
64. Kulman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(2):81-94.
65. Hinds P, Pietruska J. Senescence and tumor suppression. *F1000Research*. 2017;6:2121.
66. Moiseeva O, Deschenes-Simard X, St-Germain E, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging cell*. 2013;12(3):489-498.
67. Guerrero IC, Quetier I, Fetouchi R, et al. Regulation of interleukin-6 in head and neck squamous cell carcinoma is related to papillomavirus infection. *Journal of proteome research*. 2014;13(2):1002-1011.
68. Gao J, Zhao S, Halstensen TS. Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2016;35(6):3265-3274.
69. De Schutter H, Landuyt W, Verbeken E, Goethals L, Hermans R, Nuyts S. The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy +/- chemotherapy. *BMC cancer*. 2005;5:42.
70. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. ROLE OF CHEMOKINES IN TUMOR GROWTH. *Cancer letters*. 2007;256(2):137-165.
71. Shen H, Schuster R, Lu B, Waltz SE, Lentsch AB. Critical and opposing roles of the chemokine receptors CXCR2 and CXCR3 in prostate tumor growth. *The Prostate*. 2006;66(16):1721-1728.

72. Owen JD, Strieter R, Burdick M, et al. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *International journal of cancer*. 1997;73(1):94-103.
73. Gutman M, Singh RK, Xie K, Bucana CD, Fidler IJ. Regulation of interleukin-8 expression in human melanoma cells by the organ environment. *Cancer research*. 1995;55(11):2470-2475.
74. Chan L-P, Wang L-F, Chiang F-Y, Lee K-W, Kuo P-L, Liang C-H. IL-8 promotes HNSCC progression on CXCR1/2-mediated NOD1/RIP2 signaling pathway. *Oncotarget*. 2016;7(38):61820-61831.
75. Han L, Jiang B, Wu H, et al. High expression of CXCR2 is associated with tumorigenesis, progression, and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2012;29(4):2466-2472.
76. Schubert-Zsilavecz. Metformin hemmt Glucagon-Signalling. *Pharmazeutische Zeitung*. 2013;16.
77. Duca FA, Cote CD, Rasmussen BA, et al. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nature medicine*. 2015;21(5):506-511.
78. Wright JL, Stanford JL. Metformin use and prostate cancer in Caucasian men: results from a population-based case-control study. *Cancer causes & control : CCC*. 2009;20(9):1617-1622.
79. Strelakova E, Malin D, Rajanala H, Cryns VL. Metformin sensitizes triple-negative breast cancer to proapoptotic TRAIL receptor agonists by suppressing XIAP expression. *Breast cancer research and treatment*. 2017.
80. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *The Biochemical journal*. 2015;471(3):307-322.
81. Rego DF, Pavan LM, Elias ST, De Luca Canto G, Guerra EN. Effects of metformin on head and neck cancer: a systematic review. *Oral oncology*. 2015;51(5):416-422.
82. Rego DF, Elias ST, Amato AA, Canto GL, Guerra EN. Anti-tumor effects of metformin on head and neck carcinoma cell lines: A systematic review. *Oncology letters*. 2017;13(2):554-566.
83. Foreman A, Lee DJ, McMullen C, et al. Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2017;157(4):657-663.
84. Tsou YA, Chang WD, Lu JJ, et al. The effect of metformin use on hypopharyngeal squamous cell carcinoma in diabetes mellitus patients. *BMC cancer*. 2019;19(1):862.
85. Lee DJ, McMullen CP, Foreman A, et al. Impact of metformin on disease control and survival in patients with head and neck cancer: a retrospective cohort study. *Journal*



*of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale.* 2019;48(1):34.

86. Tchkonina T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of Clinical Investigation.* 2013;123(3):966-972.
87. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell.* 2014;31(6):722-733.
88. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Experimental gerontology.* 2016;82:39-49.
89. Williams GC. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution.* 1957;11(4):398-411.

# 11 Danksagung

---

Ganz besonderen Dank darf ich nun allen sagen, die mich ermutigt und unterstützt haben sowie bei den Experimenten und der Dissertation selbst eine große Hilfe waren. Einige wenige darf ich nun namentlich erwähnen:

Zu Beginn darf ich mich bei Prof. Dr. Claus Belka für die Bereitstellung des herausragenden wissenschaftlichen Umfelds und dem stets kollegialen und wertschätzenden Verhältnis bedanken.

Daneben möchte ich mich sehr bei Frau Prof. Dr. Kirsten Lauber für die thematische Konzeption der Arbeit sowie die exzellente Betreuung bedanken. Neben der fachlichen Expertise trug jedoch auch der außerordentlich kollegiale Umgang mit den Mitarbeitern zu der einzigartigen Arbeitsatmosphäre im Labor bei!

Zudem gilt mein ganz besonderer Dank Frau Dr. Ulrike Schötz, die mir bei jeglicher Problemstellung hinsichtlich der Durchführung der Experimente beiseite stand. Vielen Dank für die Unterstützung im Labor sowie bei der Ausarbeitung dieser Dissertation.

Weiterer Dank gilt zudem unseren Kooperationspartnern am Institut für Pathologie der Charité Berlin sowie am Institut für Zellbiologie am Universitätsklinikum Essen für die kompetente Unterstützung bei den gezeigten Experimenten.

Besonderer Dank gilt selbstverständlich auch jedem Labormitglied, allen voran Dr. Michael Orth, der mit seinem beeindruckenden Fachwissen den experimentellen Teil dieser Arbeit einerseits, andererseits aber auch mit vielen konstruktiven Anregungen die

Ausarbeitung dieser Dissertation begleitet hat. Danke für eure wunderbare Kollegialität und Freundschaft!

Herzlicher Dank gilt zudem dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU für die konzeptionelle sowie finanzielle Förderung dieses Dissertationsprojektes.

Am Ende darf ich mich noch bei meiner Familie und Freunden für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken: Papa, Mama und Silvia, ihr seid großartig!