AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-UND-OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. J. STRUTZ
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON EXTERNER BESTRAHLUNG AUF ZELLULÄRE VITALITÄTSPARAMETER UND DIE EXPRESSION VON HITZESCHOCKPROTEINEN IN DERMALEN FIBROBLASTEN, MIKROVASKULÄREN ENDOTHELZELLEN UND VERSCHIEDENEN PLATTENEPITHELKARZINOMZELLLINIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Fabian Geyer

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-UND-OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. J. STRUTZ
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON EXTERNER BESTRAHLUNG AUF ZELLULÄRE VITALITÄTSPARAMETER UND DIE EXPRESSION VON HITZESCHOCKPROTEINEN IN DERMALEN FIBROBLASTEN, MIKROVASKULÄREN ENDOTHELZELLEN UND VERSCHIEDENEN PLATTENEPITHELKARZINOMZELLLINIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Fabian Geyer

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD. Dr. Frank Haubner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Tobias Ettl
Tag der mündlichen Prüfung:	14.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 8
1.1 Klinische Grundlagen des oralen Plattenepithelkarzinoms 8
1.1.1 Epidemiologie 8
1.1.2 Ätiologie 9
1.1.3 Tumorklassifikation 11
1.1.4 Therapieansätze 14
1.2 Wundheilung 16
1.2.1 Physiologische Wundheilung 16
1.2.2 Störungen der Wundheilung 17
1.3 Hitzeschockproteine 19
1.3.1 Allgemein 19
1.3.2 HSP27 20
1.3.3 HSP70 20
1.3.4 HSP27 und HSP70 in Tumorgewebe und OSCC 22
1.3.5 Der Einfluss von Hitzeschockproteinen bei Bestrahlung 23
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 25

2. Material 26
2.1 Geräte 26
2.2 Medien 26
2.3 Verwendete Zelllinien 28
2.3.1 OSCC 28
2.3.2 NHF und HDMEC 28
2.4 Verwendete Kits 28
2.5 Sonstige Materialien 29
2.6 Chemikalien und Lösungen 30
2.7 Primer 31

3. Methoden 32
3.1 Zellkultur 32
3.1.1 Arbeitsbedingungen und Kultivierung der Zellen 32
3.1.2 Splitten und Passagieren 32
3.1.3 Auftauen der Zellen 33
3.1.4 Einfrieren der Zellen 33
3.2 Proliferation 34
3.2.1 Zellzahlbestimmung im 6-Well-Plattensystem 34
3.2.2 Proliferationsmessung mittels BrdU-Assay 34
3.2.3 Resazurin-Assay 36
3.3 Apoptose 36
3.3.1 Caspase 3/7 Assay 36

3.4 Proteinexpression 37
3.4.1 Proteinexpressionsanalyse mittels ELISA 37
3.5 HPV-PCR 38
3.5.1 DNA-Isolierung 38
3.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 39
3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese 40
3.6 Statistische Auswertung 40

4. Ergebnisse 42
4.1 HPV-PCR 42
4.2 Proliferation 42
4.2.1 Zellzahlbestimmung im 6-Well-Plattensystem 42
4.2.2 Proliferationsmessung mittels BrdU-Assay 46
4.2.3 Resazurin-Assay 50
4.3 Apoptose 56
4.3.1 Caspase 3/7 Assay 56
4.4 Proteinexpressionsanalyse mittels ELISA 58
4.4.1 HSP27 58
4.4.2 Phospho-HSP27 62
4.4.3 HSP70 65

5. Diskussion 68
5.1 Einfluss externer Bestrahlung auf Wachstums- und Proliferationsverhalten 68
5.2 Apoptose 72
5.3 Proteinexpression 74
5.3.1 HSP27 74
5.3.2 HSP70 77

6. Zusammenfassung 80

7. Literaturverzeichnis 81

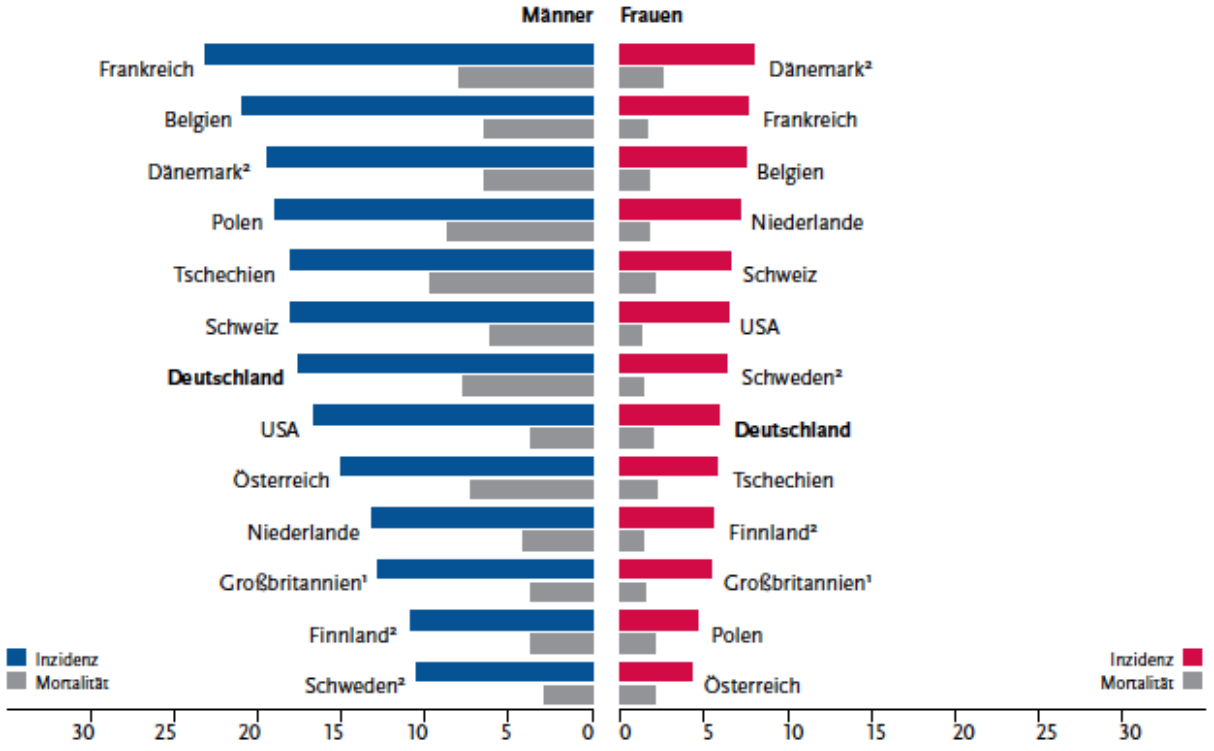
8. Anhang 93
8.1 Verzeichnis der Abkürzungen 93
8.2 Danksagung 94
8.3 Lebenslauf 95

1. Einleitung

1.1 Klinische Grundlagen des oralen Plattenepithelkarzinoms

1.1.1 Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (oral squamous cell carcinoma: OSCC) gehört zu den am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen weltweit [1]. Formal zählt das orale Plattenepithelkarzinom zu den Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC), welche im Kollektiv auf Platz 6 der häufigsten malignen Tumorerkrankungen stehen [2]. Die geschätzte Inzidenz liegt weltweit bei über 300.000 Erkrankungen, wobei der Anteil der Männer in etwa doppelt so hoch ist wie der, der Frauen. Dabei werden die meisten Fälle in Süd-Ost-Asien und Europa gezählt [3].
Innerhalb Europas ist vor allem Frankreich mit etwa 15.500 Erkrankungen pro Jahr betroffen, was 5,5% aller Krebserkrankungen in diesem Land entspricht (Abb. 1) [2, 4].



• **Abb. 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten für maligne Karzinome der Mundhöhle und des Rachens im internationalen Vergleich**, nach Geschlecht. Datenerfassung 2011-2012 durch das Robert-Koch-Institut; je 100.000 Einwohner [5]

Insgesamt ist die Inzidenz in Nord- und Westeuropa in den letzten Jahrzehnten für Frauen gestiegen, die der Männer dagegen gesunken. Dies wird mit der zunehmenden Zahl an Raucherinnen und der Abnahme der Raucher in Verbindung gebracht [6].
In Deutschland liegen Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens bei Männern mit einem Anteil von 3,7% hinsichtlich aller Krebserkrankungen an siebter Stelle, bei Frauen mit 1,6% an Stelle 15. Im Jahr 2012 kam es bei 12.900 Neuerkrankungen zu insgesamt 5.393 Sterbefällen, wobei das Verhältnis von Männern zu Frauen in etwa 3 zu 1 entspricht. Die Prognose bezüglich der Neuerkrankungen im Jahr 2016 liegt bei 14.200 Fällen, was einen leicht ansteigenden Trend darstellt. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter bei Männern bei 62 Jahren mit einem Erkrankungsrisiko auf Lebenszeit von 1,7%, bei Frauen bei 66 Jahren und 0,7% [5].
Insgesamt geht die WHO (World Health Organisation) in den nächsten Jahrzehnten von einer steigenden Inzidenz für Mundhöhlenkarzinome weltweit aus [7].

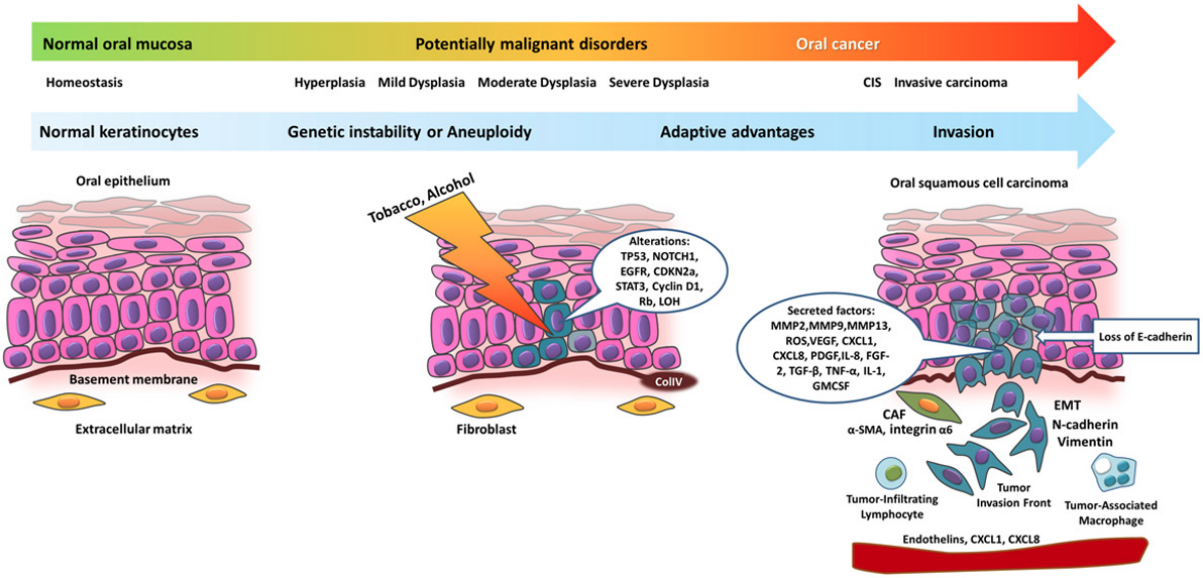
1.1.2 Ätiologie

Mit 90% stellen Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtrakts den größten Anteil der Kopf-Hals-Tumoren in der westlichen Welt dar [5, 8]. Diese Tumoren werden durch transformierende Zellen in der Basalzellschicht, welche nach und nach das normale Epithel ersetzten, hervorgerufen [9]. Die Karzinogenese ist ein oftmals jahrelang dauernder, komplexer und multifaktorieller Prozess, der durch genetische Alterationen in Epithelzellen verursacht wird (Abb. 2) [10].
In 90% der Fälle besteht ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und dem langjährigen Konsum von Alkohol und Tabak, welche als die beiden größten Risikofaktoren gelten [11, 12]. Bei starken Rauchern ist das Risiko um den Faktor 3,43 für Mundhöhlenkarzinome und 6,76 für Pharynxkarzinome erhöht [13]. Dabei spielen vor allem die durch den Tabak produzierten Präkanzerogene Nitrosamine, Benzopyrene und aromatische Amine eine Rolle. Diese Stoffe führen zu genomischen Veränderungen in für die Entstehung von HNSCCs wichtigen Genen, wie p53 [14].
Wie auch bei Rauchern, ist das relative Risiko bei starkem Alkoholabusus deutlich dosisabhängig. So liegt der Risikofaktor bei einem Genuss von 10g Ethanol pro Tag bei 1,3,

verglichen mit einem Faktor von 13 beim Genuss von 125g pro Tag [15]. Dabei sind vor allem die durch Alkohol induzierte Atrophie des Epithels und die Beeinträchtigung in der DNA-Synthese und Reparatur für die Tumorentstehung verantwortlich. Die vollständigen karzinogenen Mechanismen sind jedoch noch nicht umfassend geklärt [12, 15].

Besonders die Kombination von Alkohol und Tabak hat einen multiplikativen Effekt auf die Entstehung eines HNSCCs, mit einem relativen Risiko von 15 oder höher [16].

Wird zudem nach erfolgter Therapie der Konsum von Alkohol und Tabak nicht eingestellt, ist die Wahrscheinlichkeit für das Entstehen eines Rezidivs oder einer sekundären Neoplasie erheblich erhöht und führt zu einer allgemein schlechteren Prognose [17].



• **Abb. 2: Schematische Darstellung der Karzinogenese eines oralen Plattenepithelkarzinoms.** Risikofaktoren wie Tabak und Alkohol induzieren komplexe und multifaktorielle Prozesse, die genetische und morphologische Veränderungen in Epithelzellen hervorrufen und so die Entstehung eines OSCCs begünstigen. [18]

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor stellt die Infektion mit HPV (humane Papillomviren) in erster Linie bei jüngeren Patienten dar [19]. Als die beiden am häufigsten assoziierten Virustypen sind hierbei besonders HPV 16 und seltener HPV 18 zu nennen, wobei sich die meisten einer HPV-Infektion zugeschriebenen Plattenepithelkarzinome im Bereich des Oropharynx befinden [20]. Ursache der karzinogenen Wirkung der HPV-Infektion ist die Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7. E6 ist für die Degradation und Destabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53, E7 für das Tumorsuppressorprotein pRb verantwortlich [21]. Dies führt zu einer Deregulation der Kontrolle über den Zellzyklus [22]. Die Prognose eines HPV induzierten HNSCCs ist dabei wesentlich günstiger gegenüber einem

HPV-negativen Plattenepithelkarzinom, auch aufgrund eines besseren Ansprechverhaltens auf Chemotherapie und Radiatio [23].

Die Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms werden in präkanzeröse Läsionen und Konditionen eingeteilt. Zu den präkanzerösen Läsionen werden die orale Leukoplakie, Erythroplakie und die proliferative verruköse Leukoplakie (PVL) gezählt [14, 24]. Davon ist die orale Leukoplakie die häufigste Erscheinung, welche nach WHO als eine weiße, nicht wegwischbare Läsion, die keiner anderen Krankheit zugeordnet werden kann, definiert ist. Die maligne Transformationsrate der Erythroplakie ist jedoch gegenüber der Leukoplakie mit über 50% stark erhöht [25].

Zu den präkanzerösen Konditionen gehören der orale Lichen planus, Eisenmangel, Syphilis, Xeroderma pigmentosum, Lupus erythematodes, Epidermolysis bullosa dystrophica sowie die orale submuköse Fibrose, welche vor allem in Asien wegen des Kauens von Betelnüssen zu finden ist [26].

Klinisch wird zwischen einem exophytischen und endophytischen Wachstum unterschieden. In beiden Fällen liegt eine Induration des Gewebes vor, wobei keine exakte Abgrenzung zur Umgebung möglich ist. Die erste klinische Manifestation ist meistens eine schmerzlose Schleimhautveränderung. Eine typische Stelle hierfür ist vor allem die untere Mundhöhlenetage, wo insbesondere am seitlichen Zungenrand, retromolar, Gaumenbogen und der Bereich des anterioren und lateralen Mundbodens betroffen sein können [27].

Die Metastasierung erfolgt in erster Linie in die Lymphknoten der Kopf- Halsregion [7]. Das Vorkommen von Fernmetastasen, welche vorwiegend in Lunge und Knochen lokalisiert sind, korreliert maßgeblich mit der Lage und Progression des Primärtumors, sowie mit dem Grad der Lymphknotenmetastasierung. Im Vergleich zu anderen malignen Tumorerkrankungen ist die Inzidenz von Fernmetastasen jedoch relativ gering [28]. Sie wird mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 12% bei Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium angegeben [29].

1.1.3 Tumorklassifikation

Zur Klassifikation des Tumorleidens wird die Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation (TNM), welche von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) und der AJCC (American Joint Committee on Cancer) herausgegeben wird, herangezogen. Wie in Tabelle 1 gezeigt, werden

beim TNM-System die Größe des Primärtumors (T1 bis T4), lokoregionale Lymphknotenmetastasierung (N0 bis N3) und das Vorliegen von Fernmetastasen (M0 und M1) erfasst [27, 30].

Beurteilungskriterium		**Beschreibung**
Größe des Primärtumors (T)	TX	Primärtumor nicht bestimmbar
	Tis	Carcinoma in situ (CIS)
	T0	kein Primärtumor vorhanden
	T1	Primärtumor mit maximalem Durchmesser von 2,0cm
	T2	Primärtumor mit maximalen Durchmesser von >2,0cm, ≤ 4,0cm
	T3	Primärtumor mit maximalem Durchmesser von >4,0cm
	T4a	*Lippe:* Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, den N. alveolaris inferior, in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase) *Mundhöhle:* Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (Mm. genioglossus, hyoglossus, palatoglossus und styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
	T4b	*Lippe* und *Mundhöhle:* Tumor infiltriert Spatium masticatorum, Processus pterygoideus und Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
Lymphknotenstatus (N)	NX	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
	N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
	N1	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser von 3,0cm
	N2a	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser von >3,0cm, ≤ 6,0cm
	N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser von ≤ 6,0cm
	N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser von ≤ 6,0cm
	N3	Metastasen in einem regionalen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser von > 6,0cm
Fernmetastasen (M)	MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
	M0	keine Fernmetastasen nachweisbar
	M1	Fernmetastasen vorhanden

• **Tab. 1: TNM-Klassifikationskriterien** [30]

Ausgehend von der TNM-Klassifikation können die Tumoren zur Beurteilung des Schweregrades in vier Tumorstadien eingeteilt werden (Tabelle 2). Dabei wird zwischen den

frühen Tumorstadien I und II und den fortgeschrittenen Stadien III und IV unterschieden [31].

Tumorstadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stadium IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Stadium IVB	Beliebiges T	N3	M0
	T4b	Beliebiges N	M0
Stadium IVC	Beliebiges T	Beliebiges N	M1

• **Tab. 2: Einteilung der Tumorstadien** [31]

Als wichtiger Prognosefaktor und um die Aggressivität eines malignen Tumors auf histologischer Ebene beschreiben zu können, gilt der Entdifferenzierungsgrad der Tumorzellen (G = Grading), welcher in gut (G1), mäßig (G2) und schlecht differenziert (G3) eingeteilt wird [27, 32]. Als Beurteilungsgrundlagen werden hierfür Zellreichtum, Mitoserate, Zellpleomorphie, Vorliegen von Nekrosen und das Verhältnis von Zellen zu Interzellularsubstanz innerhalb des Tumorgewebes herangezogen [27]. Allgemein sind schlecht differenzierte Tumoren häufig mit einer höheren Metastasierungsrate in die regionalen Lymphknoten, seltener tumorfreien Resektionsrändern und einer insgesamt reduzierten Überlebensrate assoziiert [32].

Als weitere wichtige histopathologische Kriterien zur Tumorprognose sind die Infiltration und Ausbreitung in lokoregionäre Lymphbahnen (L) oder Venen (V) und ein kapselüberschreitendes Wachstum bei Lymphknotenmetastasen zu nennen [33].

Bereits 2004 wurde von Wenzel et al. aufgezeigt, dass beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und besonders einer Kapselruptur, die Einteilung in die T-Kategorie und die Infiltrationstiefe ihren prognostischen Einfluss verlieren. Daher beschränkt sich die prognostische Aussagekraft bei der Einteilung des Primärtumors nach Merkmalen, wie

Größe und Infiltrationstiefe, lediglich auf nichtmetastasierte Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome [34].

1.1.4 Therapieansätze

Bei der Wahl der Therapieform und der Prognose bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle orientiert man sich hauptsächlich an der TNM-Klassifikation. Alter, Geschlecht und frühere Erkrankungen stellen darüber hinaus weitere wichtige klinische Parameter dar [35]. Weiterhin sind die Tumorlokalisation, die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus, die Invasion von Gefäßen oder Infiltration von Nerven und die Ausdehnung ins Hart- und Weichgewebe bedeutende Faktoren [36, 37].

Die therapeutischen Alternativen erstrecken sich dabei auf die chirurgische Resektion des Tumors, Radiatio oder Chemotherapie, wobei jede Therapieform sowohl einzeln, als auch in Kombination zum Einsatz kommen kann [38].

Bei der Entfernung eines Tumors sind das tumorfreie Überleben und die Schonung bzw. Erhaltung vitaler Strukturen und Funktionen als vorrangige Ziele anzusehen. Dies gilt vor allem in der anatomisch und ästhetisch anspruchsvollen Region von Kopf und Hals [37].

Bei Tumoren, die nach der UICC Stadieneinteilung, Stadium I oder II zugeordnet werden können, wird in der Regel mittels chirurgischer Resektion oder Radiatio behandelt. Für diese Patienten kann eine gute Prognose mit einer Überlebensrate von ca. 90% für die ersten zwei Jahre erwartet werden [39]. Neben der reinen Tumorentfernung wird bei der chirurgischen Therapie oft eine Ausräumung der Lymphknoten durchgeführt, da die Metastasierung in die Lymphknoten eine häufige Erscheinung beim oralen Plattenepithelkarzinom darstellt. Diese ist indiziert, wenn entweder im Rahmen der Staginguntersuchungen bereits befallene Lymphknoten festgestellt wurden, oder aufgrund der Tumordicke und Ausdehnung ein positiver Befund erwartet werden kann [40].

Die Entscheidung zwischen einem primären operativen Vorgehen oder einer primären Bestrahlung wird maßgeblich vom allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten, Tumorlokalisation, dem zu erwartenden funktionellen und ästhetischen Outcome und der Lebensqualität während und nach der Behandlung beeinflusst [41]. Typische Indikationen für eine initiale Radiatio sind Risikopatienten, inoperable Erkrankungen, Rezidive bei mehrfach

voroperierten Patienten oder auf Patientenwunsch [38]. Obwohl beide Verfahren gute Heilungschancen bei Erkrankungen in frühen Stadien bieten, gilt zu beachten, dass eine Bestrahlung gleichzeitig mit einer höheren Morbidität gegenüber einer rein chirurgischen Behandlung einhergeht [41]. So kommt es bei nahezu 100% der Patienten zu einer Mukositis [42]. Des Weiteren kann eine Radiatio zu Xerostomie infolge von Schädigungen der Speicheldrüsen, Störungen des Geschmackssinnes, Dysphagien, Candidabefall und besonders Osteoradionekrosen führen [41].

Da ca. zwei Drittel der oralen Plattenepithelkarzinome erst in fortgeschrittenen Stadien (UICC Stadium III und IV) erkannt werden, stellt eine multimodale Therapie das häufigste Mittel der Wahl dar [41]. Diese besteht zumeist neben chirurgischen Eingriffen aus einer Bestrahlungstherapie oder einer kombinierten Radiochemotherapie. Man geht davon aus, dass eine zusätzlich zur Radiatio durchgeführte Chemotherapie einen synergistischen Effekt auf die Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen besitzt. So können die Tumorzellen in einem radiosensitiven Zustand gehalten und das erneute Wachstum zwischen den Bestrahlungsbehandlungen minimiert werden [41]. Allerdings muss hierbei auch die zusätzliche toxische Wirkung in Betracht gezogen werden [37].

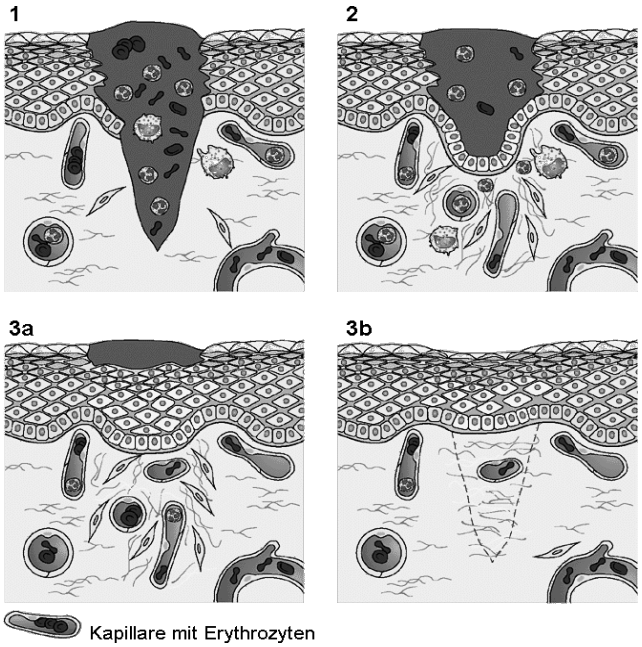
Neben dem Standardchemotherapeutikum Cisplatin, werden heutzutage auch mit *molecular-targeted* Therapeutika wie Cetuximab, einem Inhibitor des epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR, sowohl als Einzeltherapeutikum, als auch in einer Kombinationstherapie gute Erfolge bei der Behandlung von HNSCC erzielt [38, 43, 44].

Ist keine kurative Behandlung mehr indiziert, folgt eine rein palliative Behandlung. Hierfür wird meist eine spezielle Bestrahlungstherapie, die als Hypofraktionierung bezeichnet wird, angewandt. Dafür wird die Gesamtbestrahlungsdosis in größere Einzeldosen aufgeteilt und somit die Anzahl der Behandlungstermine gesenkt. Dadurch kann ein guter Kompromiss zwischen der Kontrolle der Symptome, der Strahlentoxizität und der allgemeinen Lebensqualität gesichert werden [45, 46].

1.2 Wundheilung

1.2.1 Physiologische Wundheilung

Im Anschluss an eine Verletzung der Haut kommt es normalerweise sofort zum Einsetzen der physiologischen Wundheilung. Durch die Aktivierung einer überwiegend zytokingesteuerten komplexen Kaskade und weiterer Abläufe wird ein vollständiger Verschluss des entstandenen Defektes, sowie die Wiederherstellung der Funktionalität der betroffenen Region erreicht [47, 48]. Dabei ist die Interaktion und das Zusammenspiel von Zellen, Zytokinen, Chemokinen und diversen extrazellulären Matrixproteinen von essentieller Bedeutung [49]. Dieser Vorgang kann in verschiedene Phasen unterteilt werden, die sowohl synchron, als auch überlappend ablaufen können [50]. Unterschieden wird dabei zwischen der Exsudation, welche weiter in Hämostase und Entzündungsreaktion unterteilt werden kann, und den Phasen der Proliferation und des Remodellings [50-52].



• **Abb. 3: Phasen der physiologischen Wundheilung einer Hautwunde. 1 Hämostase:** Auffüllen des Wundspalts durch Exsudation von Blutbestandteilen mit koaguliertem Blut und Fibrinbestandteilen; **2 Entzündung bzw. resorptive Phase:** Resorption des Blutkoagels durch Exsudationsmakrophagen des dermalen Bindegewebes, gleichzeitig Migration des basalen Epithels zwischen Blutschorf und Granulationsgewebe; **3a Proliferation:** Bildung von Narbengewebe und Erneuerung des Plattenepithels an der Oberfläche durch Proliferation des basalen Epithels; **3b Remodelling:** Wundverschluss und Entstehung einer Narbe (ausdifferenziertes Plattenepithel an der Oberfläche, gefäßarme Narbe in der Tiefe) [53]

Auf zellulärer Ebene sind vor allem Fibroblasten, deren Integrine und die Extrazellulärmatrix von großer Bedeutung. Auch Endothelzellen, Thrombozyten und Keratinozyten sind für den fehlerfreien Ablauf der Wundheilungskaskade vonnöten [54, 55]. Fibroblasten, Keratinozyten und Angioblasten wandern entlang eines chemotaktischen Gradienten in das Wundgebiet ein, proliferieren und Fibroblasten beginnen mit der Synthese von Kollagen und weiterer wichtiger Bestandteile der Extrazellulärmatrix [54]. Als Leitstruktur dient den Fibroblasten dabei die vorher bereits gebildete fibronektinreiche Primärmatrix [56]. Der Informationsaustausch zwischen Fibroblasten und der umgebenden Matrix und die Kommunikation der Zellen untereinander wird durch Integrine gesteuert und ermöglicht eine zeitliche und räumliche Abstimmung von Migration, Morphologie, der Differenzierung der Zellen oder auch der Strukturierung des Zytoskeletts über die Extrazellulärmatrix [57].
Der Prozess der Gewebeneubildung wäre selbstlimitierend, wenn nicht parallel eine Neubildung von Blutgefäßen ablaufen würde [58]. Aufgrund der hohen metabolischen Aktivität im Wundgebiet beststeht ein erhöhter Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen. Lokale Gegebenheiten wie ein erniedrigter pH-Wert, reduzierte Sauerstoffkonzentration oder ein lokal erhöhter Laktatwert initiieren die Ausschüttung von Faktoren, die zur Bildung einer neuen Blutversorgung führen. Hierbei sind der *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *transforming growth factor ß* (TGF-ß) und vor allem der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), welcher von Endothelzellen gebildet wird, von entscheidender Bedeutung [59].

1.2.2 Störungen der Wundheilung

Bei Störungen der physiologischen Wundheilungskaskade und der Reparaturmechanismen können zwei pathologische Phänomene auftreten. Einerseits kann eine überschießende Narbenbildung, wie z.B. bei hypertrophen Narben und Keloiden vorkommen, andererseits können chronische Wunden, wie z.B. Ulzera nach Strahlentherapie, auftreten [60, 61].
Bei der zweiten Gruppe kann man weiter unterscheiden zwischen frühen und späten Nebenwirkungen der Radiatio. So treten z.B. ein Erythem, Hyperpigmentation oder Haarausfall relativ früh auf, wohingegen sich z.B. Hautatrophie, Teleangiektasien, Dyspigmentierung oder Ulzerationen erst später zeigen [62].

Strahlentherapie kann vor allem die frühen Phasen der Wundheilung wie die Entzündungs- und Proliferationsphase beeinflussen. Während der Entzündungsphase vorkommende Zytokine wie TGF-ß, *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), VEGF, *interferon-γ* (IFN- γ) sowie Interleukin (IL)-1 und IL-8, sind nach einer Bestrahlungstherapie überexprimiert, was zu einer Anhäufung von Extrazellulärmatrix und Fibrose führen kann [61, 63].

Die Bildung von Narbengewebe aus Granulationsgewebe, die Reepithelialisierung und Neovaskularisierung während der proliferativen Phase werden hauptsächlich von TGF-ß, VEGF, *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) reguliert [53, 61]. In der Phase des Remodellings spielen Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren, den Gewebe-Metalloproteinaseinhibitoren (TIMP= *tissue inhibitor of metalloproteinases*), die zentrale Rolle [64].

Fibroblasten sind für die korrekte Anordnung und den Umbau von Kollagenfibrillen verantwortlich. Es hat sich gezeigt, dass dieser Mechanismus in bestrahltem Gewebe gestört ist. Ursächlich scheint eine Dysregulation der Expression von MMPs und TIMPs zu sein, da diese beiden Enzymfamilien die Synthese der Extrazellulärmatrix steuern [49]. Die Expression von MMPs und TIMPs durch Fibroblasten wird wiederum durch TGF-ß reguliert, sodass diesem Zytokin ein Einfluss auf die Entstehung radiogener Ulzera zugeschrieben werden kann [63].

Wie bereits erwähnt, kann eine Fehlfunktion von Endothelzellen und eine damit ausbleibende Gefäßneubildung bei der Wundheilung von besonderer klinischer Relevanz sein [65]. Endothelzellen weisen eine hohe Sensitivität gegenüber einer Strahlenbelastung auf und es wurde gezeigt, dass diese Zellen nach Bestrahlung vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-6 exprimieren. Dennoch sind die zellulären Mechanismen, die zu einer Dysfunktion der Endothelzellen nach Radiatio führen, noch nicht ausreichend bekannt [66].

1.3 Hitzeschockproteine

1.3.1 Allgemein

Hitzeschockproteine (HSP) sind spezielle Proteine, die unter physiologischen Bedingungen in relativ kleinen Mengen konstitutiv synthetisiert , bei diverser Stressexposition jedoch stark vermehrt exprimiert werden [67, 68]. Sie helfen dabei, die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten und somit ein Überleben der Zelle unter kritischen Bedingungen zu ermöglichen [69]. HSPs sind hochkonservierte Proteine, welche in nahezu allen Pro- und Eukaryoten nachweisbar sind und in Teilen ihrer Struktur große Homologien zwischen verschiedenen Spezies aufweisen [70].

HSPs sind sogenannte molekulare Chaperone. Die Aufgabe dieser zytoprotektiven Proteine ist das Falten, der Transport, Sekretion, Regulation und die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen. Außerdem können sie helfen, durch Zellstress irreversibel beschädigte Proteine zu degradieren oder fehlerhaft gefaltete Proteine erneut zu falten [69, 71]. Auf der anderen Seite wirken sie auch als starke anti-apoptotische Proteine. Sie sind assoziiert mit wichtigen Faktoren des Apoptosemechanismus und können den Zelltod so in verschiedenen Phasen beeinflussen [72].

Die Einteilung der Hitzeschockproteine erfolgt dabei entsprechend dem Molekulargewicht in verschiedene Gruppen: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 und kleinere HSPs (15 bis 30kDa), unter anderem HSP27. Darunter gibt es konstitutiv synthetisierte oder stressinduzierte Hitzeschockproteine und sie kommen in verschiedenen Zellkompartimenten vor. Chaperone mit einem hohen Molekulargewicht sind ATP-abhängig, wohingegen kleine HSPs ATP-unabhängig arbeiten können [69, 73].

HSP70 und HSP27 sind die am häufigsten nach Stress induzierten Chaperone. Ihre Expression ist unter physiologischen Bedingungen niedrig, um die normalen Zellaktivitäten nicht zu beeinträchtigen. Bei Stressexposition, vor allem durch Hitze, Bestrahlung, oxidativen Stress oder einer Chemotherapie, wird die Produktion stark angeregt [73, 74].

1.3.2 HSP27

HSP27 mit einer Molekularmasse von 25-30 kDa gehört zu der Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (sHSP) [67, 69]. Strukturell weist HSP27 eine hohe Übereinstimmung mit anderen Vertretern der sHSPs auf. Es besitzt eine durchgängige Sequenzähnlichkeit mit α-Cristallin, unterscheidet sich jedoch an den C- und N-terminalen Regionen [75, 76]. Exprimiert wird HSP27 in allen menschlichen Geweben und es kann durch Phosphorylierung reversibel Oligomere mit bis zu 1000 kDa bilden [69, 72]. Die Phosphorylierung kann dabei an drei verschiedenen Serinresten, katalysiert von der MAPKAP-Kinase 2 und 3 über den p38 MAPK Signalweg, erfolgen [76]. Die Phosphorylierung kann durch oxidativen Stress, inflammatorische Zytokine, wie TNF-α, IL-1ß, TGF-ß oder Steoridhormone ausgelöst werden [77]. Dieser Vorgang ist reversibel und steuert die Oligomerisierung des Proteins. Die Phospholylierung bewirkt eine Bildung von kleinen Oligomeren, eine Dephosphorylierung das Gegenteil [69, 72].

Neben den *heat shock transcription factors* (HSFs), welche die Produktion von HSPs bei Zellstress induzieren [78], spielt der dynamische Prozess der Oligomerisierung eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Aktivität von HSP27 als Chaperon [69].

Größere Oligomere können in einer ATP-unabhängigen Weise die Aggregation von Proteinen verhindern und besitzen eine anti-oxidative Wirkung. Kleinere Oligomere können dagegen Aktinfilamente stabilisieren und eine Rolle bei der Degradation bestimmter Proteine unter Stressbedingungen spielen [72].

Außerdem schützt eine Überexpression von HSP27 vor Apoptose [79]. HSP27 interagiert mit verschiedenen Schlüsselproteinen der Apoptosekaskade und kann diese inhibieren. Diese anti-apoptotische Funktion von HSP27, auch verbunden mit tumorfördernden Eigenschaften, ist mit großen Oligomeren assoziiert [72].

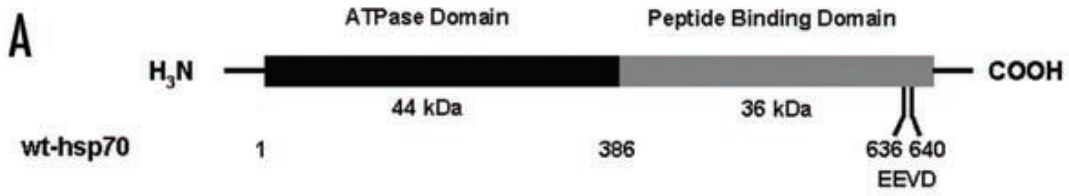
1.3.3 HSP70

Hinter dieser Bezeichnung verbirgt sich eine Gruppe von Chaperon-Proteinen einer Genfamilie mit einem Molekulargewicht von 70 kDa, wobei verschiedene Formen beschrieben werden. Bei den zytoplasmatisch und nukleär lokalisierten Formen

unterscheidet man zwischen HSP72 als induzierbare und HSP73 als konstitutiv synthetisierte Form. Darüber hinaus existiert weiterhin das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte GRP78 (HSP78, BiP=*binding Protein*) und mitochondriales mtHSP70 [69, 72, 80].

Unter Normalbedingungen erfüllt HSP70 die Aufgabe eines ATP-abhängigen molekularen Chaperons. Es hilft beim Falten neu synthetisierter Polypeptide, beim Aufbau von Proteinkomplexen und beim Transport von Proteinen über Zellmembranen [68, 73]. Stressexposition induziert in der Zelle eine Hochregulierung von HSP70 um mit der erhöhten Konzentration an ungefalteten oder denaturierten Proteinen fertig zu werden. In diesem Falle sorgt das stressinduzierte HSP70 z.B. dafür, falsch gefaltete Proteine erneut zu falten, Proteinkomplexe aufzulösen oder instabile Proteine zu degradieren [73, 81].

HSP70 besteht aus zwei unterschiedlichen funktionellen Domänen. Es findet sich ein C-terminaler Peptid-bindender Bereich (PBD=*peptide-binding domain*) und ein N-terminaler Bereich mit ATPase-Aktivität (ABD=*ATPase domain*) (Abb. 4). Beide Bereiche sind wichtig, ein Substrat zu binden und zu stabilisieren. Der PBD besitzt am C-terminalen Ende ein Chaperon EEVD Motiv, welches für die Bindung und Faltung des Substrats verantwortlich ist. Der N-terminale ABD erleichtert dagegen das Lösen des Substrates bzw. Proteins nach der Hydrolyse von ATP [69, 73, 82].



• **Abb. 4: Struktureller Aufbau von HSP70**; modifiziert nach Garrido et al. [73]

Die Chaperonaktivität von HSP70 wird durch Co-Chaperone, wie Hip, CHIP oder Bag-1, reguliert. Diese Co-Chaperone binden an HSP70 und modulieren die Chaperonfunktion, indem die Substrataffinität von HSP70 entweder erhöht oder erniedrigt wird. Dies wird durch die Stabilisierung des einerseits ATP-gebundenen oder andererseits des ADP-gebundenen Zustandes erreicht [73].

Wie auch HSP27 besitzt HSP70 die Fähigkeit, mit Schlüsselproteinen der Apoptosekaskade zu interagieren und diese zu inhibieren [73].

1.3.4 HSP27 und HSP70 in Tumorgewebe und OSCC

Während der Transformation von Krebszellen finden starke Veränderungen des intra- und extrazellulären Milieus statt. Dabei sind die Zellen außerdem häufig Stressfaktoren, wie z.B. Hypoxie, Acidose, Nährstoffmangel und dem Eingreifen des Immunsystems, ausgesetzt. Hitzeschockproteine helfen bei der Anpassung an Stresssituationen und sichern so das Überleben der Zellen [83]. Darüber hinaus benötigen Krebszellen, bedingt durch einen höheren Metabolismus und eine größere Anzahl an aktiven Signalwegen, eine höhere Konzentration an Chaperonen gegenüber nicht transformierten Zellen. Außerdem sind HSPs an der Faltung und Stabilisierung relevanter Onkoproteine beteiligt, wodurch ihnen eine Schlüsselrolle bei wichtigen onkogenen Signalwegen und somit auch der Tumorprogression zugeschrieben wird [84].

Gegenüber gesundem Gewebe ist die Expression und Aktivität von HSP27, HSP70 und HSP90 in Tumorgewebe häufig stark erhöht [72, 73]. Eine hohe Expression von HSP27 und HSP70 beim Mammakarzinom, Endometriumkarzinom oder Magenkarzinom steht in Korrelation mit Metastasierung, schlechter Prognose und einer höheren Resistenz gegenüber Chemotherapie und Radiatio [85-87]. Dagegen zeigt sich jedoch z.B. bei einer Überexpression von HSP70 beim Nierenzellkarzinom eine eher gute Prognose [88].

Ein wichtiger Beitrag der Hitzeschockproteine bei der Tumorprogression besteht in der Möglichkeit, Apoptose regulieren zu können bzw. zu verhindern [69]. HSP27 interagiert beispielsweise mit Bestandteilen der Apoptose-Kaskade und kann sowohl stress- als auch rezeptorinduzierte Apoptose-Signalwege inhibieren [83]. Durch die Bindung an *Caspase-3* und Cytochrom c, welche vom Mitochondrium freigesetzt werden, kann die Caspase-Kaskade inaktiviert werden [69]. Die Sequestrierung von Cytochrom c durch HSP27 induziert darüber hinaus eine Resistenz gegenüber Chemotherapie [89]. Außerdem wird durch die Bindung an F-Aktin eine Stabilisierung und so der Zusammenbruch des Zytoskeletts verhindert [83]. Eine wichtige Bedeutung besitzt HSP27 auch bei der Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) und der Inaktivierung von Bax, einem Co-Faktor des Tumorsuppressor-Proteins p53, durch einen Anstieg der Aktivität der *Phosphoinositid-3-Kinase* (PI3K), was zu einer Hemmung der Apoptose führt [69, 83]. Neben dem Einfluss auf die Apoptose ist beschrieben, dass große Oligomere von HSP27 anti-oxidative Eigenschaften aufweisen. Erreicht wird dies, indem Glutathion in seiner nicht reduzierten Form gehalten wird und so

die Produktion von ROS (reaktive Sauerstoffspezies), welche vor allem auch infolge von Radiatio auftreten und für deren Wirkung verantwortlich sind, aufgehoben wird [69, 90-92].
Auch bei HSP70 scheint die Fähigkeit, den programmierten Zelltod verhindern zu können, den größten Teil der zytoprotektiven Wirkung auszumachen [69]. Studien haben gezeigt, dass Zellen mit fehlenden *hsp*70.1 und *hsp*70.3, den beiden Genen, die induzierbares HSP70 kodieren, hoch sensitiv gegenüber Apoptose-Stimuli sind [93]. HSP70 kann dabei die Apoptose-Kaskade auf verschiedenen Ebenen, die dem Mitochondrium sowohl vor- als auch nachgeschaltet sein können, beeinflussen. Neben der Regulierung von Rezeptor-Signalwegen und Einfluss auf die eigentliche Ausführung des Zelltodes, kann HSP70 auch eine Wirkung auf Transkriptionsfaktoren der Bcl-2 Proteine haben. Die Gruppe der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose-Kaskade, indem sie die Ausschüttung von Caspase-Aktivatoren kontrollieren [69, 94].
Studien haben gezeigt, dass auch beim oralen Plattenepithelkarzinom die Expression von HSP27 und HSP70 signifikant höher als in der normalen Mukosa ist [91, 95-98]. Bezüglich HSP27 als Prognosefaktor beim OSCC gibt es bislang relativ wenige und zum Teil auch gegensätzliche Ergebnisse [99]. Dennoch scheint die Überexpression von HSP27 in oralen Plattenepithelkarzinomzellen mit einer allgemein besseren Überlebensrate einherzugehen [91, 100, 101]. Es wurde auch ein Zusammenhang zwischen der HSP27-Konzentration und der histopathologischen Einstufung gezeigt, wobei die niedrigste HSP27-Konzentration bei schlecht differenzierten OSCCs gefunden wurde [102]. Dagegen zeigt sich bei HSP70 eine hohe Konzentration bei schlecht differenzierten Tumoren [103] und wird allgemein mit einer kürzeren krankheitsfreien Überlebenszeit verbunden [71]. Darüber hinaus scheint die HSP70 Expression auch mit höheren klinischen Stadien und fortgeschrittenem Alter anzusteigen und essentiell für die Proliferation der Tumorzellen zu sein [71, 104].

1.3.5 Der Einfluss von Hitzeschockproteinen bei Bestrahlung

Die Überexpression von Hitzeschockproteinen in Krebszellen wirkt aufgrund ihrer anti-apoptotischen und proliferativen Eigenschaften protektiv und stellt damit einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Krebstherapien dar. Hierbei sind

vor allem das bessere Ansprechen auf Chemotherapie und eine erhöhte Radiosensitivität durch eine Verringerung der HSP-Aktivität bzw. -Konzentration, von Bedeutung [105].

Es werden verschiedene Mechanismen zur Radiosensitivierung durch HSPs angenommen. Eine Hypothese besagt, dass HSPs Signalmoleküle stabilisieren, die Zellen vor einem durch Radiatio oder Chemotherapie induzierten Zelltod schützen [106]. Studien zu diesem Mechanismus zeigten eine erhöhte Radiosensitivität der Tumorzellen durch Inhibierung von HSP90. Es fand sich eine niedrigere Expression von Proteinen wie Akt, EGFR, Raf-1, ErbB2, IGF-1R, sowie ein Anstieg ihrer proteosomalen Degradation [107]. Viele dieser Proteine stehen nicht nur mit Proliferation und Überleben von Zellen in Verbindung, sondern auch mit dem Schutz vor bestrahlungsinduziertem Zelltod [105].

Darüber hinaus scheinen auch die anti-oxidativen Eigenschaften der HSPs von Bedeutung zu sein. Eine Bestrahlung bewirkt die Bildung von ROS, was wiederum zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen der DNA führen kann [105]. Dabei steht die Menge an gebildeten ROS in direkter Verbindung mit der Radiosensitivität der Zellen [108]. HSP27 wurde eine wichtige Rolle bei der verminderten Produktion von ROS in Krebszellen, in Abhängigkeit von TNF-α, zugeschrieben [109]. HSP27 scheint dies durch die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Glutathion, vermittelt durch die Glucose-5-phosphat-Dehydrogenase und Glutathion-Reduktase, zu bewirken [69, 110]. Eine Studie mit Jurkat-Zelllinien zeigte, dass die Expression von HSP27 sowohl mit einer hohen Toleranz gegenüber strahlungsinduzierten Zellschäden, als auch mit einer hohen Konzentration von Glutathion einhergeht [92].

Weitere Studien zur Radiosensitivierung durch HSP-Antagonisten sehen eine Möglichkeit bei der Reaktion auf DNA-Schäden. Durch Radiatio hervorgerufene Schäden müssen nicht zwangsläufig zum Zelltod führen, solange die Zelle bestimmte DNA-Reparaturmechanismen aktivieren kann [108]. Dote et. al. konnte z.B. zeigen, dass bei Tumorzellen, welche mit dem HSP90-Inhibitor 17-DMAG (*17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin*) behandelt wurden, keine Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen stattfand und so eine erhöhte Radiosensitivität vorlag. Es wurde postuliert, dass dies mit der Phosphorylierung der DNA-Proteinkinase und der Unterdrückung des DNA-Reparaturproteins ATM zusammenhängt [106].

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der durch HSP-Inhibitoren beeinflusst wird, beinhaltet die Tumorangiogenese. In bestrahlten Tumorzellen wurde eine erhöhte Expression von HIF-1α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) gefunden, was anschließend zur Hochregulierung von

VEGF und somit zu einer Förderung der Angiogenese und verlängertem Tumorüberleben führte [105, 111]. HIF-1α wird von HSP90 stabilisiert und es hat sich gezeigt, dass die Ausschaltung von HSP90 zur Unterdrückung der Tumorvaskularisierung führt [112, 113].
Ähnliche Ergebnisse wurden von Hadchity et. al. bei radioresistenten HNSCC SQ20B Zellen, verursacht durch Inhibition von HSP27, gezeigt. Durch die Inhibition von HSP27 mittels OGX-427 wurde eine deutliche Zunahme der Radiosensitivität beobachtet. In der Studie wurde zum einen eine Abnahme der Vaskularisierung beobachtet, was durch eine Inhibition von Akt über verminderte Expression von HSP27 vermittelt werden könnte. Akt wiederum reguliert VEGF und hat somit einen Einfluss auf die Angiogenese. Weiterhin wurde in dieser Studie auch eine deutliche Zunahme des Apoptose-vermittelten Zelltodes und eine Abnahme der Toleranz gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen, was mit einer signifikanten Verringerung der Glutathionkonzentration im Tumorgewebe assoziiert werden konnte [114].

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Einfluss externer Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten, Proliferation, Apoptose und die Expression der Hitzeschockproteine HSP27, Phospho-HSP27 und HSP70 in Zelllinien vom oralen Plattenepithelkarzinom und Zellen der kutanen Wundheilung (HDMEC, NHF) *in vitro* analysiert werden.
Die verwendeten OSCC-Zelllinien wurden noch nicht auf derartige Parameter untersucht.
Bestrahlung ist als effektive Tumortherapie etabliert, wobei die individuelle Radiosensitivität des Tumors sowie des umliegenden Gewebes eine entscheidende Rolle für den Therapieerfolg spielt. Hitzeschockproteine können verschiedene zellspezifische Mechanismen beeinflussen, die Auswirkungen auf die Apoptose und Proliferation der Zellen nach erfolgter Strahlentherapie haben können.
Ziel dieser Arbeit war es daher, die Reaktion von gesunden Zellen im Vergleich zu Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms auf verschiedene Strahlungsdosen zu untersuchen und mögliche Assoziationen mit Veränderungen in der intrazellulären Zusammensetzung von Hitzeschockproteinen zu charakterisieren.

2. Material

2.1 Geräte

Bezeichnung	Produktname	Firma/Herkunft
Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus/ Hanau, *Germany*
Linearbeschleuniger	Primus Linear accelerator mit MLC (3 Gy/min)	Siemens/ Nürnberg, *Germany*
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss/ Jena, *Germany*
Sterilbank	Laminar Flow Werkbank Hera safe	Kendro/ Hamburg, *Germany*
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand/ Wertheim, *Germany*
Tischzentrifuge	miniSpin	Eppendorf/ Hamburg, *Germany*
Zentrifuge	Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf/ Hamburg, *Germany*
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries/ New York, *USA*
Photometer	Varioskan Flash	Thermo Fisher Scientific/ Waltham, *USA*
Multipipette	Multipette® M4	Eppendorf/ Hamburg, *Germany*
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf/ Hamburg, *Germany*
Zellkultur-Absaugsystem	Vacusafe	Integra/ Biebertal, *Germany*
PCR Cycler	T3000 Thermocycler	Biometra/ Göttingen, *Germany*

2.2 Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma/Herkunft
OSCC-Nährmedium	87% DMEM 10% fetales Kälberserum (FKS) 2% L-Glutamine	Pan Biotech/ Aidenbach, *Germany* Gibco® Life Technologies/ Carlsbad, California, *USA* Gibco® Life Technologies/ Carlsbad, California,

	1% Penicillin/Streptomycin	*USA* Gibco® Life Technologies/ Carlsbad, California, *USA*
OSCC-Einfriermedium	80% DMEM 10% FKS 10% DMSO	Pan Biotech/ Aidenbach, *Germany* Gibco® Life Technologies/ Carlsbad, California, *USA* SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
NHF-Nährmedium Glucosegehalt: 4,5g/l	89% DMEM/F-12 (1:1) 10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin	Gibco® Life Technologies/ Carlsbad, California, *USA* Invitrogen/ Carlsbad, California, *USA* SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
NHF-Low-Nährmedium Glucosegehalt: 1g/l	89% DMEM/F-12 (1:1) 10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin	Gibco® Life Technologies/ Carlsbad, California, *USA* Invitrogen/ Carlsbad, California, *USA* SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
NHF-Einfriermedium	50% NHF-Nährmedium 40% FKS 10% DMSO	Gibco® Life Technologies/ Carlsbad, California, *USA* Invitrogen/ Carlsbad, California, *USA* SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
HDMEC-Nährmedium	Endothelial Cell Growth Medium MV (C-22020) Supplementmix (C-39225)	PromoCell/ Heidelberg, *Germany*
HDMEC-Einfriermedium	Cryo-SFM	PromoCell/ Heidelberg, *Germany*

2.3 Verwendete Zelllinien

2.3.1 OSCC

Bezeichnung	Primärherd	TNM-Klassifikation	Differenzierungsgrad
PCI 1	Larynx	T2N0M0	moderately well [115]
PCI 4	Zungengrund	T3N0M0	moderately well [115]
PCI 9	BOT	T4N3M0	moderately [115]
PCI 13	Retromolares Dreieck	T4N1M0	poorly [115]
PCI 52	Aryepiglottische Falte	T2N0M0	moderately well [115]
PCI 68	Zunge	T4N0M0	well [115]

Herkunft: Prof. T. L. Whiteside (University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, *USA*); zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Richard Bauer von der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg

2.3.2 NHF und HDMEC

Zellart	Firma/Herkunft
NHF	Bio Whittaker Europe / Verviers, *Belgium* (Bestell-Nr. CC-2511)
HDMEC	PromoCell / Heidelberg, *Germany* (Bestell-Nr. C-12212, CH-B1 0090705)

2.4 Verwendete Kits

Bezeichnung	Produktname	Firma/Herkunft
ELISA Kit	R&D DuoSet®IC Human Total HSP27: DYC1580-5 Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A: DYC1663-5 Human/Mouse/Rat Phospho-HSP27: DYC2314-5	R&D Systems/ Minneapolis, *USA*
BrdU	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Bestell-Nr. 11647229001)	Roche Diagnostics/ Mannheim, *Germany*
Caspase 3/7	Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay: G7791	Promega/ Madison, *USA*

DNeasy Blood & Tissue Kit	Cat No./ID 69504	QUIAGEN/ Hilden, *Germany*
PCR Kit	HotStarTaq® Plus DNA Polymerase: Cat. No. 203603 dNTP Mix, PCR Grade, 10mM Cat. No. 201900	QUIAGEN/ Hilden, *Germany*

2.5 Sonstige Materialien

Bezeichnung	Eigenname	Firma/Herkunft
6-Wellplatten	Cellstar	Greiner bio-one/ Frickenhausen, *Germany*
96-Wellplatten (BrdU)	96-well BD Falcon, 370µl, clear/white plate	Greiner bio-one/ Frickenhausen, *Germany*
96-Wellplatten (Caspase, Resazurin)	96-well BD Falcon, 370µl, black plate	Greiner bio-one/ Frickenhausen, *Germany*
96-Wellplatten (ELISA)	96-well NUNC F-bottom MicroWell plate	Thermo Fisher Scientific/ Waltham, *USA*
Einfrierröhrchen	System 100™ Cryogenic Vials	Nalgene/ Gehrden, *Germany*
Zentrifugenröhrchen	BD Falcon™ 15ml Conical Tube 17x120 style 50ml Cellstar Tubes	Greiner bio-one/ Frickenhausen, *Germany*
1,5ml/2ml-Reaktionsgefäß	Safe-lock Tubes (1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf/ Hamburg, *Germany*
Spritzenvorsatz-Filter 0,2µm	Minisart® high flow	Sartorius/ Göttingen, *Germany*
Pipettenspitzen für Multipette	Combitips advanced®	Eppendorf/ Hamburg, *Germany*
Pipettenspitzen	epT.I.P.S	Eppendorf/ Hamburg, *Germany*
Serologische Pipetten steril (10ml, 25ml)	Cellstar Serological Pipette, sterile	Greiner bio-one/ Frickenhausen, *Germany*
Handschuhe	Sterling Nitrile KC3000	Kimberly-Clark/ Dallas, *USA*
Parafilm	Parafilm M®	Pechiney/ Düsseldorf, *Germany*
Neubauer Zählkammer	Tiefe 0,1mm 0,0025mm^2	Brand/ Wertheim, *Germany*
Zellkulturflaschen	Cellstar cell culture flasks 25mm^2, 75mm^2	Greiner bio-one/ Frickenhausen, *Germany*

2.6 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma/Herkunft
Agarose		Biozym/ Hessisch Oldendorf, *Germany*
10x PBS	80,145 g/l NaCl 2,0115 g/l KCL 11,502 g/l Na_2HPO_4 2,15 g/l KH_2PO_4 in A. dest.	Roth/ Karlsruhe, *Germany*
PBS steril	Dulbecco´s 1x PBS	SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
Trypsin		PromoCell/ Heidelberg, *Germany*
Trypsin 0,04%/EDTA 0,03% (TE)		PromoCell/ Heidelberg, *Germany*
Trypsin Neutralizing Solution (TNS)		PromoCell/ Heidelberg, *Germany*
Waschpuffer	0,05% Tween® 20 in 1x PBS steril (pH 7,2-7,4)	SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA* SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
Triton™ X-100		SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
Streptavidin	Streptavidin-HRP	R&D Systems/ Minneapolis, *USA*
BSA (Bovines Serumalbumin), Fraktion V		Biomol/ Hamburg, *Germany*
Tween® 20		SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
Block Buffer	1% BSA 0,05% NaN_3 in PBS (pH 7,2-7,4)	Biomol/ Hamburg, *Germany*
IC Diluent #1	1% BSA in PBS (pH 7,2-7,4), 0,2µm filtriert	Biomol/ Hamburg, *Germany*
IC Diluent #4	1mM EDTA 0,5% Triton™ X-100 in PBS (pH 7,2-7,4)	Roth/ Karlsruhe, *Germany* SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
Lysis Buffer #12	1 mM EDTA 0,5% Triton™ X-100 PhosSTOP (1 Tablette/10ml) cOmpleteMini	Roth/ Karlsruhe, *Germany* SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA* Roche Diagnostics/ Mannheim, *Germany* Roche Diagnostics/

	(1 Tablette/10ml) in PBS (pH 7,2-7,4)	Mannheim, *Germany*
Substrate Solution	1:1 Color Reagent A (H_2O_2) Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)	R&D Systems/ Minneapolis, *USA*
Stop Solution	2 N H_2SO_4	R&D Systems/ Minneapolis, *USA*
Resazurin		SIGMA-Aldrich/ St. Louis, Missouri, *USA*
PCR Marker	Quick-Load® 50 bp DNA Ladder	New England BioLabs/ Ipswich, *USA*
20x TAE-Puffer	Tris (96,8g in 500ml A. dest.) 0,5M Na_2EDTA (40ml, pH 8) Eisessig (22,8ml, 100% Essigsäure) mit A. dest. auf 1l auffüllen	AppliChem/ Darmstadt, *Germany* Roth/ Karlsruhe, *Germany* Roth/ Karlsruhe, *Germany*
Ethidiumbromid		Roth/ Karlsruhe, *Germany*

2.7 Primer

Bezeichnung	**Sequenz (5´→ 3´)**	**Position**
SPF1A	GCiCAGGGiCACAATAATGG	6582-6601
SPF1B	GCiCAGGGiCATAACAATGG	6582-6601
SPF1C	GCiCAGGGiCATAATAATGG	6582-6601
SPF1D	GCiCAAGGiCATAATAATGG	6582-6601
SPF2B-bio	GTiGTATCiACAACAGTAACAAA	6624-6646
SPF2D-bio	GTiGTATCiACTACAGTAACAAA	6624-6646

Verwendete Primer [116]

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Arbeitsbedingungen und Kultivierung der Zellen

Alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mit Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms (OSCC), normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-flow-Werkbank durchgeführt. Die Kultivierung der verschiedenen Zellkulturen erfolgte jeweils in T75-Zellkulturflaschen mit 14ml Nährmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2. Ein Mediumwechsel fand alle 3 bis 4 Tage statt. Dazu wurde das verbrauchte Medium unter Schonung des gewachsenen Zellrasens abgesaugt und wiederrum durch das gleiche Volumen an Nährmedium ersetzt.

3.1.2 Splitten und Passagieren

Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurden die verschiedenen Zellkulturen gesplittet und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten.

Dazu wurde das Nährmedium in den Zellkulturflaschen vorsichtig abgesaugt und anschließend mit jeweils ca. 10ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 1ml Trypsin zu den NHF- und OSCC-Zellkulturen bzw. 1ml TE zu den HDMEC-Zellkulturen. Die Flaschen wurden ca. 2 bis 3 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und infolge unter dem Mikroskop auf vollständiges Ablösen der Zellen kontrolliert.

Das TE der HDMEC-Zellkulturen wurde daraufhin mit 9ml TNS neutralisiert, in ein steriles Falcon überführt und in der Tischzentrifuge für 5min bei 1200rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand unter Schonung des so erhaltenen Zellpellets abgesaugt und nach Zugabe von 5 bis 10ml HDMEC-Nährmedium wieder resuspendiert.

Das Trypsin der OSCC- und NHF-Zellkulturen wurde mit 5 bis 10ml des jeweiligen Nährmediums neutralisiert, die Flasche mehrmals durchgespült und die Zellsuspension in ein steriles Falcon pipettiert.

Jeweils 10µl wurden mittels Neubauer-Zählkammer in 4 Quadranten ausgezählt:

$$\frac{gez\ddot{a}hlte\ Zellzahl\ x\ 10000}{4}$$

Anschließend wurden ca. 400.000 Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

3.1.3 Auftauen der Zellen

Zuerst wurde in T75-Zellkulturflaschen 14ml Nährmedium vorgelegt und diese im Brutschrank bei 37°C vorgewärmt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen mit den bei -80°C tiefgefrorenen Zellen möglichst zügig unter warmem Wasser aufgetaut und der Inhalt auf die Zellkulturflaschen verteilt. Diese wurden daraufhin im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Einen Tag nach der Aussaat erfolgte der erste Mediumwechsel, die nachfolgenden im Abstand von 3 bis 4 Tagen.

3.1.4 Einfrieren der Zellen

Nach dem Absaugen des Nährmediums wurde die Zellkulturflasche mit PBS gespült. Danach erfolgte die Zugabe von 1 bis 2ml Trypsin, bzw. TE zu den HDMEC-Zellen. Nach ausreichender Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C wurde der Zellrasen mit 5 bis 10ml des jeweiligen Nährmediums abgespült. Bei den HDMEC-Kulturen erfolgte zuvor wiederrum der Zwischenschritt mit Zugabe von TNS und anschließendem Abzentrifugieren analog zum Unterpunkt „3.1.2 Splitten und Passagieren“. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen für 5min bei 1200rpm zentrifugiert, der entstandene Überstand abgenommen und das Zellpellet wieder in dem zugehörigen Einfriermedium resuspendiert. Es erfolgte daraufhin die Verteilung von 400.000 bis 500.000 Zellen in jeweils 1,5ml Einfriermedium auf die Kryoröhrchen.
Die Röhrchen wurden in einer Kryokonservierungsbox unter definierten Bedingungen (Abkühlungsrate 1°C/min) eingefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

3.2 Proliferation

3.2.1 Zellzahlbestimmung im 6-Well-Plattensystem

Das Abtrypsinieren, Zentrifugieren und Auszählen der Zellen erfolgte analog dem Unterpunkt „3.1.2 Splitten und Passagieren“. Es wurden immer 50.000 Zellen pro Well jeder Zelllinie in 2ml des entsprechenden Mediums auf die vier 6-Well-Platten verteilt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37°C im Brutschrank.
48h nach Aussaat der Zellen wurde jedes Well mit zusätzlich 1ml frischem Nährmedium aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Zellen nach folgendem Schema:

unbestrahlt – 2Gy – 6Gy – 12Gy

Das Medium wurde danach durch jeweils 2ml frisches Medium ersetzt. Weitere 48h Stunden nach der Bestrahlung fanden die Auszählung der Zellen und das Gewinnen der Überstände und Zellpellets statt. Nach dem Abnehmen der 2ml Überstände wurden diese für 5min bei 10.000rpm zentrifugiert, um die vollständige Entfernung von Zellresten zu gewährleisten. Jeweils 1ml der Überstände wurde daraufhin in 1,5ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde jedes Well mit 1ml PBS gewaschen. Das Ablösen des Zellrasens erfolgte durch Zugabe von 300µl/Well Trypsin, Neutralisieren mit 700µl Nährmedium und dem Umfüllen in 1,5ml-Reaktionsgefäße. Bei den HDMEC-Zellen wurde wiederrum der Zwischenschritt mit Zugabe von TNS und Abzentrifugieren, wie in Unterpunkt „3.1.2 Splitten und Passagieren“ beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 10µl in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Zur Gewinnung der Zellpellets wurden die Reaktionsgefäße für 5min bei 1.200rpm zentrifugiert, die Überstände verworfen und die so erhaltenen Pellets bis zur Weiterverarbeitung im -80°C Schrank gelagert.

3.2.2 Proliferationsmessung mittels BrdU-Assay

Der Einfluss verschiedener Bestrahlungsdosen auf die Proliferation wurde mittels BrdU Cell Proliferation ELISA der Firma Roche analysiert, der nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

BrdU (5-bromo-2´-deoxyuridine) stellt ein chemisches Analogon zur Thymidin-Base bzw. Desoxyuridin dar. Diese Verbindung wird bei Zugabe in die Zellkulturen bei der DNA-Neusynthese anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat in die DNA eingebaut. Dabei ist die Menge an BrdU proportional zur neu gebildeten Menge an DNA. Durch einen spezifischen, enzymgekoppelten Antikörper (Ak) kann anschließend das BrdU detektiert und mittels einer Substratlösung photometrisch messbar gemacht werden. Die Farbintensität ist dabei proportional zum gebundenen Antikörper und damit auch zur Menge an BrdU. Daher können mit dieser Methode Aussagen über die relativen Proliferationskapazitäten der verschiedenen Zelllinien nach Bestrahlung getroffen werden.

Das Abtrypsinieren, Zentrifugieren und Auszählen der Zellen erfolgte analog dem Unterpunkt „3.1.2 Splitten und Passagieren“. Anschließend wurden jeweils 100µl/Well mit einer Zellzahl von 1.000 Zellen/Well in einem 3-fach Ansatz in die 96-Well Platten ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank. 48h nach der Aussaat wurde das Nährmedium mit 100µl pro Well frischem Medium aufgefüllt und darauffolgend im unter 3.2.1 erwähnten Schema bestrahlt. Die BrdU-Stocklösung wurde 1:1.000 im entsprechenden Nährmedium verdünnt. Nach der Bestrahlung wurde das Medium unter Schonung des Zellrasens abgesaugt und durch 100µl des BrdU-Ansatzes ersetzt. Hierbei wurde darüber hinaus auch ein 3-fach Blank (Medium + BrdU) hinzugefügt. Nach weiteren 48h Kultivierung im Brutschrank wurde der BrdU-Ansatz abgesaugt und durch 200µl/Well *Fix-Denat-Lösung* ersetzt, welche 30min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurde. Anschließend wurden durch Ausklopfen der Platten sämtliche Rückstände entfernt und 100µl pro Well einer 1:100 verdünnten Anti-BrdU-Ak-Lösung pro Well zugegeben, die für 60min bei RT im Dunklen inkubiert wurde. Nach erneutem Ausklopfen der Platten und Waschen mit 200-300µl/Well Waschpuffer, folgte die Zugabe von jeweils 100µl Substrat-Lösung. Nach ausreichender Farbreaktion wurde mit 25µl/Well 1M H_2SO_4 abgestoppt und die Absorptionswerte möglichst rasch im Photometer gemessen (450nm, Referenzwellenlänge 690nm).

3.2.3 Resazurin-Assay

Um die Zellviabilität beurteilen zu können, wurde in dieser Arbeit ein Resazurin-Assay verwendet. Resazurin fungiert als Redoxindikator und lässt somit indirekt Schlüsse auf die Glykolyserate lebender Zellen zu.

Nach Herstellung der Zellsuspension mit einer Konzentration von 1.000 Zellen pro 100µl, wie bereits in Unterpunkt 3.2.2 beschrieben, wurde jeweils ein 3-fach Ansatz auf die 96-Well Platten pipettiert. Nach 48h Kultivierung bei 37°C wurde vor der anstehenden Bestrahlung das Volumen der Wells um weitere 100µl Nährmedium ergänzt. Nach erfolgter Bestrahlung wurde das Medium durch 100µl frisches Medium ersetzt und jeweils bei gedämpftem Licht 10µl/Well Resazurin zugegeben. Nach 1h Inkubationszeit ohne Lichteinwirkung und bei 37°C erfolgte die photometrische Messung *(Excitation 545nm, Emission 590nm)*. Anschließend fand ein Mediumwechsel statt. Diese Schritte wurden jeweils für Messungen nach 8h und 20h nach erfolgter Bestrahlung wiederholt.

3.3 Apoptose

3.3.1 Caspase 3/7 Assay

Der Einfluss der verschiedenen Strahlungsintensitäten auf die Apoptoseaktivität wurde mittels Caspase 3/7 Assay der Firma Promega analysiert. Der Versuch wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Messung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 dient als Maß für die Aktivierung der Apoptosekaskade und ermöglicht so Aussagen über den Einfluss der Bestrahlung auf den programmierten Zelltod. Das Assayprinzip beruht auf der Zugabe eines nicht-fluoreszierenden Substrates für die Caspasen 3 und 7 in das Zellkulturmedium in einem Puffer mit zelllysierenden Eigenschaften, welches enzymatisch zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt wird. Je nach Menge der in den Zellen enthaltenen aktiven Caspasen werden unterschiedliche Mengen des fluoreszierenden Produktes gebildet und lassen Rückschlüsse auf die Apoptoseaktivität zu.

Der Versuchsansatz erfolgte bis einschließlich der Bestrahlung wie bereits unter „3.2.3 Resazurin-Assay“ beschrieben. Ein Caspase-Ansatz, bestehend aus 20µl Caspase-Reagenz,

2ml zugehörigem Puffer und 2ml Nährmedium wurde jeweils für jede Zellkultur vorbereitet. Nach der Bestrahlung wurde das alte Medium durch 100µl/Well Caspase-Ansatz ersetzt und außerdem ein 3-fach Ansatz für den Blank-Wert pipettiert. Die einzelnen photometrischen Messungen erfolgten jeweils nach 1h, 8h und 20h nach der Bestrahlung *(Exitation 499nm, Emission 521nm)*.

3.4 Proteinexpression

3.4.1 Proteinexpressionsanalyse mittels ELISA

Die Analyse der Expression der Hitzeschockproteine wurde mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Angewendet wurde das Verfahren des *Sandwich-ELISAs* über einen *Capture-* und Enzym-gekoppelten *Detection-Antibody*. Dadurch ist es möglich, durch Substratzugabe und folgendem Farbumschlag die Konzentration des gesuchten Proteins anhand einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen des Proteins photometrisch zu bestimmen.

Die im folgenden Versuch verwendeten Zellpellets wurden bereits, wie in Unterpunkt 3.2.1 beschrieben, gewonnen. In dieser Arbeit wurden die Proben auf die Hitzeschockproteine HSP27, Phospho-HSP27 und HSP70 hin untersucht. Zuerst wurden jeweils 100µl pro Well des nach Herstellerangaben in PBS gelösten *Capture Antibody* auf den 96-Well Platten verteilt und mit Parafilm abgedeckt (*Coaten* der Platten). Nach der Inkubation über Nacht, erfolgte zu Beginn die Vorbereitung der Proben:

Zu jedem Zellpellet wurden 1ml *Lysis Buffer #12* (mit Complete Mini als Proteaseinhibitor-Cocktail und PhosStop als Phosphataseinhibitor) gegeben, um die Zellen zu lysieren und so die intrazellulären Proteine herauszulösen, für 15min inkubiert und anschließend für 5min bei 13.400rpm zentrifugiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Überstände wurden abgenommen, in frische 1,5ml oder 2ml Reaktionsgefäße überführt und ggf. für die Verwendung wie folgt weiter in *IC Diluent #4* verdünnt:

Probenbezeichnung	HSP27	Phospho-HSP27	HSP70
NHF	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt
HDMEC	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt
OSCC PCI 4	1:100	unverdünnt	1:30
OSCC PCI 1, PCI 9, PCI 13, PCI 52, PCI 68	1:50	unverdünnt	1:30

• Tab. 3: Verdünnungen der Zellsuspensionen bei ELISA

Die 96-Well Platten wurden mit ca. 400µl/Well Waschpuffer, welcher durch Ausklopfen der Platten anschließend vollständig entfernt wurde, dreimal gewaschen. Danach folgte das Blockieren der Platten mittels 300µl/Well *IC Diluent #1* (BSA-Lösung) für 1,5h bei Raumtemperatur. Für den Standard wurde jeweils eine 7-Punkt-Verdünnungsreihe in *IC Diluent #4* ausgehend vom höchsten Standard [2.000pg/ml (HSP27), 4.000pg/ml (Phospho-HSP27) und 10.000pg/ml (HSP70)] hergestellt. Nach dem Blocken und erneutem Waschen wurden jeweils 100µl der Proben, des Standards und *IC Diluent #4* als Blank im Duplikat auf den 96-Well Platten verteilt, mit Parafilm abgedeckt und wiederum über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen am nächsten Tag wurden 100µl des zuvor nach Herstellerangaben in *IC Diluent #1* verdünntem *Detection Antibody* zugegeben und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Ein weiteres Waschen erfolgte und es wurde 100µl/Well Streptavidin-HRP zugegeben und die Platten bei Raumtemperatur für 20min dunkel gelagert. Anschließend, nach erneut dreimaligem Waschen, wurden 100µl/Well *Substrate Solution* eingebracht, bis zu einem ausreichenden Farbumschlag dunkel inkubiert und mit 50µl *Stop Solution* abgestoppt. Anschließend wurde möglichst zügig im Photometer bei einer Wellenlänge von 450nm und 540nm (*wavelength correction*) gemessen.

3.5 HPV-PCR

3.5.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mithilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Quiagen) über ein Säulensystem. Zuerst wurden die verschiedenen Pufferarbeitslösungen nach Anleitung hergestellt:

Puffer	Zugabe
AW1 Buffer	25ml EtOH (96-100%)
AW2 Buffer	30ml EtOH (96-100%)

• Tab. 4: Zusammensetzung Pufferarbeitslösungen für DNA-Isolierung

Direkt nach der Trypsinierung wurden die Zellen für 5 Minuten bei 300 x g (190rpm) zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in 200µl PBS resuspendiert und 20µl *Proteinase K*-Lösung hinzugefügt. Es wurden 200µl Lysepuffer zugegeben und durch Vortexen eine vollständig homogene Zellsuspension erzeugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200µl EtOH (96-100%) und erneutes Vortexen.

620µl der Proben wurden jeweils in eine Säule in einem 2ml Reaktionsgefäß pipettiert, für 1 Minute bei 6.000 x g (8.000rpm) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 500µl *AW1 Puffer* auf die Säule, wurde erneut bei >6000 x g (8000rpm) für 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500µl *AW2 Puffer*, Zentrifugieren bei 20.000 x g (14.000rpm) für 3 Minuten und das Verwerfen des Durchflusses. Die Säule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 200µl *AE Puffer* zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 6.000 x g (8.000rpm) zentrifugiert um die DNA von der Säule zu eluieren. Anschließend wurde die Konzentration bestimmt und die Proben möglichst zügig bei -80°C tiefgefroren.

3.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur selektiven Amplifizierung bestimmter Nukleinsäuresequenzen mittels sequenzspezifischer Primer. Die PCR und anschließende Agarose-Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit zum Nachweis einer möglichen HPV-Infizierung der OSCC-Zelllinien durchgeführt.

Zuerst wurde folgender Ansatz als Mastermix für jede Probe hergestellt:

Menge	**Bezeichnung**
10 µl	PCR-Puffer (CoralLoad)
2 µl	dNTP Mix
4 µl	Forward-Primer (SPF1A, SPF1B, SPF1C, SPF1D)
2 µl	Reverse-Primer (SPF2B, SPF2D)
0,5 µl	Taq-Polymerase

• Tab. 5: Zusammensetzung Mastermix für PCR

Zu diesem Ansatz, der insgesamt 18,5 µl beträgt, wurde 1 µg DNA der jeweiligen Probe hinzugefügt und das Gesamtvolumen mit molekularbiologischem Wasser auf 100 µl in PCR-Tubes ergänzt.

Anschließend wurde die PCR-Reaktion unverzüglich nach folgendem Protokoll gestartet:

Programmschritt	Zeit	Temperatur
Initial heat activation	5 min	95°C
3-step cycling:		
Denaturation	1 min	94°C
Annealing	1 min	52°C
Extension	1 min	72°C
Number of cycles	35x	
Final Extension	10 min	72°C

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben auf Eis zwischengelagert.

3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur größenspezifischen Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente wurde ein 3%iges Agarosegel mit 1x TAE-Puffer als Lösungsmittel hergestellt. Das Gel wurde zur späteren Visualisierung der PCR-Produkte mit Ethidiumbromid-Lösung (0,6 μg/ml) versetzt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszenter Farbstoff, der in die Nukleinsäuren interkaliert und durch UV-Licht angeregt wird. Jeweils 20 μl PCR-Reagenz und 10 μl Marker wurden pro Geltasche eingesetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 60V und 140mA. Abschließend wurde zur Auswertung eine digitale Aufnahme des Gels unter UV-Licht angefertigt und die Banden mit dem Größenmarker verglichen.

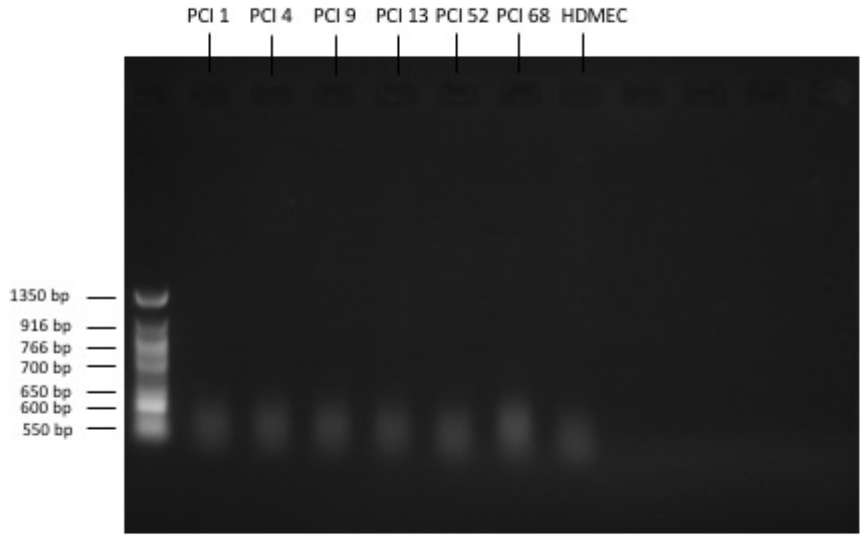
3.6 Statistische Auswertung

Die Auswertungen und Erstellung der Graphen wurden mit Microsoft Excel 2016 oder mit Graphpad prism 6 (GraphPad Software, Inc., CA 92037 USA) durchgeführt. Die statistische Analyse wurde dabei entweder unter Verwendung des Mann-Whitney-Tests für nicht verbundene Stichproben (unpaired two-tailed t-test, Vergleiche zwischen unterschiedlichen Zelltypen) oder des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben (paired two-tailed t-test, Vergleich Bestrahlungseffekte innerhalb einer Zellart) in Graphpad Prism 6 ausgeführt. Die Ergebnisse sind dabei als Balken oder Kurven bei Zeitverläufen jeweils mit Standardabweichungen dargestellt. Die Fehlerbalken in den Graphen repräsentieren die Standardabweichung aus jeweils fünf unabhängigen Versuchen. Beim Mann-Whitney-Test wurde die statistische Signifikanz auf $p<0,05$ festgelegt. Die Signifikanzwerte wurden mit * ($p<0,05$, signifikant), ** ($p<0,01$, sehr signifikant), *** ($p<0,001$, hochsignifikant) und ns

($p \geq 0{,}05$, nicht signifikant) gekennzeichnet. Beim Wilcoxon-Test wurden die Signifikanzwerte mit # ($p \leq 0{,}0625$) festgelegt und gekennzeichnet. Die Aussaat der Versuche erfolgte in Doppel- oder Dreifachansätzen in unabhängigen Wells (genauere Angaben jeweils in den Beschreibungen der Experimente unter „2. Methoden“). Der Parameter n steht dabei für die Anzahl unabhängiger Versuchsansätze.

4. Ergebnisse

4.1 HPV-PCR



• **Abb. 5: HPV-PCR der PCI-Zelllinien**

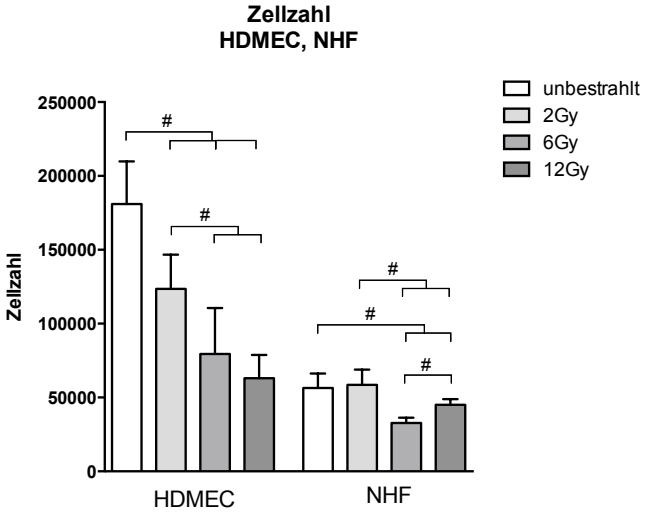
Da eine Assoziation von Plattenepitelkarzinomen des Oropharynx mit dem HPV-Virus diskutiert wird, wurden vor Beginn der Arbeiten alle Zelllinien auf das Vorliegen von HPV-DNA und somit einer HPV-Infektion überprüft.
Bei den untersuchten PCI-Zelllinien konnte keine HPV-Infektion festgestellt werden (Abb.5).

4.2 Proliferation

4.2.1 Zellzahlbestimmung im 6-Well-Plattensystem

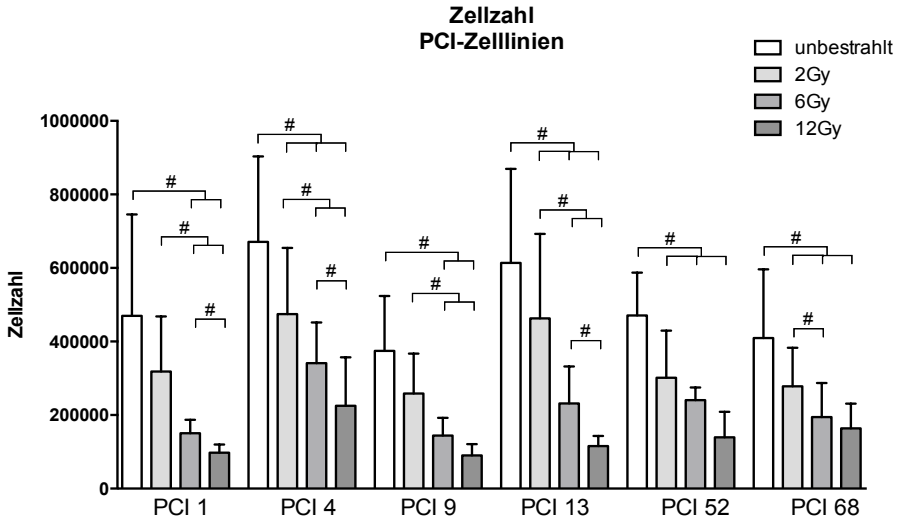
Um den Einfluss von externer Bestrahlung auf die Proliferation zu bestimmen, wurde initial die absolute Zellzahl 48h nach der Bestrahlung ausgezählt.
Die HDMEC-Zellen zeigten bei gleicher Ausgangszellzahl 96h nach Aussaat eine höhere absolute Zellzahl gegenüber den NHF-Zellen im unbestrahlten Zustand. Bei den HDMEC-Zellen ergab sich eine signifikante Abnahme der Zellzahl mit zunehmender Bestrahlungsdosis gegenüber den unbestrahlten Zellen. Beim Vergleich der HDMEC-Zellzahl nach Bestrahlung mit 6Gy und 12Gy zu den mit 2Gy bestrahlten HDMEC-Zellen war wiederum eine signifikante Abnahme zu beobachten. Bei der Betrachtung der NHF-Zellen ist ein divergierendes

Wachstumsmuster zu erkennen. Hier ergab sich eine signifikante Abnahme der Zellzahl der mit 6Gy und 12Gy bestrahlten Zellen sowohl gegenüber den unbestrahlten, als auch den mit 2Gy bestrahlten NHF-Zellen. Interessanterweise zeigt sich wiederrum ein signifikanter Anstieg der Zellpopulation von 6Gy nach 12Gy (Abb. 6).



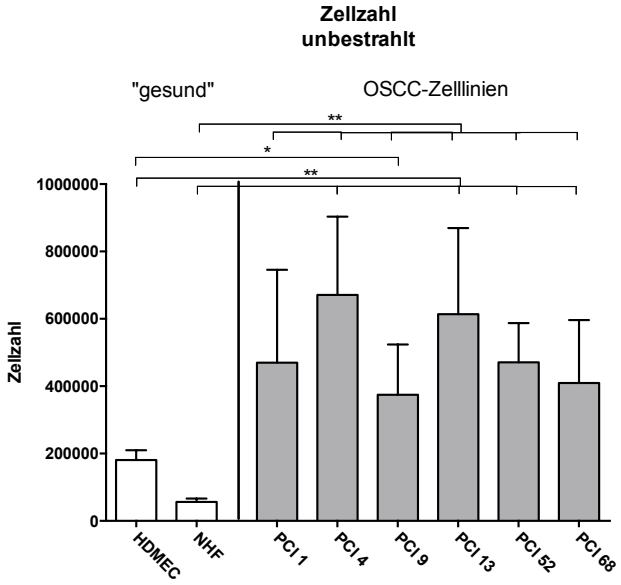
• **Abb. 6: Einfluss externer Bestrahlung auf die Zellzahl von HDMEC- und NHF-Zellen.** Die absoluten Zellzahlen von HDMEC- und NHF-Zellen wurden 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Neubauerkammer bestimmt. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Bei den OSCC-Zelllinien fällt eine relativ einheitliche Reaktion hinsichtlich der verschiedenen Strahlungsdosen auf. Bei den Zellen der PCI 1-Linie sind die Zellzahlen der mit 12Gy und 6Gy bestrahlten Zellen gegenüber denen mit 2Gy und den unbestrahlten Zellen signifikant verringert. Eine weitere signifikante Abnahme der Zellzahl zeigt sich von 6Gy nach 12Gy. Bei PCI 4 ist die Reduktion der Zellzahl nicht nur bei den Strahlungsdosen 12Gy, 6Gy und 2Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle signifikant, sondern auch im Vergleich zu 2Gy. Wie auch bei PCI 1 zeigt sich eine weitere signifikante Abnahme von 6Gy nach 12Gy. Bei den PCI 9-Zellen sind die Zellzahlen wiederum bei den Strahlungsdosen 12Gy und 6Gy gegenüber 2Gy und der unbestrahlten Kontrolle signifikant verringert. Das Verhalten der PCI 13-Zelllinie ist analog zu PCI 4. Die PCI 52-Zellen weisen eine signifikante Abnahme der absoluten Zellzahl von 12Gy, 6Gy und 2Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf. Das gleiche Muster ist auch bei den PCI 68-Zellen zu beobachten, wobei sich eine weitere signifikante Abnahme bei einem Dosisanstieg von 2Gy nach 6Gy darstellt (Abb. 7).



• **Abb. 7: Einfluss externer Bestrahlung auf die Zellzahl der PCI-Zelllinien.** Die absoluten Zellzahlen der Plattenepithelkarzinomzelllinien wurden 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Neubauerkammer bestimmt. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Bei dem Vergleich der absoluten Zellzahlen der unbestrahlten Zellkulturen fällt zuallererst die deutlich höhere Zellzunahme der Krebszellen im Gegensatz zu HDMEC und NHF über den Beobachtungszeitraum auf. Ohne Bestrahlungseinfluss ist die absolute Zellzahl aller PCI Linien 96h nach Aussaat signifikant höher verglichen mit den aus gesundem Gewebe stammenden Zelllinien NHF und HDMEC (Ausnahme HDMEC – PCI 1 aufgrund der höheren Standardabweichung). Der Vergleich von HDMEC und NHF zeigt eine signifikant höhere Zellzahl von HDMEC unter unbestrahlten Bedingungen (Abb. 8).



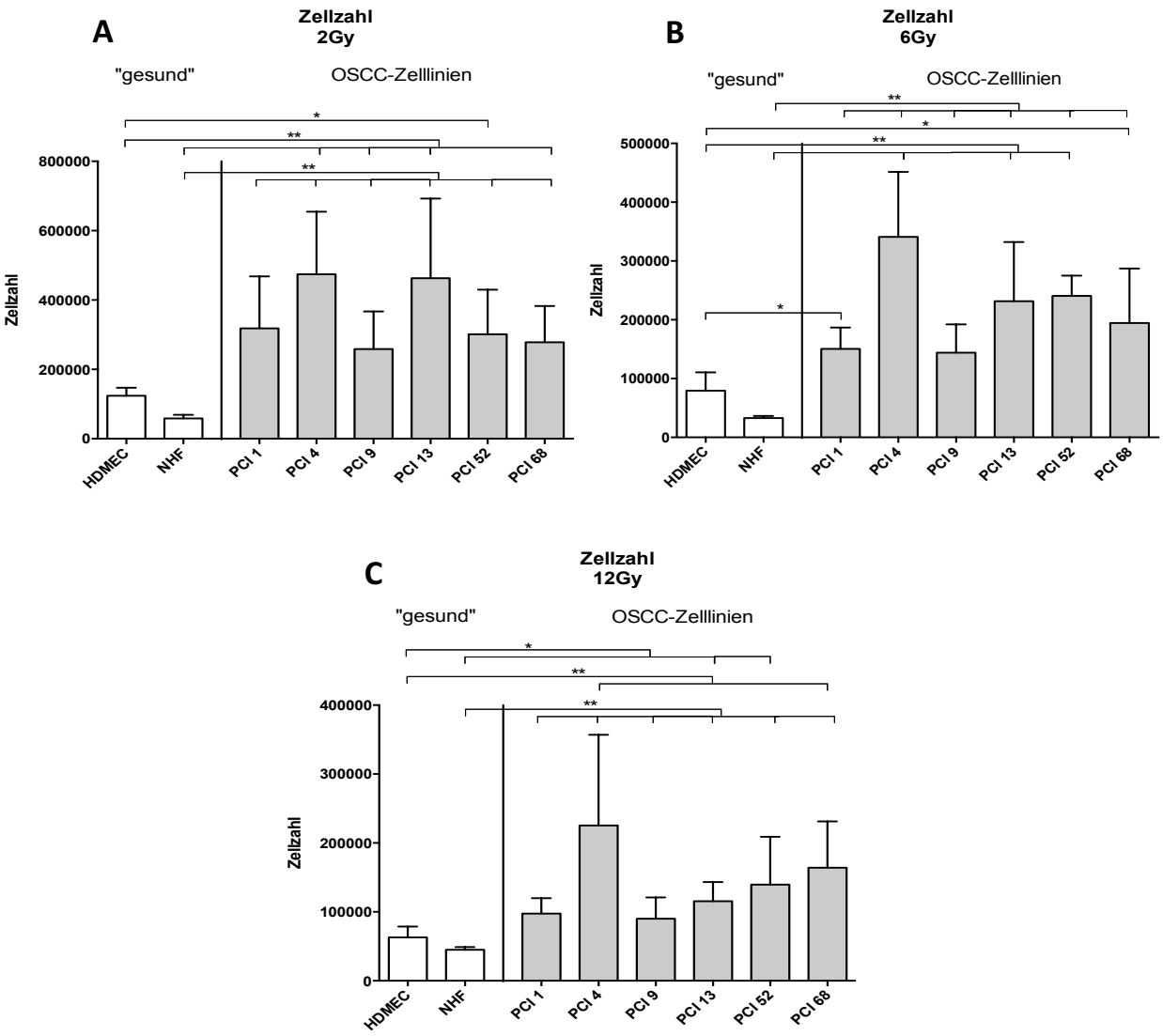
• **Abb. 8: Vergleich der Zellzahlen der unbestrahlten Kontrollen von PCI-Zelllinien, HDMEC- und NHF-Zellen.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Nach der Bestrahlung mit 2Gy zeigen sich signifikant (p=0,0079) höhere Zellzahlen aller OSCC-Zelllinien gegenüber NHF. Auch beim Vergleich von HDMEC und PCI 52 (p=0,01589) sowie zwischen HDMEC und PCI 4, PCI 9, PCI 13 und PCI 68 (p=0,0079) lassen sich signifikant erhöhte Zellzahlen auf Seiten der Tumorzelllinien erkennen. Die Zellzahl der NHF-Zellen ist wiederum, wie schon bei den unbestrahlten Zellen, signifikant (p=0,0079) gegenüber HDMEC verringert (Abb. 9).

Nach Bestrahlung mit 6Gy zeigt sich eine signifikant erhöhte Zellzahl von PCI 1 (p=0,0317), bzw. von PCI 4, PCI 13, und PCI 52 (p=0,0079) gegenüber HDMEC. NHF ist dabei wieder signifikant (p=0,0079) verringert. Die OSCC-Zelllinien weisen nach dieser Strahlendosis wieder eine signifikant (p=0,0079) höhere Zellzahl als NHF auf (Abb. 9).

Das gleiche Ergebnis lässt sich auch nach der Bestrahlung mit 12Gy beobachten. Gegenüber HDMEC sind die Zellzahlen von PCI 13, PCI 52 (p=0,0159) und von PCI 4 und PCI 68 signifikant (p=0,0079) erhöht. NHF zeigt dabei eine signifikant (p=0,0397) verringerte Zellanzahl im Vergleich mit HDMEC (Abb. 9).

Insgesamt lässt sich auch der Trend erkennen, dass PCI 4 mit steigender Bestrahlungsdosis die höchsten Zellzahlen aufweist.



• **Abb. 9: Vergleich der Zellzahlen nach externer Bestrahlung von PCI-Zelllinien, HDMEC- und NHF-Zellen. a** nach Bestrahlung mit 2Gy. **b** nach Bestrahlung mit 6Gy. **c** nach Bestrahlung mit 12Gy. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

4.2.2 Proliferationsmessung mittels BrdU-Assay

Um genauere Aussagen über das Proliferationsverhalten der verschiedenen Zellen mit und ohne Bestrahlung treffen zu können, wurde eine BrdU-Inkorporationsassay durchgeführt, der auf der relativen DNA-Neusynthese beruht.

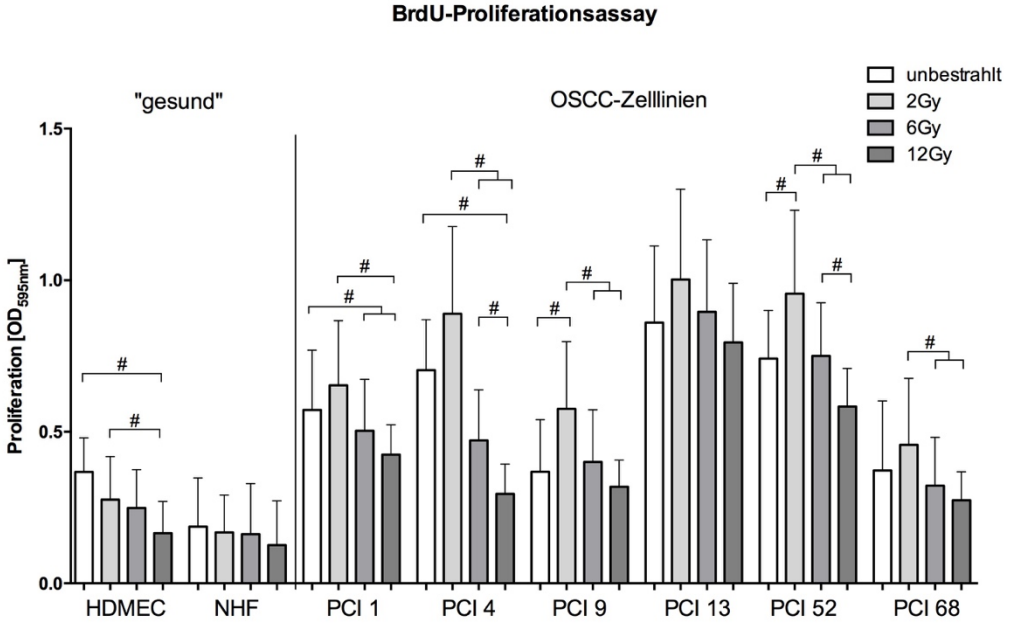
Bei den HDMEC-Zellen findet sich eine signifikante Abnahme der Proliferation durch Bestrahlung mit 12Gy verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle, ebenso zwischen 2Gy und 12Gy. Bei den NHF-Zellen lässt sich kein Einfluss einer steigenden Strahlungsdosis auf die Proliferation beobachten.

Bei PCI 1 ergibt sich eine signifikant verringerte Proliferation nicht nur zwischen den unbestrahlten Zellen und 6Gy bzw. 12Gy, sondern auch zwischen 2Gy und 12Gy. Bei PCI 4 ist

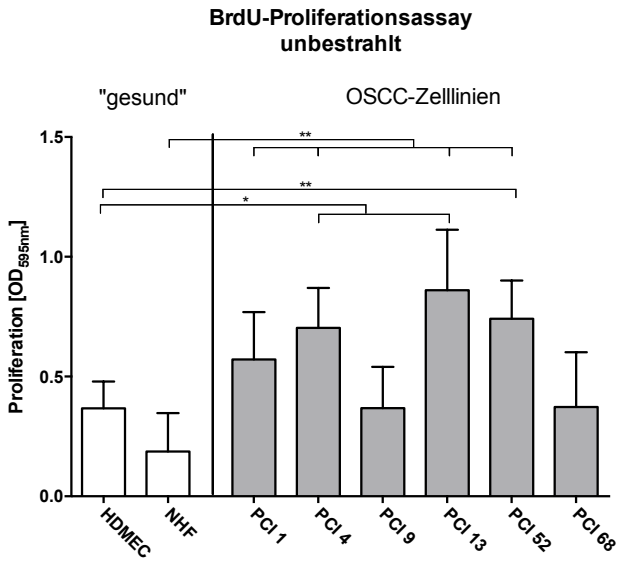
die Proliferation, der mit 12Gy bestrahlten Zellen gegenüber 6Gy, 2Gy und der unbestrahlten Kontrolle, signifikant verringert. Darüber hinaus ist eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate von 2Gy nach 6Gy ersichtlich. In PCI 9-Zellen wird durch die Bestrahlung mit 2Gy im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen eine signifikant höhere Proliferationsrate induziert. Durch weitere Erhöhung der Strahlungsdosis auf 6 und 12Gy wird die Proliferation, verglichen mit einer Dosis von 2Gy, gehemmt. Auch bei PCI 52 ist eine signifikante Zunahme der Proliferation von der unbestrahlten Kontrolle nach 2Gy zu beobachten. Eine signifikante Abnahme findet bei 2Gy im Vergleich zu 6Gy und 12Gy, sowie zwischen 6Gy und 12Gy statt. Bei PCI 68 ist eine signifikante Abnahme der Proliferation von 6Gy und 12Gy im Vergleich zu den mit 2Gy (0,457) bestrahlten Zellen ersichtlich.

Bei der Proliferationsmessung mittels BrdU-Assay 48h nach der Bestrahlung zeigt sich allgemein eine wesentlich höhere Proliferationsrate der OSCC-Zelllinien gegenüber den HDMEC und NHF-Zellen (Abb. 10).

Insgesamt ist sehr auffällig, dass bei jeder der OSCC-Zelllinien ein Anstieg der Proliferation zwischen der unbestrahlten Kontrolle und 2Gy stattfindet. So ist die Proliferation zwischen den unbestrahlten und den mit 2Gy bestrahlten Zellen bei PCI 1 um 14,22%, bei PCI 4 um 26,44%, bei PCI 9 um 56,42%, bei PCI 13 um 16,53%, bei PCI 52 um 28,93% und bei PCI 68 um 22,65% angestiegen. Ein Rückgang der Zellproliferation zeigt sich daher erst bei höheren Bestrahlungsdosen (6Gy, 12Gy).

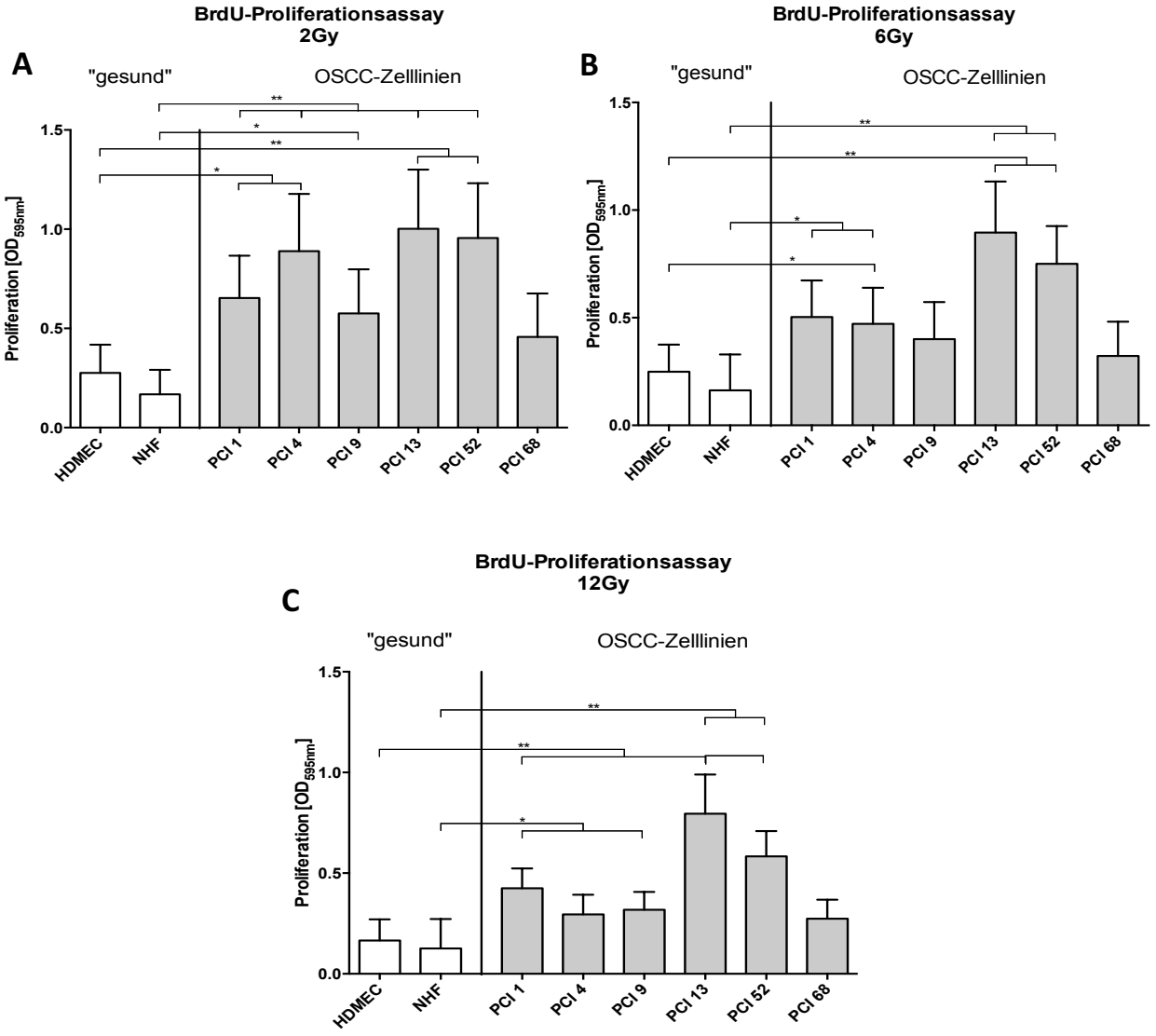


• **Abb. 10: Einfluss externer Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten der PCI-Zelllinien, NHF und HDMEC.** Die Proliferation wurden 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels BrdU-Inkorporationsassay photometrisch bestimmt. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5



• **Abb. 11: Vergleich der des Proliferationsverhaltens der unbestrahlten Kontrollen von PCI-Zelllinien, HDMEC und NHF.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Bei dem Vergleich der Zelllinien untereinander kann man eine signifikant (p=0,0159) erhöhte Proliferation der unbestrahlten PCI-Zelllinien 4 und 13 gegenüber HDMEC feststellen. Außerdem ist die Proliferation im Vergleich zu HDMEC bei PCI 52 signifikant (p=0,0079) erhöht. PCI 1, PCI 4, PCI 13 und PCI 52 haben signifikant (p=0,0079) erhöhte Proliferationswerte im Vergleich zu NHF-Zellen (Abb. 11).



• **Abb. 12: Vergleich des Proliferationsverhaltens nach externer Bestrahlung von PCI-Zelllinien, HDMEC und NHF. a** nach Bestrahlung mit 2Gy. **b** nach Bestrahlung mit 6Gy. **c** nach Bestrahlung mit 12Gy. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

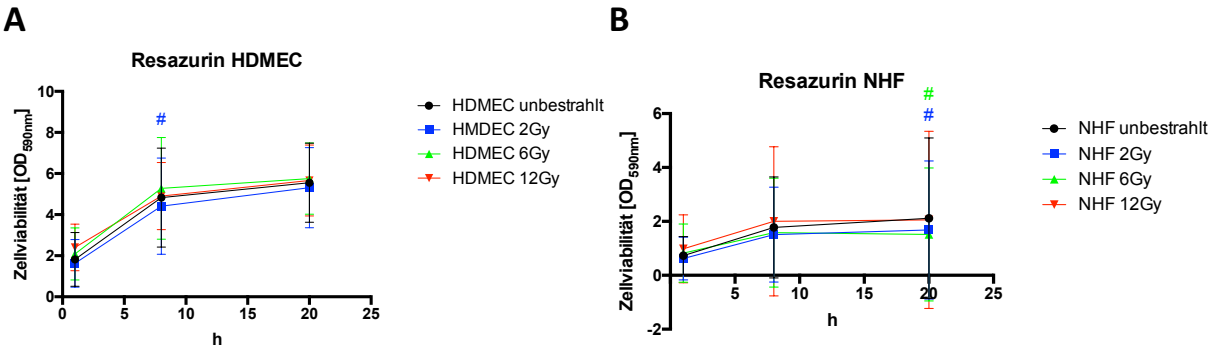
Wie bereits bei den unbestrahlten Zellen lässt sich nach der Bestrahlung mit 2Gy eine signifikant (p=0,0079) erhöhte Proliferation von PCI 1, PCI4, PCI 9, PCI 13 und PCI 52 im Vergleich zu NHF beobachten. Im Vergleich zu HDMEC sind die Proliferationswerte der Zelllinien PCI 13 und PCI 52 (p=0,0079) sowie die der Zelllinien PCI 1 (p=0,0317) und 4 (p=0,0159) signifikant nach der 2Gy-Bestrahlung erhöht (Abb. 12).

Die Bestrahlung mit 6Gy bewirkt eine signifikant (p=0,0317) höhere Proliferation von PCI 4, sowie signifikant (p=0,0079) erhöhte Proliferationswerte von PCI 13 und PCI 52 gegenüber HDMEC. Ebenso sind die Proliferationen PCI 13, PCI 52 (p=0,0079) und die von PCI 1 und PCI 4 (p=0,0317) signifikant im Vergleich zu NHF erhöht (Abb. 12).

PCI 1 (p=0,0159) und 9 (p=0,0317) zeigen nach der Bestrahlung mit 12Gy signifikant höhere Proliferationswerte im Vergleich zu NHF. Die Absorptionswerte von PCI 13 und PCI 52 sind dabei ebenfalls signifikant (p=0,0079) gegenüber NHF erhöht. Des Weiteren fallen die Werte von PCI 1, PCI 13 und PCI 52 signifikant (p=0,0079) im Vergleich zu HDMEC aus (Abb. 12). Insgesamt zeigen sich bei PCI 13 im Verlauf der verschiedenen Strahlungsdosen die höchsten Proliferationswerte. Bei dieser Zelllinie beträgt die Abnahme der Proliferation ausgehend von den unbestrahlten Zellen nach 12Gy 7,56%.

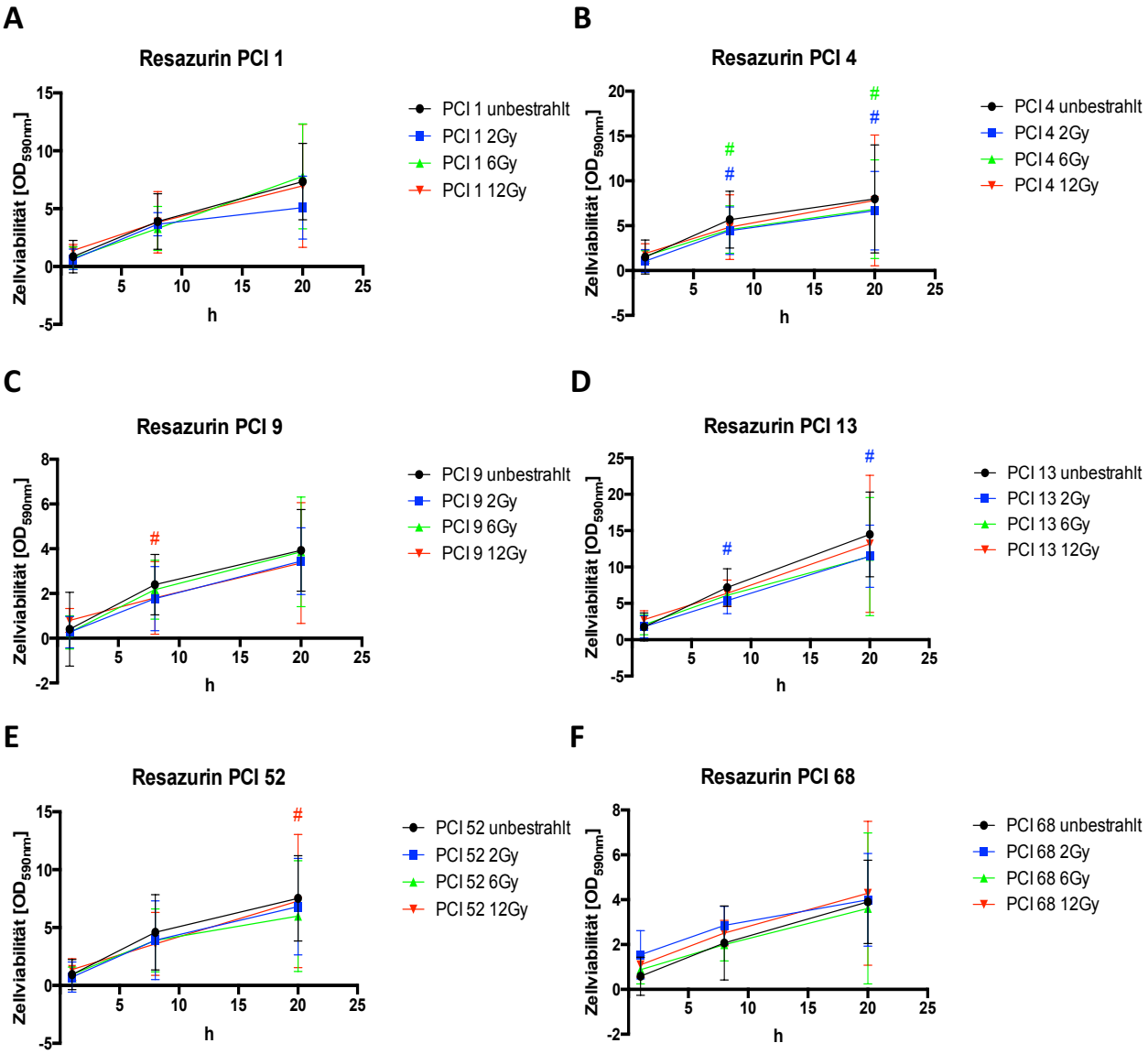
4.2.3 Resazurin-Assay

Die Bestimmung der Viabilität der Zellen mittels Resazurin-Assay erfolgte 1h, 8h und 20h nach Bestrahlung.



• **Abb. 13: Einfluss externer Bestrahlung auf die Zellviabilität von HDMEC (a) und NHF (b).** Die Viabilität von HDMEC- und NHF-Zellen wurde jeweils 1h, 8h und 20h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Resazurin-Assay photometrisch bestimmt. Kurven zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; n=5

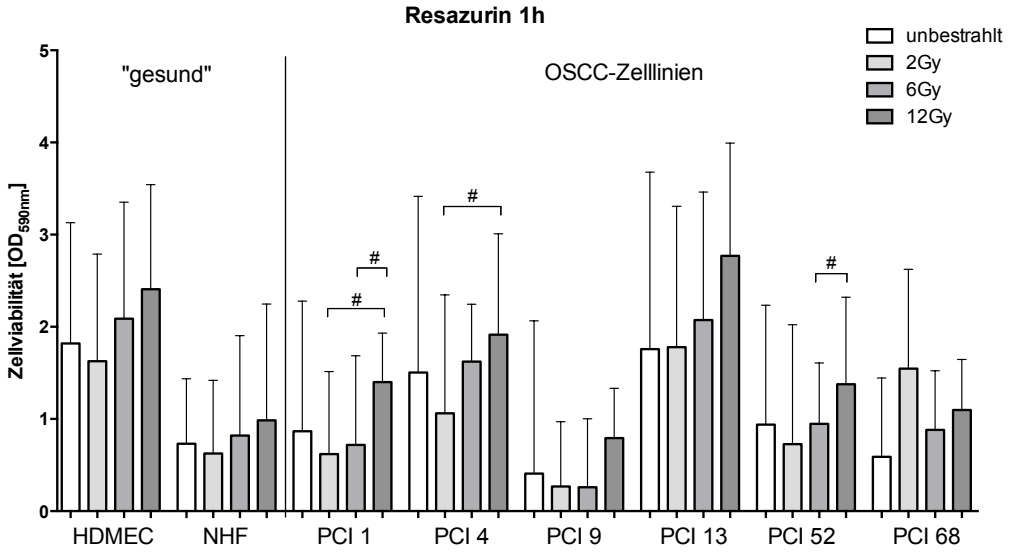
Der Einfluss der verschiedenen Strahlungsintensitäten auf den zeitlichen Verlauf der Vitalität stellt sich bei den HDMEC- und NHF-Zellen relativ ähnlich dar. Bei HDMEC lässt sich beim 8h-Messpunkt ein signifikant höherer Absorptionswert der unbestrahlten Kontrolle gegenüber den mit 2Gy bestrahlten Zellen erkennen, was einer signifikant niedrigeren Zellviabilität der bestrahlten Zellen entspricht (Abb. 13). Bei den NHF-Zellen kann man eine signifikant niedrigere Zellviabilität der mit 2Gy und 6Gy bestrahlten Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle beim 20h-Messpunkt beobachten (Abb. 13).



• **Abb. 14: Einfluss externer Bestrahlung auf die Zellviabilität von PCI-Zelllinien. a** PCI 1. **b** PCI 4. **c** PCI 9. **d** PCI 13. **e** PCI 52. **f** PCI 68. Die Viabilität der PCI-Zelllinien wurde jeweils 1h, 8h und 20h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Resazurin-Assay photometrisch bestimmt. Kurven zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; n=5

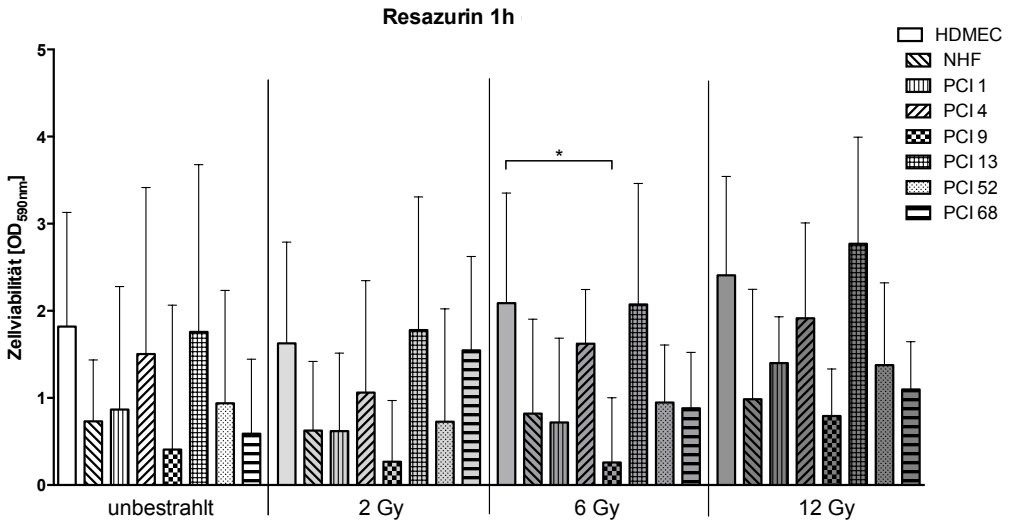
Die zeitlichen Verläufe des Einflusses von externer Bestrahlung auf die Zellviabilität der verschiedenen OSCC-Zelllinien zeigen relativ ähnliche Ergebnisse. Bei den PCI 4-Zellen lässt sich sowohl beim 8h-Messpunkt, als auch beim 20h-Messpunkt, eine signifikant niedrigere Zellviabilität der mit 2Gy und 6Gy bestrahlten Zellen, gegenüber der unbestrahlten Kontrolle erkennen (Abb. 14). Bei PCI 9 zeigt sich eine signifikante Abnahme der Viabilität nach Bestrahlung mit 12Gy nach 8h im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 14). Bei der PCI 13-Zelllinie ist die Zellviabilität nach Bestrahlung mit 2Gy am 8h-Messpunkt, gegenüber den unbestrahlten

Zellen, signifikant erniedrigt (Abb. 14). Eine weitere signifikant niedrigere Zellviabilität lässt sich bei PCI 52 am 20h-Messpunkt nach Bestrahlung mit 12Gy feststellen (Abb. 14). Insgesamt steigt die Zellviabilität der Tumorzellen mit der Zeit (1h, 8h, 20h) an.



• **Abb. 15: Einfluss externer Bestrahlung auf auf die Zellviabilität der PCI-Zelllinien, NHF und HDMEC 1h nach Strahlenexposition.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

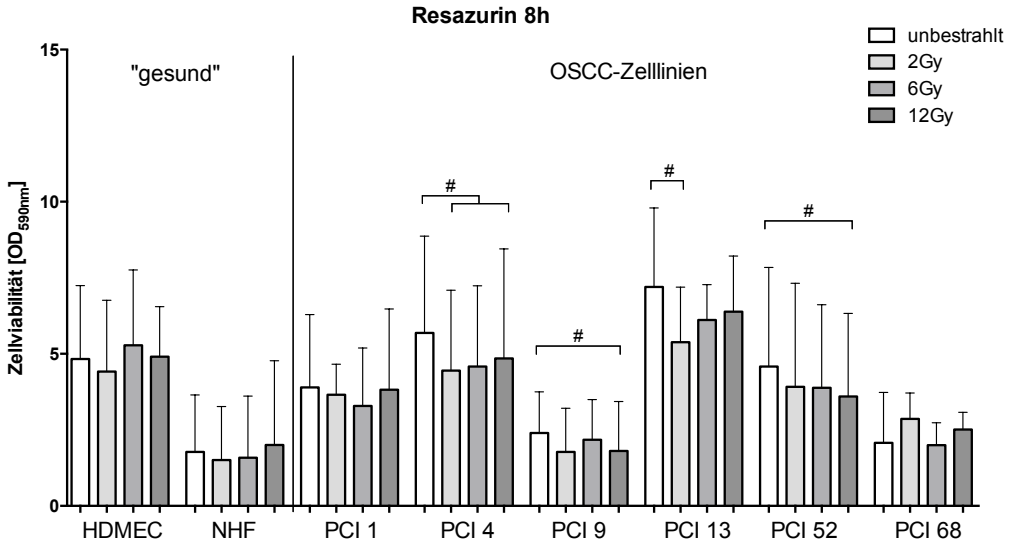
Die Bestrahlung mit 12Gy induziert 1h nach Strahlenexposition eine signifikant höhere Zellviabilität im Vergleich zu 2Gy und 6Gy bei PCI 1-Zellen. Bei PCI 4 zeigt sich wiederum eine signifikant erhöhte Viabilität von 12Gy im Vergleich zu 2Gy. Bei PCI 52 ist die Zellviabilität bei 12Gy gegenüber 6Gy signifikant erhöht (Abb. 15).



• **Abb. 16: Einfluss externer Bestrahlung auf auf die Zellviabilität der PCI-Zelllinien, NHF und HDMEC 1h nach Strahlenexposition.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

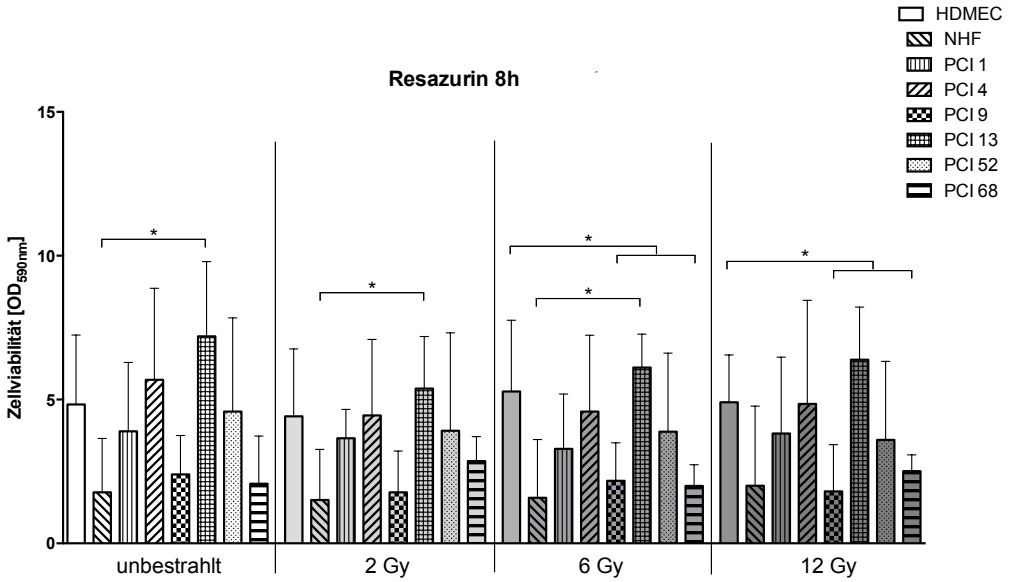
Beim Vergleich der Strahlungsintensitäten untereinander führt die Bestrahlung mit 6Gy zu einer signifikant (p=0,0317) erniedrigten Zellviabilität der PCI 9-Zelllinie im Vergleich zu HDMEC am 1h-Messpunkt. PCI 9 weist dabei im Durchschnitt die niedrigsten Werte auf (Abb. 16).

Allgemein weisen die Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchungen eine sehr hohe Variabilität und Standardabweichungen auf, die eine statistische Auswertung erschweren.



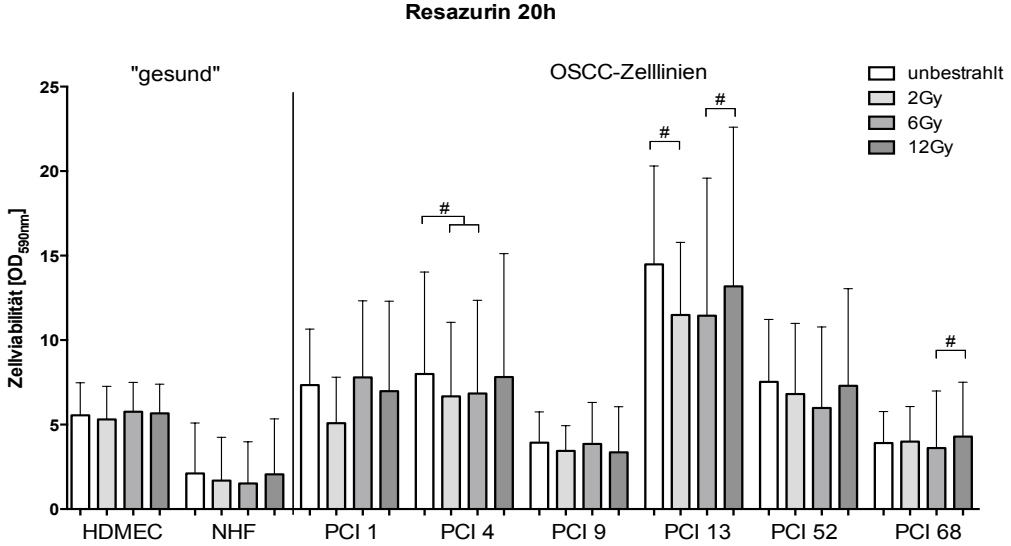
• **Abb. 17: Einfluss externer Bestrahlung auf auf die Zellviabilität der PCI-Zelllinien, NHF und HDMEC 8h nach Strahlenexposition.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Eine Stunde nach Bestrahlung kann eine Zunahme der Zellviabilität mit steigender Strahlungsintensität beobachtet werden. Bei der Messung 8h nach Bestrahlung wird dagegen z.B. bei PCI 52 eine konstante Abnahme der Viabilität deutlich. Bei den PCI 4-Zellen zeigt sich eine signifikant niedrigere Zellviabilität der mit 2Gy und 12Gy bestrahlten Zellen, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Bei PCI 9 und PCI 52 kann man eine signifikant erniedrigte Viabilität der 12Gy-Zellen gegenüber den unbestrahlten Zellen erkennen. Auch bei PCI 13 nimmt die Zellviabilität nach Bestrahlung mit 2Gy signifikant ab (Abb. 17).



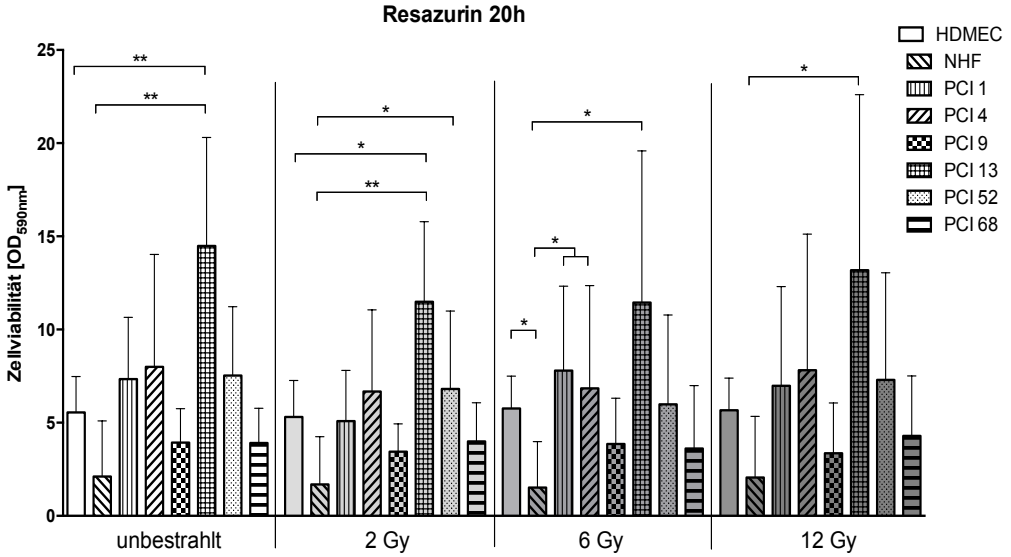
• **Abb. 18: Einfluss externer Bestrahlung auf auf die Zellviabilität der PCI-Zelllinien, NHF und HDMEC 8h nach Strahlenexposition.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Nach 8h zeigt sich eine signifikant (p=0,0159) höhere Zellviabilität der unbestrahlten PCI 13-Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten NHF-Zellen. Bei Bestrahlung mit 2Gy ist die Viabilität von PCI 13 wiederum signifikant (p=0,0317) gegenüber NHF erhöht. Bei 6Gy wiederholt sich dieser Effekt (p=0,0159). Darüber hinaus ist bei der Strahlungsdosis von 6Gy die Viabilität der PCI 9 und PCI 68-Zellen gegenüber HDMEC signifikant (p=0,0317) erniedrigt. Die Bestrahlung mit 12Gy hemmt die Zellviabilität von PCI 9 und PCI 68 gegenüber HDMEC signifikant (p=0,0317) (Abb. 18).



• **Abb. 19: Einfluss externer Bestrahlung auf auf die Zellviabilität der PCI-Zelllinien, NHF und HDMEC 20h nach Strahlenexposition.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Nach 20h erkennt man eine signifikant niedrigere Zellviabilität der mit 2Gy und 6Gy bestrahlten PCI 4-Zellen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Bei PCI 13 führt die Bestrahlung mit 2Gy zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität, gefolgt von einer signifikanten Zunahme von 6Gy nach 12Gy. Bei PCI 68 kann man ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Zellviabilität von den mit 12Gy bestrahlten Zellen im Vergleich zu 6Gy beobachten. Insgesamt zeigen sich jedoch nur sehr geringe Veränderungen bei zunehmender Strahlungsintensität (Abb. 19).



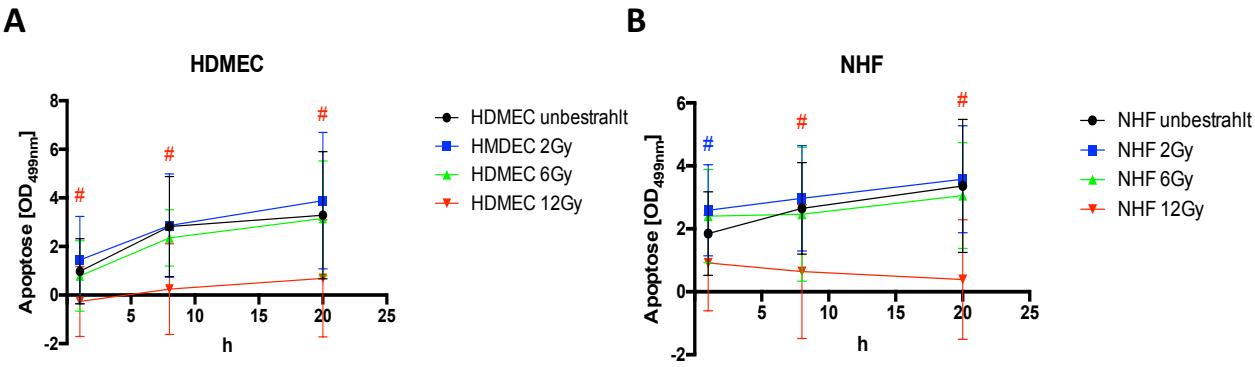
• **Abb. 20: Einfluss externer Bestrahlung auf auf die Zellviabilität der PCI-Zelllinien, NHF und HDMEC 20h nach Strahlenexposition.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Bei den unbestrahlten Zellen besitzt PCI 13 eine sehr signifikant (p=0,0079) höhere Zellviabilität im Vergleich zu NHF und HDMEC. Auch nach Bestrahlung mit 2Gy ist die Viabilität der PCI 13-Zellen signifikant gegenüber NHF (p=0,0079) und HDMEC (p=0,0159) erhöht. Darüber hinaus zeigt sich eine signifikante (p=0,0317) Erhöhung von PCI 52 im Vergleich zu NHF. Die Bestrahlung mit 6Gy hemmt die Viabilität der NHF-Zellen signifikant (p=0,0317) gegenüber den HDMEC-Zellen und führt zu einer signifikant (p=0,0317) höheren Zellviabilität von PCI 1, PCI4 und PCI 13 gegenüber NHF. Bei 12Gy zeigt sich wiederum eine signifikant (p=0,0317) erhöhte Viabilität von PCI 13 verglichen mit NHF. Insgesamt weist PCI 13 im Mittel die höchste, NHF dagegen die niedrigste Zellviabilität auf (Abb. 120).

4.3 Apoptose

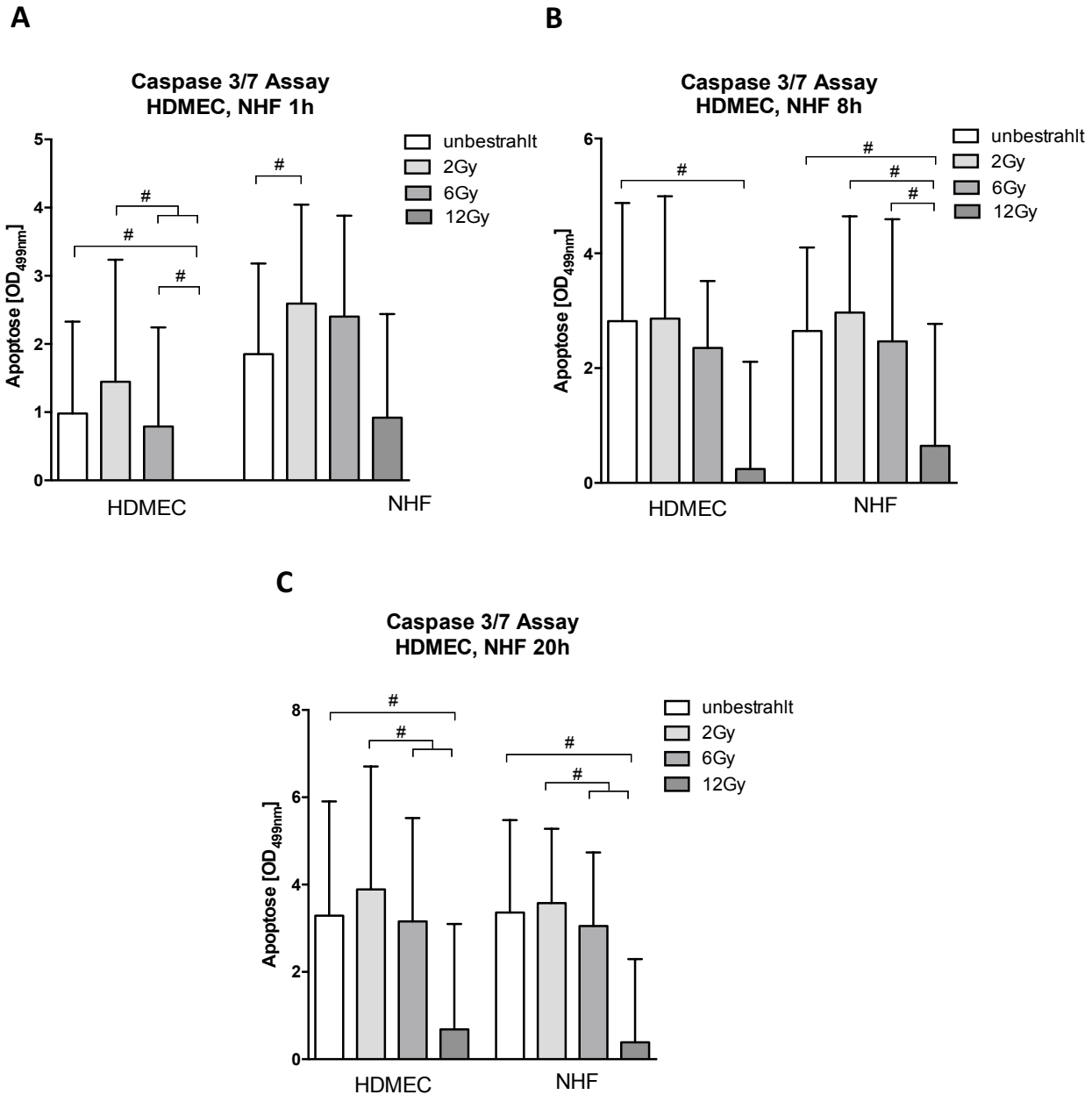
4.3.1 Caspase 3/7 Assay

Bei Bestimmung der Apoptose mittels Caspase 3/7 Assay war insgesamt keinerlei Apoptoseaktivität aller OSCC-Zelllinien messbar.



• **Abb. 21: Einfluss externer Bestrahlung auf die Apoptoseaktivität von HDMEC (a) und NHF (b).** Die Apoptoseaktivität von HDMEC- und NHF-Zellen wurde jeweils 1h, 8h und 20h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Caspase 3/7-Assay photometrisch bestimmt. Kurven zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; n=5

Die Messung der Caspaseaktivität 1h, 8h und 20h nach Bestrahlung ergibt sowohl bei den HDMEC, als auch bei den NHF-Zellen, eine deutlich gehemmte Caspaseaktivität nach Bestrahlung mit 12Gy. Bei HDMEC besteht dabei ein signifikanter Unterschied von 12Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bei allen drei Messpunkten (1h, 8h, 20h) (Abb. 20). Bei NHF lässt sich bei der Messung nach 1h eine signifikant höhere Caspaseaktivität der mit 2Gy bestrahlten Zellen im Gegensatz zur unbestrahlten Kontrolle feststellen. An den Messpunkten nach 8h und 20h zeigt sich wiederum eine signifikant erniedrigte Apoptoserate der mit 12Gy bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen (Abb. 21).



• **Abb. 22: Einfluss externer Bestrahlung auf die Apoptoseaktivität von HDMEC und NHF. a** 1h nach Strahlenexposition. **b** 8h nach Strahlenexposition. **c** 20h nach Strahlenexposition. Die Apoptoseaktivität von HDMEC- und NHF-Zellen wurde nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Caspase 3/7-Assay photometrisch bestimmt. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

1h nach Bestrahlung ergibt sich bei den HDMEC-Zellen eine signifikante Abnahme der Apoptoserate der mit 6Gy bestrahlten Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Darüber hinaus zeigt sich eine signifikante Abnahme von 12Gy und 6Gy gegenüber 2Gy, sowie von 12Gy im Vergleich zu 6Gy. Bei den Fibroblasten induziert die Bestrahlung mit 2Gy einen signifikanten Anstieg der Apoptoseaktivität (Abb. 22).

Acht Stunden nach Bestrahlung ist die Caspaseaktivität der mit 12Gy bestrahlten HDMEC-Zellen signifikant niedriger im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen. Auch bei NHF ist eine

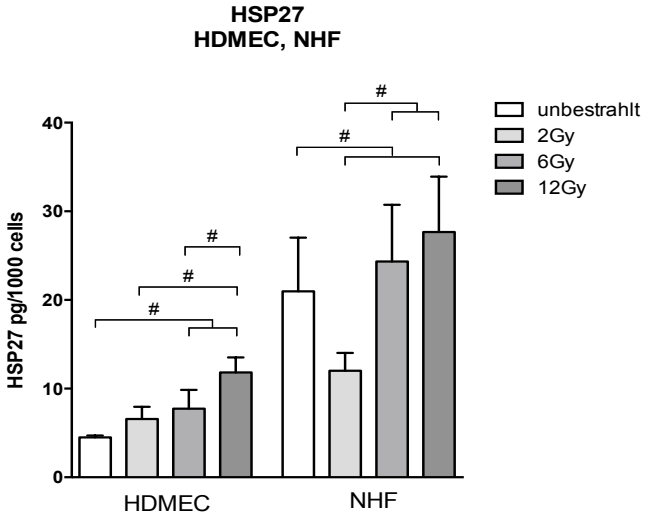
signifikante Abnahme der Apoptose von 12Gy im Vergleich zu 6Gy, 2Gy und zur unbestrahlten Kontrolle sichtbar (Abb. 22).

20h nach Bestrahlung zeigt sich bei HDMEC wiederum eine signifikant niedrigere Apoptoserate bei 12Gy gegenüber der unbestrahlten Kontrolle, sowie eine signifikante Abnahme der Caspase-Aktivität von 12Gy und 6Gy im Vergleich zu 2Gy. Dieselben signifikanten Unterschiede liegen dabei auch bei den NHF-Zellen vor (Abb. 22).

Insgesamt ist die Tendenz zu erkennen, dass sowohl bei den HDMEC-, als auch bei den NHF-Zellen im Durchschnitt ein Anstieg der Apoptose bei niedrigen Strahlungsdosen (2Gy) stattfindet, gefolgt von einer Abnahme bei höheren Strahlungsintensitäten (6Gy, 12Gy).

4.4 Proteinexpressionsanalyse mittels ELISA

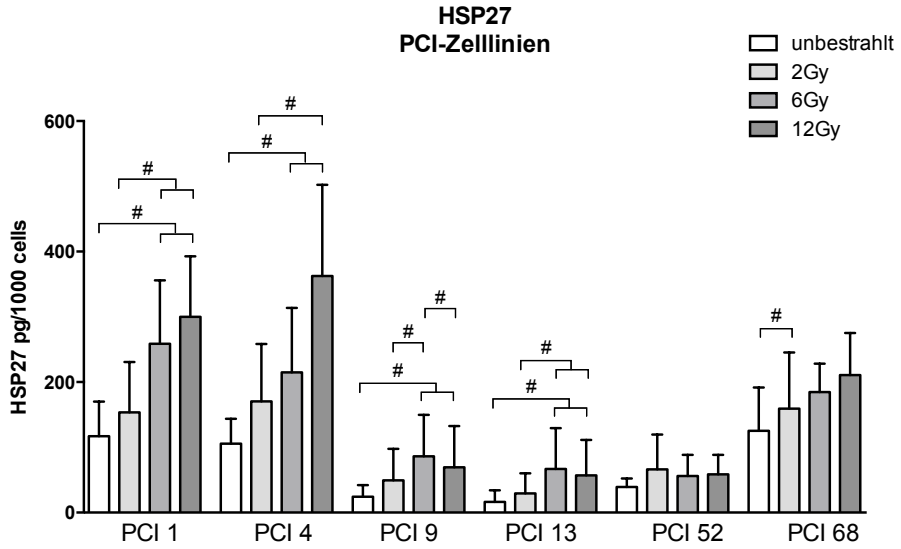
4.4.1 HSP27



• **Abb. 23: Einfluss externer Bestrahlung auf die HSP27-Expression von HDMEC und NHF.** Die HSP27-Expression von HDMEC- und NHF-Zellen wurde 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Sandwich-ELISA photometrisch bestimmt. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Die Bestrahlung bewirkt einen kontinuierlichen Anstieg der HSP27-Expression bei den HDMEC-Zellen, während bei den Fibroblasten zuerst eine Abnahme bei 2Gy zu verzeichnen ist. Die mit 6Gy und 12Gy bestrahlten HDMEC-Zellen weisen dabei eine signifikant höhere Konzentration von HSP27 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf. Des Weiteren ist bei diesen Zellen ein signifikanter Anstieg der Expression bei nach Bestrahlung mit 12Gy im Vergleich zu 2Gy und 6Gy auffällig. Bei den Fibroblasten ist zuerst eine signifikante Abnahme der HSP27-Konzentration nach Bestrahlung mit 2Gy gegenüber den unbestrahlten Zellen zu

beobachten. Die Strahlenexposition induziert bei diesen Zellen einen signifikanten Anstieg der Proteinexpression nach Bestrahlung mit 6Gy und 12Gy im Vergleich zu 2Gy sowie zwischen der unbestrahlten Kontrolle und 12Gy. Insgesamt weisen die NHF-Zellen eine höhere HSP27-Expression als die HDMEC-Zellen auf (Abb. 23).



• **Abb. 24: Einfluss externer Bestrahlung auf die HSP27-Expression von PCI-Zelllinien.** Die HSP27-Expression von PCI-Zelllinien wurde 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Sandwich-ELISA photometrisch bestimmt. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Bei den OSCC-Zelllinien ist auffällig, dass PCI 1, PCI 4 und PCI 68, ähnlich wie HDMEC, mit steigender Strahlungsintensität einen kontinuierlichen Anstieg der HSP27-Proteinkonzentration aufweisen. PCI 9 und PCI 13 zeigen dagegen einen Anstieg bis zur Strahlungsdosis von 6Gy, gefolgt von einer Abnahme bei 12Gy.

Bei PCI 1 findet ein signifikanter Anstieg der HSP27-Konzentration von der unbestrahlten Kontrolle und 2Gy im Vergleich zu 6Gy und 12Gy statt. Die HSP27-Expression ist bei den mit 12Gy bestrahlten Zellen 2,56-fach höher als bei den unbestrahlten Zellen.

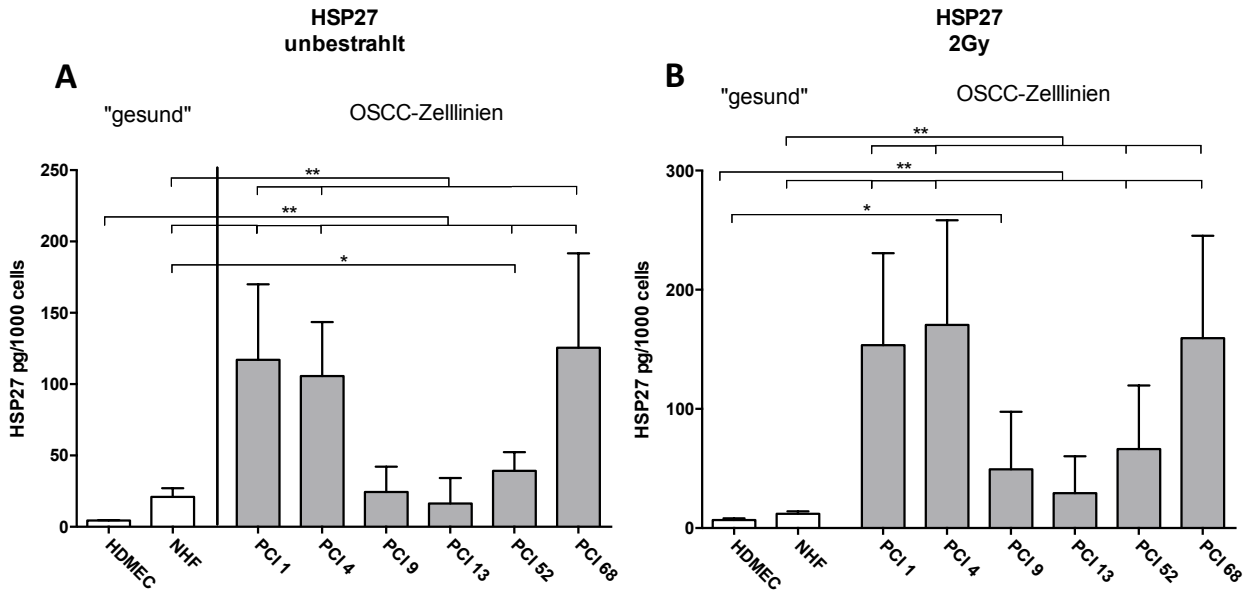
Auch bei PCI 4 ist eine signifikant höhere Expression von HSP27 nach Bestrahlung mit 6 und 12Gy gegenüber den Kontrollzellen zu erkennen. Der Anstieg von 2Gy nach 12Gy ist ebenfalls signifikant. Bei dieser Zelllinie ist die HSP27-Konzentration bei den mit 12Gy bestrahlten Zellen im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 3,43 erhöht.

Bei PCI 9 ist die HSP27-Expression nach Bestrahlung mit 6Gy und 12Gy, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant höher. Darüber hinaus ist ein signifikanter Anstieg von 2Gy nach 6Gy, sowie eine signifikante Abnahme von 6Gy nach 12Gy zu verzeichnen.

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei PCI 13. Hier ist die Konzentration bei den mit 6Gy und 12Gy bestrahlten Zellen gegenüber denen mit 2Gy und der Kontrolle signifikant erhöht. Die

intrazelluläre HSP27-Konzentration von PCI 52 und 68 wird durch die Bestrahlung wenig beeinflusst.

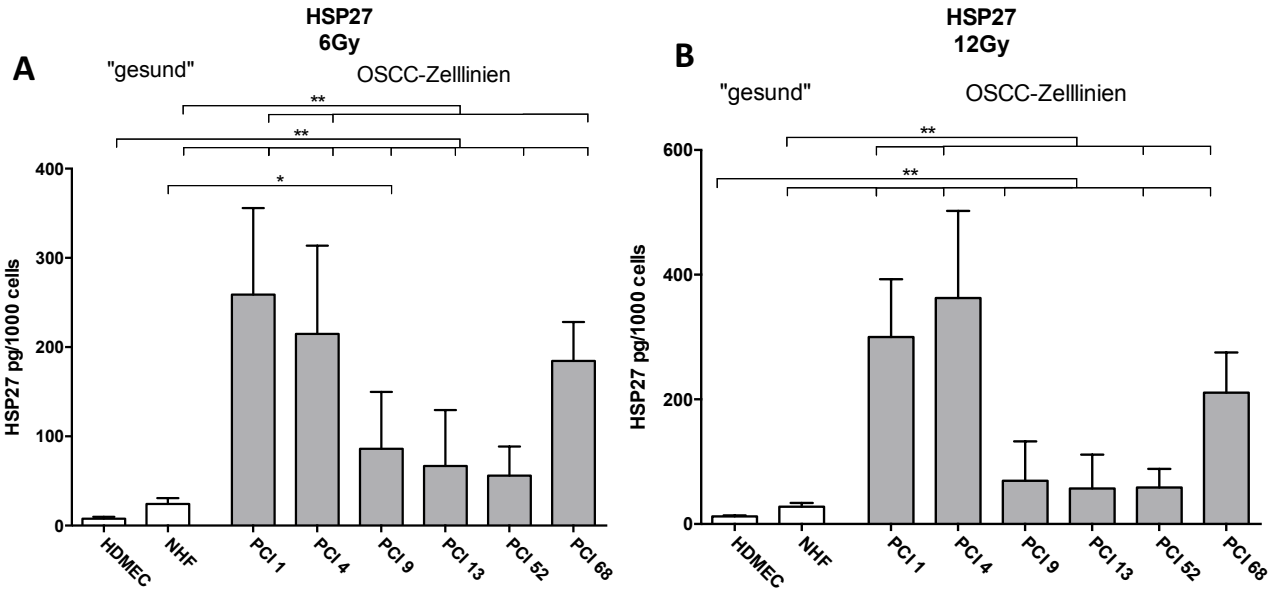
Ein signifikanter Anstieg der HSP27-Expression nach 2Gy-Exposition ist nur bei PCI 68 im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (Abb. 24).



• **Abb. 25: HSP27-Expression der Kontrollen (a) und nach Bestrahlung mit 2Gy (b) von HDMEC, NHF und PCI-Zelllinien.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Beim Vergleich der Zelllinien untereinander fällt wiederum die sehr geringe Expression von HSP27 bei HDMEC gegenüber den anderen Zelllinien auf. Unter den unbestrahlten Zellen ist die Konzentration von HSP27 bei NHF, PCI 1, PCI 4, PCI 52 und PCI 68 signifikant (p=0,0079) gegenüber den HDMEC-Zellen erhöht. Die basalen Expressionswerte von HSP27 sind bei PCI 1, PCI 4, PCI 68 (p=0,0079) sowie bei PCI 52 (p=0,0317) signifikant gegenüber NHF erhöht. Bei der Tumorzellline PCI 68 findet sich z.B. eine 27,9-fach höhere Konzentration an HSP27, als bei HDMEC (Abb. 25).

Die Bestrahlung mit 2Gy führt ebenfalls zu einer signifikant (p=0,0079) erhöhten HSP27-Konzentration bei NHF, PCI 1, PCI 4, PCI 9 (p=0,0159), PCI 52 und PCI 68 gegenüber HDMEC. Ferner ist die Konzentration bei PCI 1, PCI 4, PCI 52 und PCI 68 signifikant (p=0,0079) höher im Vergleich zu NHF (Abb. 25).

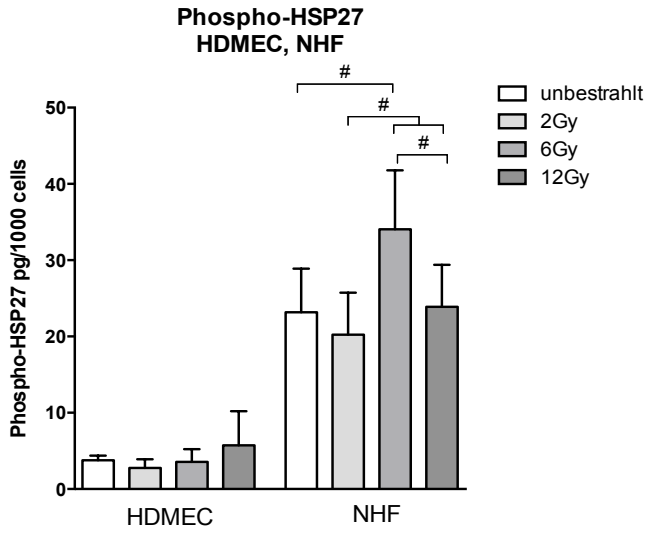


• **Abb. 26: HSP27-Expression von HDMEC, NHF und PCI-Zelllinien nach Bestrahlung mit 6Gy (a) und 12Gy (b).** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Nach der Bestrahlung mit 6Gy ist die Expression von HSP27 in NHF und allen OSCC-Zelllinien sehr signifikant (p=0,0079) höher als in HDMEC. Im Vergleich zu NHF ist die HSP27-Konzentration nach Bestrahlung mit 6Gy in PCI 1, 4, 9 und 68 signifikant (p=0,0159) erhöht (Abb. 26).

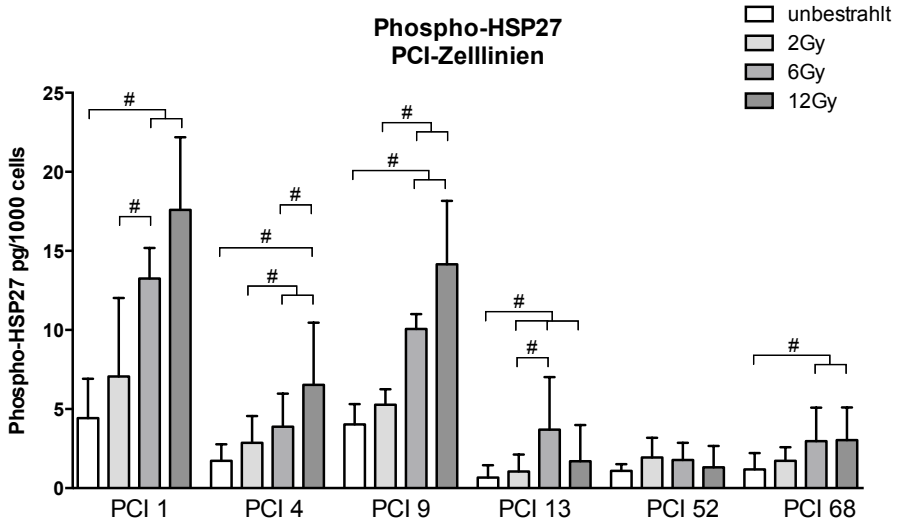
Nach Bestrahlung mit 12Gy zeigen sich signifikant (p=0,0079) erhöhte Werte gegenüber HDMEC bei NHF, PCI 1, PCI 4, PCI 9, PCI 52 und PCI 68. Im Vergleich zu NHF führt die Strahlenexposition mit 12Gy zu signifikant (p=0,0079) höheren HSP27-Expressionen bei PCI 1, 4, 52 und 68 (Abb. 26).

4.4.2 Phospho-HSP27



• **Abb. 27: Einfluss externer Bestrahlung auf die Phospho-HSP27-Expression von HDMEC und NHF.** Die Phospho-HSP27-Expression von HDMEC- und NHF-Zellen wurde 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Sandwich-ELISA photometrisch bestimmt. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Die Expression von phosphoryliertem HSP27 ist insgesamt, ähnlich wie der Gehalt von normalem HSP27, bei NHF deutlich höher als bei den HDMEC-Zellen. Die Fibroblasten zeigen eine signifikant höhere Konzentration an Phospho-HSP27 nach Bestrahlung mit 6Gy im Vergleich zur Kontrolle, bzw. bei 6Gy und 12Gy gegenüber den mit 2Gy bestrahlten Zellen. Verglichen mit 6Gy ist nach Bestrahlung mit 12Gy dagegen eine signifikante Abnahme sichtbar (Abb. 27).



• **Abb. 28: Einfluss externer Bestrahlung auf die Phospho-HSP27-Expression von PCI-Zelllinien.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Bei den meisten Tumorzelllinien lässt sich ein konstanter Anstieg der Phospho-HSP27 Konzentration mit zunehmender Strahlendosis beobachten.

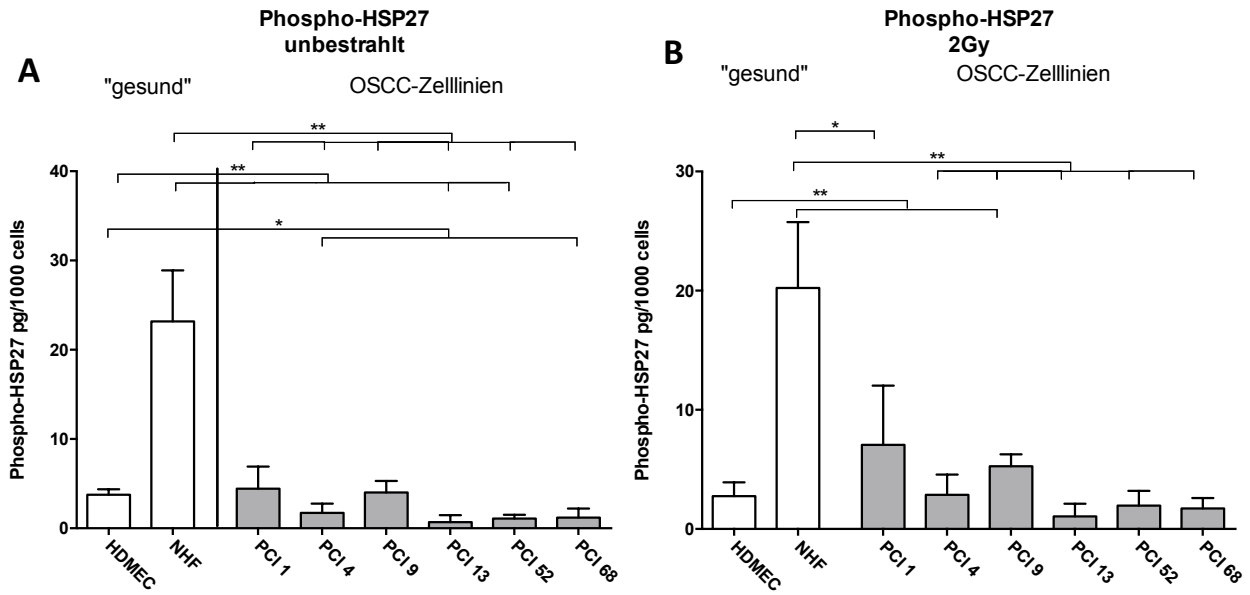
Bei PCI 1 führt die Bestrahlung zu einem signifikant höheren Gehalt an Phospho-HSP27 bei einer Dosis von 6Gy und 12Gy im Vergleich zur Kontrolle, sowie einem signifikanten Anstieg von 2Gy nach 6Gy.

Die Menge an phosphoryliertem HSP27 ist in PCI 4 nach Bestrahlung mit 6Gy und 12Gy signifikant gegenüber 2Gy erhöht. Außerdem ist der Anstieg zwischen der unbestrahlten Kontrolle bzw. 6Gy und 12Gy signifikant.

Auch bei den PCI 9-Zellen ist im Vergleich zu 2Gy und der Kontrolle die Konzentration bei 6Gy und 12Gy signifikant höher.

PCI 13 zeigt eine signifikant erhöhte Expression von Phospho-HSP27 bei den mit 2Gy, 6Gy und 12Gy bestrahlten Zellen gegenüber der Kontrolle und einen signifikanten Anstieg von 2Gy nach 6Gy.

Bei PCI 68 sind wiederum signifikant erhöhte Werte bei 6Gy und 12Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle sichtbar (Abb. 28).

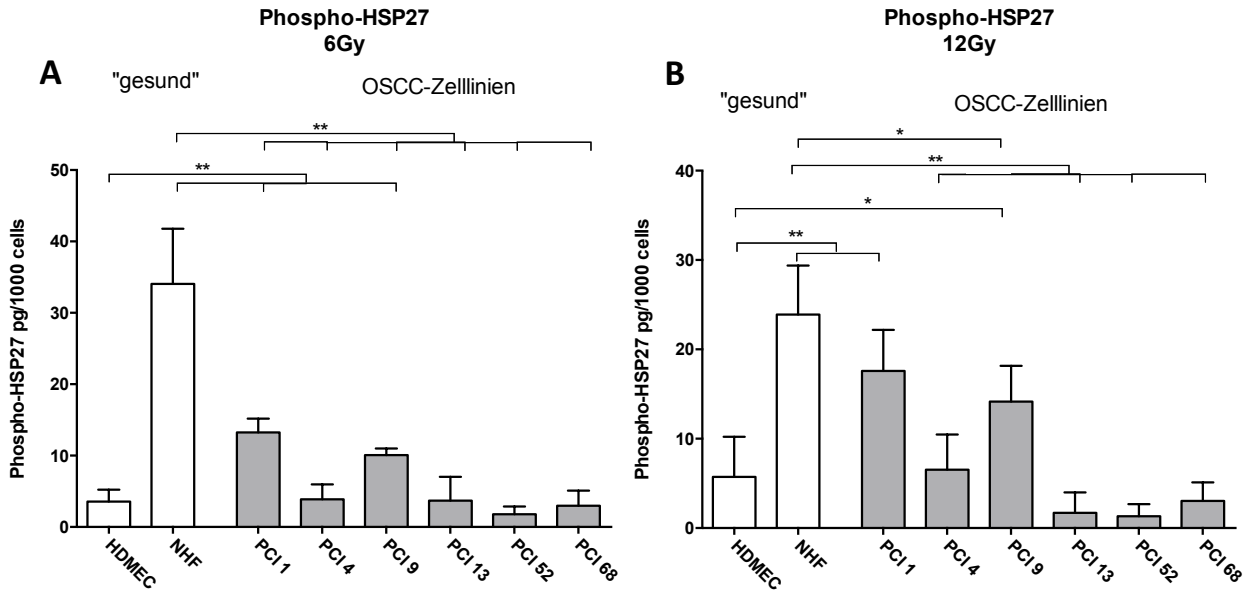


• **Abb. 29: Phospho-HSP27-Expression der Kontrollen (a) und nach Bestrahlung mit 2Gy (b) von HDMEC, NHF und PCI-Zelllinien.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Insgesamt zeigt NHF nicht nur gegenüber HDMEC, sondern auch im Vergleich zu den OSCC-Zelllinien die signifikant (p=0,0079) höchste Expression von Phospho-HSP27.

Darüber hinaus ist die Proteinexpression bei PCI 13 und PCI 52 (p=0,0079) sowie bei PCI 4 und PCI 68 (p=0,0159) signifikant gegenüber HDMEC vermindert (Abb. 29).

Nach Bestrahlung mit 2Gy zeigt sich die Phospho-HSP27 Konzentration signifikant (p=0,0079) im Vergleich zu HDMEC, PCI 4, PCI 9, PCI 13, PCI 52 und PCI 68 erhöht. Weiterhin besteht ein signifikanter (p=0,0159) Unterscheid zwischen NHF und PCI 1. Bei PCI 9 ist die Expression dagegen signifikant (p=0,0079) gegenüber HDMEC erhöht (Abb. 29).

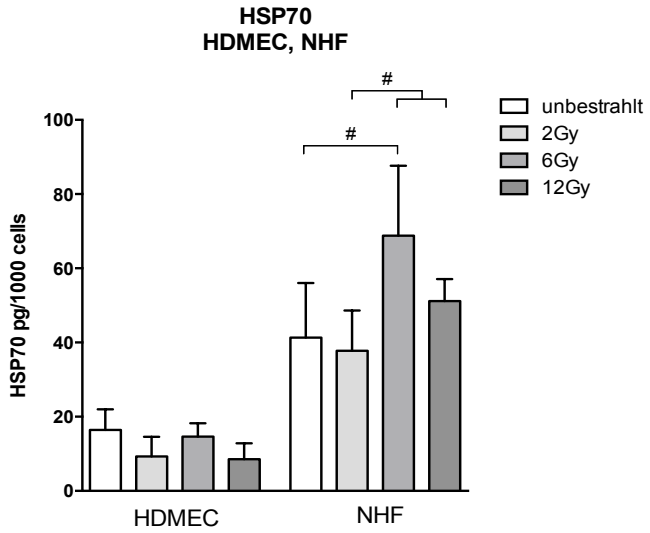


• **Abb. 30: Phospho-HSP27-Expression von HDMEC, NHF und PCI-Zelllinien nach Bestrahlung mit 6Gy (a) und 12Gy (b).** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Verglichen mit NHF sind bei der Bestrahlung mit 6Gy die Werte von HDMEC und allen OSCC-Zelllinien wiederum signifikant (p=0,0079) niedriger. Die Strahlenexposition mit 6Gy induziert bei PCI 1 und PCI 9 signifikant (p=0,0079) höhere Expressionswerte an phosphoryliertem HSP27 gegenüber HDMEC (Abb. 30).

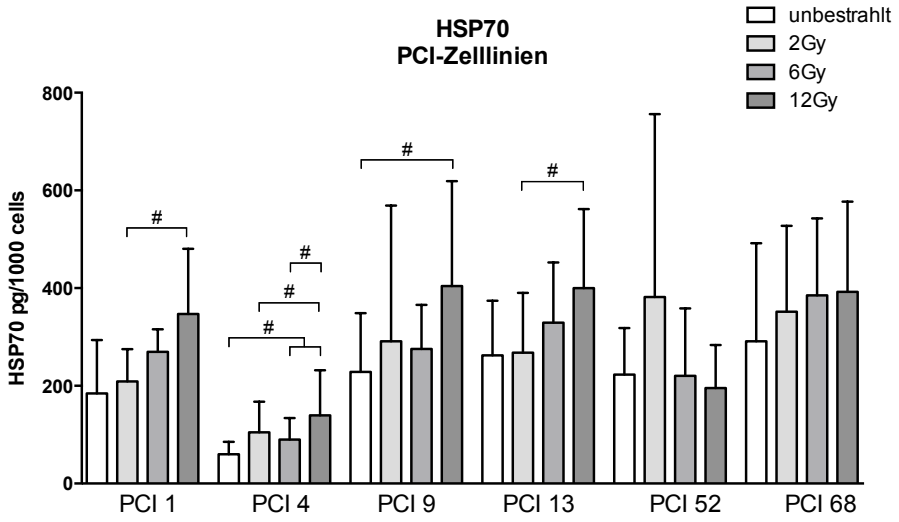
Bei der Strahlungsdosis von 12Gy zeigen HDMEC, PCI 4, PCI 13, PCI 52 und PCI 68 signifikant (p=0,0079) niedrigere Konzentrationen als NHF. Bei PCI 9 führt die Bestrahlung mit 12Gy zu einer signifikant (p=0,0159) niedrigeren Phospho-HSP27-Konzentration, ebenfalls im Vergleich zu NHF. Bei PCI 1 (p=0,0079) und PCI 9 (p=0,0317) bewirkt die 12Gy-Exposition eine signifikant höhere Expression gegenüber HDMEC (Abb. 30).

4.4.3 HSP70



• **Abb. 31: Einfluss externer Bestrahlung auf die HSP70-Expression von HDMEC und NHF.** Die HSP70-Expression von HDMEC- und NHF-Zellen wurde 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12Gy mittels Sandwich-ELISA photometrisch bestimmt. Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Neben der höheren Expression von HSP27 und Phospho-HSP27 ist die Konzentration von HSP70 bei den NHF-Zellen gegenüber den HDMEC-Zellen deutlich erhöht. Man erkennt einen signifikanten Anstieg der Proteinexpression zwischen der unbestrahlten Kontrolle und den mit 6Gy bestrahlten Zellen sowie eine signifikant erhöhte Konzentration nach Bestrahlung mit 6Gy und 12Gy im Vergleich zur Bestrahlungsdosis von 2Gy. Auf die HDMEC-Zellen hat die Bestrahlung nur einen geringen Effekt bezüglich der HSP70-Konzentration (Abb. 31).

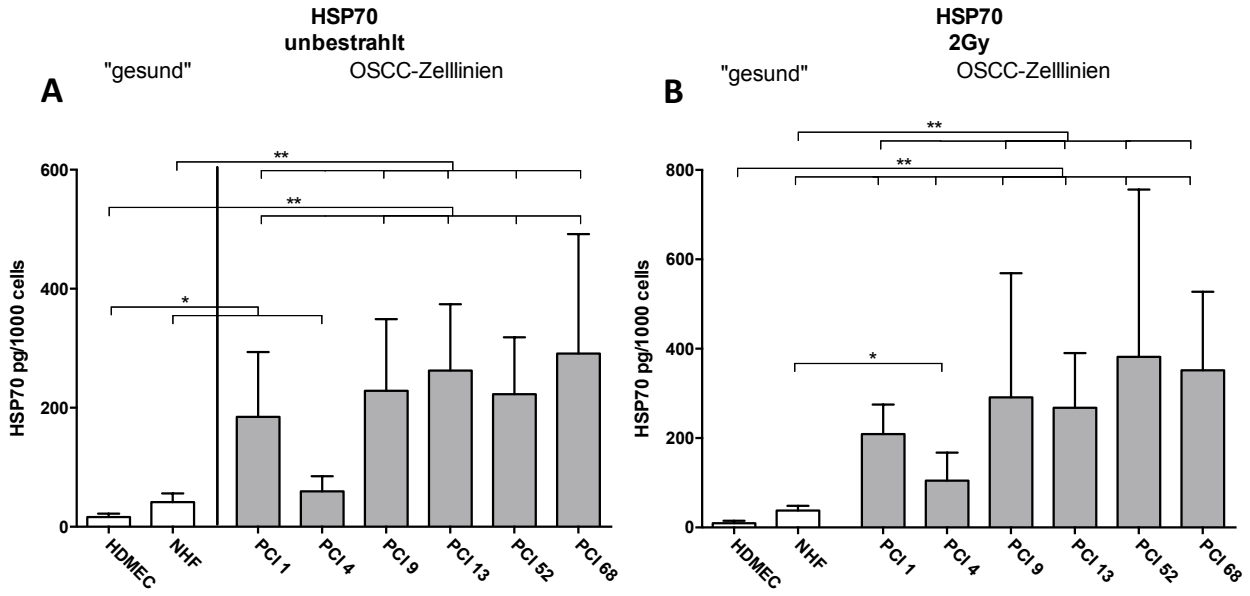


• **Abb. 32: Einfluss externer Bestrahlung auf die HSP70-Expression von PCI-Zelllinien.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. #p=0,0625; n=5

Bei den PCI-Zelllinien lässt sich, bis auf PCI 52, eine ansteigende Tendenz der HSP70-Konzentration mit zunehmender Strahlungsintensität feststellen. In PCI 4 ist die intrazelluläre HSP70-Konzentration insgesamt am niedrigsten.

In PCI 1 ruft die Bestrahlung mit 12Gy eine signifikant höhere HSP70-Expression gegenüber den mit 2Gy bestrahlten Zellen hervor. Bei PCI 4 zeigt sich ein signifikant höherer Wert nach 6Gy-Bestrahlung. Der Wert der mit 12Gy bestrahlten Zellen ist dabei signifikant höher, gegenüber 6Gy, 2Gy und der Kontrolle. Bei PCI 9 ist die HSP70-Konzentration bei den 12Gy-Zellen signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht.

Ein signifikanter Anstieg lässt sich auch bei PCI 13 von 2Gy nach 12Gy beobachten (Abb. 32).

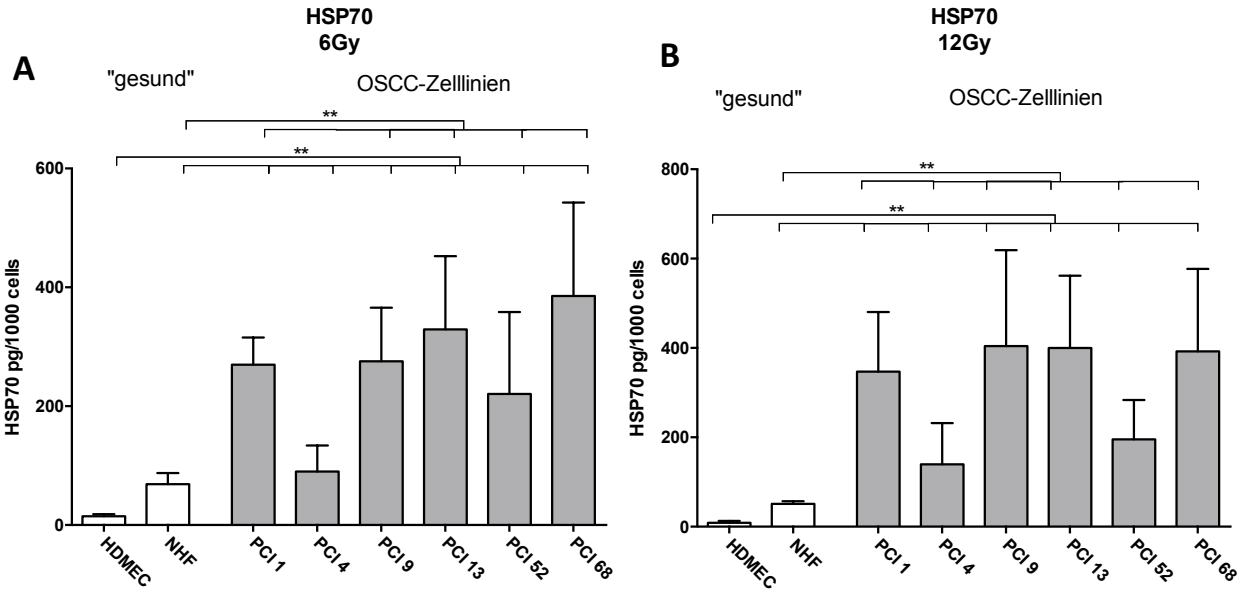


• **Abb. 33: HSP70-Expression der Kontrollen (a) und nach Bestrahlung mit 2Gy (b) von HDMEC, NHF und PCI-Zelllinien.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Insgesamt ist beim Vergleich der Strahlungsintensitäten die allgemein höhere Expression von HSP70 der Tumorzellen gegenüber den HDMEC- und NHF-Zellen auffällig.

Die basale HSP70-Konzentration in PCI 1, 9, 13, 52 und 68 ist signifikant (p=0,0079) gegenüber HDMEC und NHF erhöht. Die Proteinexpression in PCI 4 und NHF ist darüber hinaus signifikant (p=0,0159) gegenüber HDMEC gesteigert (Abb. 33).

Die Bestrahlung mit 2Gy verursacht eine signifikant (p=0,0079) höhere HSP70-Expression in allen OSCC-Zelllinien und NHF gegenüber HDMEC. Des Weiteren zeigen sich wiederum signifikant (p=0,0079) höhere Werte bei PCI 1, PCI 9, PCI 4 (p=0,0159), PCI 13, PCI 52 und PCI 68 im Vergleich zu NHF (Abb. 33).



• **Abb. 34: HSP70-Expression von HDMEC, NHF und PCI-Zelllinien nach Bestrahlung mit 6Gy und 12Gy.** Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5

Auch nach der Bestrahlung mit 6Gy sind die Expressionswerte von NHF und allen OSCC-Zelllinien sehr signifikant (p=0,0079) gegenüber HDMEC erhöht. Im Vergleich zu NHF erkennt man die signifikant (p=0,0079) höheren Konzentrationen bei PCI 1, PCI 9, PCI 13, PCI 52 und PCI 68 (Abb. 34).

Die Bestrahlung mit 12Gy induziert, analog zur Bestrahlung mit 6Gy, signifikant (p=0,0079) höhere intrazelluläre HSP70-Konzentrationen in NHF und PCI-Zelllinien im Vergleich zu HDMEC.

5. Diskussion

5.1 Einfluss externer Bestrahlung auf Wachstums- und Proliferationsverhalten

Neben der chirurgischen Intervention und Chemotherapie stellt die Behandlung mit ionisierender Strahlung eine weitere Option im Therapiekonzept des oralen Plattenepithelkarzinoms dar [38, 117]. Die Anwendung externer Bestrahlung beruht im Wesentlichen darauf, direkte Schäden in der DNA induzieren zu können [118]. Dieser Effekt wird auf die Toxizität von ROS, die durch die Radiolyse von Wasser entstehen, zurückgeführt [90]. Das Ziel dieser Therapieform ist daher die Abtötung der Tumorzellen bzw. die Verringerung der Tumorgröße bei inoperablen Erkrankungen [38]. Darüber hinaus ist der Einfluss der Bestrahlungstherapie auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen ein wichtiger Faktor, der sowohl das Ansprechverhalten des Tumors auf die Bestrahlung, als auch die lokale Tumorkontrolle ungünstig beeinflussen kann [119-121].

Um den Einfluss ionisierender Strahlung auf die Proliferation von Zellen aus gesundem und HNSCC-Gewebe zu charakterisieren, wurde zum einen die absolute Zellzahl und zum anderen die DNA-Neusynthese nach Bestrahlung verglichen. In der hier durchgeführten Studie zeigte sich 96h nach der Aussaat bzw. 48h nach Bestrahlung eine insgesamt deutlich höhere Zellzahl der Tumorzellen im Gegensatz zu den gesunden HDMEC-Zellen und Fibroblasten. Zwischen den OSCC-Zelllinien selbst war bei den unbestrahlten Kontrollen ebenfalls ein unterschiedliches Wachstumsverhalten festzustellen, welches durch die verschiedenen Primärherde, der unterschiedlichen Tumorklassifikation und histopathologischem Grading erklärt werden könnte. Nach Bestrahlung mit Einzeldosen zeigte sich bei allen Zelllinien, bis auf NHF, eine kontinuierliche Abnahme der absoluten Zellzahl mit zunehmender Strahlungsdosis (2Gy, 6Gy, 12Gy). Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch bei zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien beobachten. Huang et al. zeigten in einer *in vitro* Studie zur Radiosensitivierung von HNSCCs mittels EGFR-Blockade ebenfalls eine konstante Abnahme der unbehandelten Zellen mit steigender Strahlungsdosis [122]. Auch bei Aloy et al. fand eine konstante Abnahme des Anteils der lebenden Zellen bei unbehandelten SQ20B HNSCC-Zellen statt [92]. Eine *in vivo* Studie von Rai et al. beschäftigte sich mit dem Outcome von Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom und der Behandlung mit rein palliativer Bestrahlung im Vergleich zu einer radikalen Bestrahlung. Bei

höheren Bestrahlungsdosen (radikale Bestrahlung) zeigte sich eine wesentlich höhere durchschnittliche Überlebenszeit, sowie eine bessere lokoregionale Tumorkontrolle und eine reduzierte Morbidität [123]. Diese Beobachtungen lassen sich daher auch auf unser *in vitro* Modell übertragen. Je höher die Bestrahlungsdosis gewählt wurde, desto niedriger war die absolute Zellzahl der OSCC-Zelllinien, was einer Abnahme der Tumorgröße *in vivo* entsprechen würde. Eine Studie von Haikonen et. al. beschäftigte sich mit dem Zusammenhang der Radiosensitivität von dermalen Fibroblasten und HNSCC-Zellen, welche jeweils vom selben Patienten gewonnen wurden. Tendenziell war zu erkennen, dass die Fibroblasten eine höhere Radiosensitivität aufwiesen als die Tumorzellen [124]. Diese These würde die Beobachtung von Malaise et al. unterstützen, wonach die Gruppe der Fibroblasten eine höhere Radiosensitivität als die Mehrzahl menschlicher Tumorzellen aufweist [125]. Dagegen zeigte sich bei Dahlberg et al. *in vitro* zwar auch eine Korrelation zwischen der Radiosensitivität von Fibroblasten und Weichgewebssarkomzellen, welche wiederum vom selben Patienten gewonnen wurden, jedoch waren hierbei die Sarkomzellen radiosensitiver gegenüber den Fibroblasten [126]. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in der vorliegenden Studie gefunden. Wir konnten zeigen, dass bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen mit zunehmender Strahlungsdosis, die OSCC-Zelllinien radiosensitiver im Vergleich zu den Fibroblasten waren. Bei NHF ist ein inhomogener Verlauf zu sehen und kein deutlicher Abfall der absoluten Zellzahl, wohingegen die Zellzahlen bei den Tumorzellen mit steigender Strahlungsdosis und auch prozentual im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle deutlich abnehmen. Aufgrund der Korrelation zwischen der Radiosensitivität von Fibroblasten und des Ansprechens von Tumorzellen auf Bestrahlungstherapie, wurde eine individualisierte Bestrahlungstherapie für Tumorpatienten, basierend auf der individuellen Radiosensitivität der Patienten-Fibroblasten, vorgeschlagen [127]. Die Reaktion der HDMEC-Zellen auf Bestrahlung wurde bereits in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe untersucht [128]. Die kontinuierliche Abnahme der HDMEC-Zellzahl mit steigender Bestrahlungsdosis ist auch in der hier durchgeführten Arbeit sichtbar.

Bei genauerer Analyse des Einflusses von externer Bestrahlung auf die Proliferation mittels BrdU-Inkorporation als Maß für die DNA-Neusynthese konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Reduktion der Zellzahlen der Tumorzellen nach Bestrahlung jedoch nicht alleine auf die Reduktion der Proliferation zurückgeführt werden kann. Interessanterweise

zeigte sich ein Anstieg der Proliferation aller OSCC-Zelllinien bei Bestrahlung mit der geringen Dosis von 2Gy. Dieser pro-proliferative Effekt würde *in vivo* das Tumorwachstum begünstigen. Ein ähnlicher pro-proliferativer Effekt bei niedrigen Bestrahlungsdosen konnte von Liang et al. bei mesenchymalen Rattenstammzellen nachgewiesen werden. Die Strahlung führte hierbei zu einer Hochregulierung des MAPK/ERK (*extracellular-signal-regulatet kinases*) Signalwegs, welcher eine wichtige Rolle beim Zellwachstum spielt [129]. Ähnliche positive Einflüsse von geringen Strahlungsdosen zeigten sich bei Suzuki et al. mit humanen diploiden Zellen und Zellen eines Lungenkarzinoms [130], bei Kim et al. mit Lungenfibroblasten [131] und Korystov et. al. mit Hamsterfibroblasten [132]. Bei einer Studie von Schmidt-Ulrich et al. konnte man die Induktion der Proliferation bei Brustkrebs-Plattenepithelkarzinomzellen nach Bestrahlung mit therapeutischen Dosen beobachten. Zurückgeführt wurde dieser Effekt auf die Phosphorylierung von *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Dieser Vorgang hat Einfluss auf wichtige Komponenten proliferativer Signalwege und führte in Folge zur Hochregulierung der MAPK und somit zu einer gesteigerten Proliferation [133]. Vala et al. untersuchten den Effekt von geringen Strahlungsdosen auf tumorangrenzende gesunde Gewebe. Sie konnten nachweisen, dass derartig geringe Bestrahlungsdosen (≤0,8Gy) die Migration von Endothelzellen steigern, ohne Auswirkungen auf die Proliferation und das Überleben der Zellen zu haben. In einer Studie mit Zebrafischen förderte die Bestrahlung mit geringen Dosen die Angiogenese. Nach weiterführenden Versuchen der gleichen Arbeitsgruppe mit Brustkrebszellen wurde vermutet, dass geringe Bestrahlungsdosen einen direkten Einfluss auf Tumorwachstum und Metastasierung durch eine gesteigerte Angiogenese haben. Bei höheren Bestrahlungsdosen (≥1Gy) im selben Modell zeigte sich jedoch eine signifikant niedrigere Proliferationsrate der Endothelzellen [134]. Einen ähnlichen Effekt konnte man auch in unserem Modell beobachten. Schon die geringste Bestrahlungsdosis (2Gy) geht mit einer Abnahme der Proliferationsrate der HDMEC-Zellen einher. Bei den Tumorzellen dagegen verhinderten erst hohe, adäquate Bestrahlungsdosen die pro-proliferativen Effekte niedriger Dosen. Hieraus lässt sich erkennen, dass für eine erfolgreiche Tumortherapie sowohl eine ausreichende Bestrahlungsdosis, als auch ein punktgenaues Zielvolumen ausgewählt werden muss, um mögliche negative Randeffekte zu minimieren.

Neben der Proliferation sollte auch der Einfluss der Bestrahlung auf die Viabilität von NHF und HDMEC im Vergleich zu den OSCC-Zelllinien untersucht werden. Im Resazurin-Assay zeigte sich ein stärkerer Anstieg der Zellviabilität der Tumorzellen mit zunehmendem Zeitabstand zur Bestrahlung verglichen mit den gesunden NHF- und HDMEC-Zellen. Während bei den Fibroblasten und Endothelzellen bereits nach 8h ein Plateau erreicht wurde und nach 20h nur eine sehr geringfügig höhere Viabilität messbar war, wiesen die Tumorzelllinien, v.a. PCI 13, einen deutlich steileren Anstieg auf. Bei den OSCC-Zellen findet im Vergleich zu den gesunden Zellen also eine stärkere Erholung der Zellen mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Bestrahlung statt. *In vivo* würde dieser Effekt bedeuten, dass das Tumorwachstum begünstigt wird, je länger die Zeitabstände zwischen den Bestrahlungsterminen angesetzt werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden in verschiedenen Studien beschrieben. Die prognostische Relevanz der Zellrepopulation bei HNSCCs wurde sowohl in experimentellen, als auch klinischen Untersuchungen evaluiert und nachgewiesen [135]. Bereits 1988 stellte Withers et al. eine klinische Korrelation zwischen der Zeitspanne der Bestrahlung und deren Effekt bei HNSCCs fest. Diese umfassende retrospektive Studie zeigte eine verringerte Tumorkontrolle mit einer insgesamt steigenden Dauer der Bestrahlungstherapie [136]. Auch Fowler et al. zeigten einen signifikanten Verlust der lokoregionalen Tumorkontrolle bei einer Verteilung der gleichen Gesamtdosis auf einen längeren Zeitraum auf [119]. Ähnliche Ergebnisse finden sich bei Bourhis et al. [135], Fu et al. [137], Overgaard et al. [138] und Maciejewski et al. [139] jeweils auch bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Es wurde daher vorgeschlagen, die Bestrahlungstherapie bei HNSCCs ohne unnötige Unterbrechungen und in der kürzest möglichen Zeitspanne durchzuführen [139]. Neben der reinen zeitlichen Komponente scheint aber auch eine hyperfraktionierte Bestrahlung einen positiven Effekt auf die Tumorkontrolle zu besitzen [135, 137]. Hierbei wird die gleichbleibende Gesamtbestrahlungsdosis auf größere Einzeldosen aufgeteilt, wodurch weniger Bestrahlungstermine notwendig werden [45, 46].

Dagegen konnte jedoch in unserem Modell kein wesentlicher Einfluss auf das Verhalten der Zellviabilität bei höheren bzw. verschiedenen Strahlungsdosen beobachtet werden.

5.2 Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des physiologischen Zelltodes, welche durch die Aktivität von Caspasen vermittelt wird. Sie spielt eine wichtige Rolle in vielen Organismen und scheint ein ausschlaggebender Faktor beim bestrahlungsinduzierten Zelltod zu sein [140]. Apoptotische Effekte können sowohl über einen rezeptorvermittelten Signalweg, als auch durch den mitochondrialen Signalweg induziert werden. Viele pro- und anti-apoptotische Proteine sind darüber hinaus bei der Regulation dieser Prozesse beteiligt [141].

Einige Studien zeigen den Anstieg der Apoptoseaktivität mit steigender Bestrahlungsdosis. So war bei Aloy et al. eine deutlich höhere Apoptoseaktivität von Jurkat Zellen nach einer Bestrahlung mit 10Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zu finden [92]. Auch bei Hadchity et al. war die Caspaseaktivität von HNSCC SQ20B Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen nach Bestrahlung mit 10Gy deutlich höher [114]. Auch bei vielen weiteren Krebsformen, z.B. bei Brustkrebszellen, konnte die Induktion der Apoptose mittels steigender Bestrahlungsintensitäten nachgewiesen werden [142]. In unserem Modell konnte dagegen überraschenderweise keinerlei Apoptoseaktivität der Tumorzelllinien festgestellt werden. Dabei muss man berücksichtigen, dass auch einige nicht-apoptotische Ursachen für den physiologischen Zelltod in Frage kommen. So kann es neben der Apoptose zu Nekrosen, Mitosetod, Autophagozytose und Zellseneszenz kommen [143]. Nekrose ist eine zelluläre Reaktion nach starken toxischen Einwirkungen auf eine Zelle. Die Morphologie der Zelle bei Nekrose ist dabei durch zytoplasmatische Vakuolisierung, Degeneration der Zellorganellen, Schäden der Membranlipide, sowie Anschwellen der Zellen und anschließende Ruptur charakterisiert [143, 144]. Frame et al. analysierten in einer Studie den Einfluss von externer Bestrahlung und Photodynamischer Therapie (PDT) auf Zellen von Prostatakrebspatienten. PDT induzierte Nekrose und Autophagozytose, die Bestrahlung dagegen vornehmlich Zellseneszenz. Keiner der beiden Therapieformen induzierte dabei jedoch Apoptose [145]. Bei Rubner et al. war ein deutlich höherer Anteil an Zellnekrosen als an apoptotischen Glioblastomzellen nach Bestrahlung zu beobachten [146]. In Krebszellen, welche resistent gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli sind, scheint die Autophagozytose nach Bestrahlung erhöht zu sein. Kim et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen Apoptose und Autophagozytose in Lungenkrebszelllinien. Dabei zeigte sich eine Radiosensitivierung der Zellen nach Inhibition der Apoptosekaskade durch eine Zunahme der Autophagozytose [147]. Nach Bestrahlung mit 15Gy zeigte sich bei Chen et al. in Ileumzellen von Mäusen

neben der Apoptose auch Autophagozytose und Nekrose. Dabei machte die Nekrose den größten Anteil aus [148]. In einer Studie von Roberg et al. konnte man die Zunahme der Nekrose von OSCC-Zelllinien mit zunehmenden Bestrahlungsdosen (>20Gy), sowie eine sehr geringe Caspase-Aktivität bei niedrigeren Dosen beobachten. Bei dieser Studie wurden drei verschiedene OSCC-Zelllinien untersucht, wobei eine davon nach der Strahlenexposition wiederum keine Anzeichen von Apoptose aufwies. Bei weiteren Tests zeigte sich bei dieser Zelllinie eine hohe Expression von Proteinen der Bcl-2 Familie und Survivin [141].

Bei verschiedenen Tumorzelllinien hatte die Inhibierung der Apoptose jedoch nur einen kleinen oder keinen Effekt auf das Überleben der Zellen nach Bestrahlungstherapie. Es scheint, dass ein Rückgang der Apoptose durch einen Anstieg von Zellseneszenz und den Zelltod durch aberrante Mitose (Mitotische-Katastrophe) kompensiert wird [149]. Ähnliche Prozesse könnten auch die Beobachtungen in unserem Modell erklären. Es fand ein deutlicher Rückgang der Tumorzellzahl statt, obwohl keine Caspase-Aktivität messbar war. Die genannten nicht-apoptotischen Ursachen für den physiologischen Zelltod stehen in keiner Verbindung mit der Apoptosekaskade. Derartige Prozesse wären somit im Caspase 3/7-Assay nicht messbar. Darüber hinaus existieren Apoptosemechanismen, wie z.B. DNA-Fragmentierung, oder die durch *apoptosis inducing factor* (AIF)-vermittelte Apoptose, die unabhängig von einer Caspase-Aktivierung ablaufen können [150-153]. Solche Prozesse wären ebenfalls nicht mit unserem durchgeführten Caspase 3/7-Assay detektierbar.

Bei den HDMEC- und NHF-Zellen zeigte sich in unserem Modell zuerst ein Anstieg der Apoptoseaktivität nach der Bestrahlung mit 2Gy, gefolgt von einer Abnahme bei 6Gy und 12Gy. Besonders nach der Bestrahlung mit 12Gy war bei beiden Zelltypen nur noch sehr wenig oder gar keine Caspaseaktivität messbar. Insgesamt war auch ein leichter Anstieg mit zunehmender Zeit (1h, 8h, 20h) feststellbar.

Ein ähnlicher Effekt war bei einer Studie von Cmielova et al. mit embryonalen diploiden Fibroblasten, welche aus der Lunge gewonnen wurden, auszumachen. Hierbei war nach einem Tag die Menge an apoptotischen Zellen nach der Bestrahlung mit 2Gy höher, als nach einer Strahlungsdosis von 6Gy. Ein Anstieg der Apoptoseaktivität mit zunehmender Zeitdauer (1 Tag, 3 Tage, 6 Tage) war ebenfalls zu verzeichnen [154]. Langley et al. stellten im Gegensatz zu unseren Beobachtungen einen konstanten Anstieg der Apoptose mit steigender Strahlungsintensität bei mikrovaskulären Endothelzellen fest [155]. Aldrige et al. haben gezeigt, dass eine erhöhte Anfälligkeit für Apoptose von Fibroblasten das Überleben

der Zellen nach Bestrahlung nicht unbedingt verändert [156]. Auch bei den Endothelzellen und Fibroblasten wird der Apoptosemechanismus von diversen Faktoren beeinflusst und könnte so dazu führen, dass externe Bestrahlung zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade führt. [157-160].

5.3 Proteinexpression

5.3.1 HSP27

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Hitzschockproteinexpression und der Radiosensitivität sowie zwischen gesundem und Tumorgewebe zu charakterisieren, wurden bei NHF, HDMEC und den OSCC-Zelllinien ein antikörperbasierter Sandwich-ELISA durchgeführt. In der hier durchgeführten Studie waren die basalen Expressionswerte von HSP27 der Tumorzellen, außer bei PCI 9, PCI 13 und PCI 52, deutlich höher als die der gesunden NHF- und HDMEC-Zellen. Insgesamt zeigten sich individuell recht unterschiedliche Werte bei den OSCC-Zelllinien.

Bei einer Analyse von Lo Muzio et al. von 57 HNSCCs fanden sich ebenfalls bei 31 Tumoren niedrigere (5-80% HSP27-positive Zellen) HSP27-Expressionswerte, wohingegen bei den anderen 26 Tumoren die Expressionswerte erhöht (>80% HSP27-positive Zellen) waren [101]. Die Konzentration an HSP27 wird oft mit dem histopathologischen Entdifferenzierungsgrad in Verbindung gebracht. So zeigten sich in einigen Studien die niedrigsten Expressionswerte bei schlecht differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen [91, 161, 162]. Passend dazu war in unseren Untersuchungen die niedrigste intrazelluläre Konzentration an HSP27 bei PCI 13, einer schlecht differenzierten Tumorzelllinie, messbar. Außerdem waren verschiedene Konzentrationen von Hitzschockproteinen, unter anderem HSP27, mit verschiedenen Phasen der Karzinogenese assoziierbar [163]. Es scheint, dass die HSP27 Konzentration von individuellen Faktoren wie histopathologischem Grading, Primärherd oder Tumorstadium abhängig ist. Insgesamt ist das Expressionsniveau von HSP27 in vielen Tumorerkrankungen, ähnlich wie in unseren Zelllinien, erhöht. Bei Wan-Yu et al. wurde HSP27 als eines von 41 überexprimierten Proteinen in OSCCs identifiziert [96]. Außerdem belegten weitere Studien eine erhöhte Konzentration bei Prostatakrebs [164], Brustkrebs [165], Magenkrebs [166] und dem Blasenkarzinom [167].

In unserem Modell konnten wir einen dosisabhängigen Einfluss von externer Bestrahlung auf die HSP27-Proteinexpression in verschiedenen Zellen nachweisen. So führte die einmalige Strahlenexposition mit zunehmender Strahlungsintensität zu einer höheren Konzentration und weiter ansteigenden Werten in allen Zelllinien, nur PCI 9, PCI 13 und PCI 52 zeigten keine deutliche Änderung der HSP27-Konzentration nach Bestrahlung. Feng et al. stellten ebenfalls eine Überexpression von HSP27 in einer HNSCC-Zelllinie im Anschluss an externe Bestrahlung fest [168]. Auch bei Lee et al. war die HSP27-Konzentration in HNSCC-Zelllinien nach Bestrahlung erhöht [169]. Weiterhin zeigte sich ein erhöhter Gehalt in Endothelzellen und Tumoren des zentralen Nervensystems nach Strahlenexposition [170, 171].

Darüber hinaus konnte man ebenfalls eine Zunahme der Phosphorylierung von HSP27 nach Bestrahlung beobachten. Eine erhöhte Expression von HSP27 und Phospho-HSP27 wird mit verschiedenen Eigenschaften verbunden, die bei einer Bestrahlungstherapie protektiv wirken können. So wird ihnen eine starke anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben [69, 92, 114]. Die anti-apoptotischen Effekte werden von phophoryliertem und unphosphoryliertem HSP27 durch verschiedene Mechanismen erreicht [172]. Normales HSP27 kann die Aktivierung von Procaspase-3 und Procaspase-9 verhindern und die Freisetzung von Cytochrom c unterbinden. Dadurch wird der Ablauf der Apoptosekaskade und die allgemein Caspase-vermittelte Apoptose maßgeblich gestört [173-175]. Phospho-HSP27 kann dagegen die *death domain associated protein* (Daxx)-vermittelte Apoptose verhindern oder den überlebensfördernden PI3K/Akt-Signalweg stimulieren [172]. Dieser Zusammenhang wurde in verschiedenen Studien bestätigt. Bei Aloy et al. ließ sich eine Abnahme der Caspaseaktivität nach Hochregulierung von HSP27 in Jurkat-Zelllinien und eine Zunahme der Caspaseaktivität nach Inhibierung von HSP27 in OSCC-Zelllinien nach Bestrahlung beobachten [92]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei Hadchity et al. [114]. Teimourian et al. konnten einen Zusammenhang von HSP27 und der Apoptose nach Bestrahlungstherapie beim Prostatakarzinom nachweisen. In dieser Studie war ein Anstieg der Apoptose nach HSP27 Inhibierung zu erkennen [176].

Des Weiteren kann HSP27, insbesondere Phospho-HSP27, mit Akt interagieren und so den PI3K/Akt-Signalweg stimulieren. Durch die Bindung von HSP27 an Akt kommt es zu einer Konformationsänderung, welche für die Phosphorylierung durch PI3K und somit die Aktivierung von Akt notwendig ist [177, 178]. Eine Stimulierung dieses Signalwegs ist ein häufiges Phänomen bei HNSCCs und besitzt Auswirkungen auf das Zellwachstum, Kontrolle

über den Zellzyklus, Überleben und Proliferation der Zelle [179]. Hadchity et al. konnten nach Bestrahlung eine Abnahme der Akt-Aktivierung durch die Inhibierung von HSP27 in OSCC-Zellen beobachten [114]. Li et al. konnten einen Einfluss von Phospho-HSP27 und die damit verbundene Phosphorylierung von Akt auf die Apoptose von Glioblastomzellen nachweisen [178]. Nach Chen et al. hat Phospho-HSP27, vermittelt durch den PI3K-Akt-Signalweg, einen großen Einfluss auf die Proliferation von venösen Endothelzellen [180]. Dieser Zusammenhang, zwischen der erhöhten Expression von HSP27 und phosphoryliertem HSP27 und der Hemmung der Apoptose bzw. Förderung der Proliferation, könnte daher auch mit der in unserer Studie nicht messbaren Apoptoseinduktion der Tumorzelllinien zusammenhängen.

Einen weiteren Ansatz untersuchten Guttmann et. al.. In dieser Studie wurde der Einfluss von HSP27 auf die Reparatur von strahlungsinduzierten DNA-Schäden in HNSCC-Zelllinien nachgewiesen. Zellen, in denen HSP27 inhibiert wurde, zeigten nach der Bestrahlung weniger Reparaturaktivitäten als Zellen mit HSP27. Zurückgeführt wurde dieser Effekt auf den Einfluss auf das DNA-Reparaturprotein ATM [181]. Auch Mori et al. beobachteten einen positiven Effekt von HSP27 bei der Reparatur von hitzeinduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen [182].

Dieser Effekt könnte die in unserem Modell beobachtete bessere Erholung der Viabilität der Tumorzellen nach Bestrahlung gegenüber den gesunden NHF- und HDMEC-Zellen erklären. HSP27 kann apoptotische Vorgänge inhibieren und pro-proliferative Effekte durch die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs induzieren. Daher könnten auch die pro-proliferativen Effekte der PCI-Zelllinien nach geringen Strahlungsdosen, sowie die nicht messbare Apoptose im Caspase 3/7-Assay in Verbindung mit den eher erhöhten HSP27-Konzentrationen der Tumorzellen in Verbindung stehen.

Weiterhin verändert die stressinduzierte Phosphorylierung die Funktion von HSP27, indem phospho-HSP27 die Degeneration von Aktinfilamenten verhindert und so das Zytoskelett stabilisiert [183]. In unserer Studie zeigte NHF die höchsten basalen phospho-HSP27-Expressionswerte. Fibroblasten sind maßgeblich am Wundheilungsprozess beteiligt und ein hoher Gehalt an intrazellulärem phospho-HSP27 ist Voraussetzung für die korrekte Kontraktion der Wunde, was in einer Studie von Hirano et al. demonstriert wurde [184]. Im Gegensatz zu den Tumorzelllinien (außer PCI 9) war bei NHF und HDMEC das Verhältnis zwischen phospho-HSP27 und normalem HSP27 höher. Daher könnte die Stabilisierung des

Zytoskeletts in gesunden Zellen durch phospho-HSP27 vermittelt werden, wohingegen in Tumorzellen unphosphoryliertes HSP27 bevorzugt wird [185].

5.3.2 HSP70

Neben HSP27 und Phospho-HSP27 wurde auch die intrazelluläre HSP70-Konzentration bestimmt, um Rückschlüsse auf eine mögliche Korrelation zwischen der Expression und der Radiosensitivität der HDMEC-, NHF- und der OSCC-Zellen ziehen zu können.

Ähnlich wie schon bei HSP27 wiesen die Tumorzelllinien, bis auf PCI 4, deutlich höhere basale Expressionswerte an HSP70 im Vergleich zu den gesunden HDMEC- und Fibroblastenzellen auf. Andere Studien bestätigten bereits diese Beobachtung. So fanden sich hohe HSP70-Konzentrationen in Brustkrebsbiopsien [186], beim Endometriumkarzinom [187], Lungenkrebs [188] und weiteren malignen Tumoren [189, 190]. Kaur et al. untersuchten die Korrelation zwischen der HSP70 Expression und der Karzinogenese von OSCCs. Die Ergebnisse zeigten einen ansteigenden HSP70-Spiegel von der normalen Mundhöhlenmukosa über dysplastische Läsionen bis letztendlich zum oralen Plattenepithelkarzinom [191].

Mit zunehmender Strahlendosis stieg in unseren Versuchen die HSP70-Konzentration bei den Tumorzelllinien, bis auf PCI52, weiter an. Die Endothel- und Fibroblastenzellen wiesen dagegen einen recht inhomogenen Verlauf auf.

Die Synthese von Hitzeschockproteinen, besonders HSP70, wird durch Stressexposition, wie z.B. Nährstoffmangel, zytotoxische Medikamente oder ionisierende Strahlung angeregt [192].

Bei Rubner et. al. führte eine externe Bestrahlung von Glioblastomzellen zu einer signifikant höheren HSP70-Konzentration im Vergleich zu unbestrahlten Zellen [146]. Schunemann et al. konnten ebenfalls einen Anstieg nach Bestrahlung in Glioblastomzelllinien feststellen [87]. Bei einer Studie von Sierra-Rivera et al. mit Ovarzellen von Hamstern führten nicht letale Bestrahlungsdosen zu höheren HSP70-Konzentrationen im Cytosol [193]. Gehrmann et al. wiesen ein erhöhtes Level an membrangebundenem HSP70 in Zellen vom Kolonkarzinom und Pankreaskarzinom nach einer Bestrahlung mit 10Gy nach. Deshalb wurde vermutet, dass der Anstieg der HSP70-Konzentration nach einmaliger Bestrahlung mit nicht letalen Dosen bei einer erneuten Strahlenexposition protektiv wirken könnte [192]. Auch Kleinjung

et al. konnten eine Zunahme an membrangebundenem HSP70 in HNSCC-Zellen nach Bestrahlung feststellen [194]. In Tumorgeweben scheint zumeist ein Anstieg der HSP70 Konzentration mit externer Bestrahlung einherzugehen. In gesunden Geweben gibt es aber, ähnlich wie in unserem Modell, recht unterschiedliche Ergebnisse. Tavassol et al. untersuchten die HSP70-Expression in Gefäßen der Kopf-Hals-Region nach Bestrahlung und Radiochemotherapie. Die Radiochemotherapie führte dabei zu einer erhöhten HSP70-Expression in der Media von Venen. Dagegen zeigte sich eine Abnahme der HSP70-Konzentraion in der Intima und Media nach Radiatio in Arterien [195].

Eine Überexpression von HSP70 wird, wie die Überexpression von HSP27, mit verschiedenen Eigenschaften verbunden, die die Wirkung einer Strahlentherapie modulieren können. Auch HSP70 besitzt die Fähigkeit, die Apoptose zu verhindern [196, 197]. Hierzu kann sowohl die Caspase-abhängige, sowie die Caspase-unabhängige Apoptose gehemmt werden oder die Expression von Regulatorproteinen der Apoptose gesteuert werden [196, 197]. HSP70 kann direkt an AIF binden und so die Translokation inhibieren. Dadurch wird die AIF-vermittelte Chromatin-Kondensation gehemmt und so die Apoptose verhindert [198, 199]. Weiterhin kann HSP70 mit *Endonuklease G* (EndoG) interagieren und somit die DNA-Fragmentierung als einen weiteren Caspase-unabhängigen Apoptosemechanismus verhindern [200]. HSP70 spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Funktion pro- und anti-apoptotischer Proteine. Durch die Bindung mit mutiertem p53 wird die Transkription von Bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein, gefördert und so die Apoptose gehemmt [94]. Darüber hinaus verhindert die Bindung von HSP70 an Bax, einem pro-apoptotischen Protein, dessen Translokation in das Mitochondrium. Dadurch wird die Permeabilität der Mitochondriummembran herabgesetzt und somit die Freisetzung wichtiger Moleküle für die Apoptose, wie Cytochtom c oder AIF, gehemmt [201, 202]. Der Einfluss von HSP70 auf die strahlungsinduzierte Apoptose konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden.

Schmitt et al. zeigten, dass Fibroblasten von Mäusen, in denen die beiden Gene hsp70.1 und hsp70.3 für induzierbares HSP70 fehlten, deutlich sensitiver gegenüber apoptotischen Reizen waren [93]. Schunemann et al. stellten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von HSP70 und verminderter Apoptose nach Bestrahlung in Glioblastomzellen her [87]. Gibbons et al. demonstrierten, dass speziell induzierbares HSP70 die strahlungsinduzierte Apoptose in Prostatakrebszelllinien hemmt [203].

HSP70 kann ebenfalls wie HSP27 an Akt binden und so den PI3K/Akt-Signalweg stimulieren, was Auswirkungen auf Proliferation und Überleben der Zellen haben kann [204].
Wei et al. stellten eine stark verminderte Proliferation von verschiedenen Tumorzellen nach der Inhibierung von HSP70 fest [205]. Zhao et al. beobachteten das selbe Ergebnis bei einer Studie mit Prostatakrebszelllinien [206]. Aufgrund ähnlicher Ergebnisse bei OSCC-Zelllinien, folgerten Kaur et al., dass HSP70 für die Proliferation und das Überleben von OSCC-Zellen notwendig zu sein scheint [207].
Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass HSP70 die Viabilität von Krebszellen fördert, indem es die lysosomale Integrität schützt. HSP70 verhindert eine Permeabilität der Lysosomenmembran und unterbindet so die Freisetzung von Lysosomenbestandteilen, z.B. eine Gruppe von Proteasen, die im Apoptosemechanismus involviert sind, in das Zytosol [208, 209].
Ähnlich wie HSP27 kann auch HSP70 sowohl die Apoptose stark beeinflussen, als auch positive Effekte auf die Proliferation und Viabilität von Zellen ausüben. Somit könnten die hohen Expressionswerte von HSP70 der Tumorzelllinien in unserem Modell neben der nicht messbaren Apoptose, auch mit den pro-proliferativen Effekten und der höheren Viabilität der Tumorzellen in Verbindung stehen.

Insgesamt zeigte sich in der hier durchgeführten Studie eine Abnahme der Zellzahlen nach Bestrahlung, die nicht alleine auf eine Reduktion der Proliferation oder eine Aktivitätszunahme von Caspase 3/7 zurückzuführen war. Pro-proliferative Effekte niedriger Bestrahlungsdosen konnten erst durch die Applikation höherer Dosen verhindert werden. Dadurch wurden aber auch physiologische Prozesse initiiert, wie die Expression von HSP70, HSP27 und dessen Phosphorylierung. Diese Proteine können anti-apoptotisch wirken und die Proliferation und Viabilität, v.a. von Tumorzellen, fördern. Diese Hitzeschockproteine könnten die Caspase-vermittelte Apoptose in Folge der Bestrahlung der OSCC-Zelllinien verhindert haben und so das Gleichgewicht auf alternative nicht-apoptotische Ursachen des physiologischen Zelltodes verlagert haben.
Die einmalige Bestrahlung und die damit verbundene Zunahme der HSP27-, Phospho-HSP27- und HSP70-Konzentration in den OSCC-Zelllinien könnte bei erneuter Bestrahlung protektiv wirken. *In vivo* würde das zu einer Desensibilisierung des Tumors im weiteren Therapieverlauf führen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss externer Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten, Proliferation, Apoptose und die Expression der Hitzeschockproteine HSP27, Phospho-HSP27 und HSP70 in Zelllinien von oralen Plattenepithelkarzinomen und Zellen der kutanen Wundheilung (HDMEC, NHF) *in vitro* untersucht. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit stellte darüber hinaus der Vergleich von Krebszellen und gesunden Zellen hinsichtlich der Reaktion auf verschiedene Bestrahlungsdosen dar, um mögliche Assoziationen mit Veränderungen der intrazellulären Zusammensetzung von Hitzeschockproteinen zu charakterisieren.

Insgesamt zeigten die unbestrahlten Kontrollen der Tumorzellen eine deutlich höhere Wachstumsrate im Vergleich zu den HDMEC- und NHF-Zellen. Die OSCC-Zelllinien reagierten mit steigender Strahlungsdosis radiosensitiver im Vergleich zu den Fibroblasten, was sich in einer kontinuierlich sinkenden Zellzahl wiederspiegelte.

Bei genauerer Analyse des Einflusses externer Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen stellte sich jedoch heraus, dass die Abnahme der Zellzahl mit steigender Strahlungsdosis nicht alleine auf die Abnahme der Proliferation zurückgeführt werden kann. Die geringe Dosis von 2Gy verursachte signifikant pro-proliferative Effekte in allen OSCC-Zelllinien, was *in vivo* das Tumorwachstum begünstigen würde. Zusammen mit dem schnelleren Anstieg der Zellviabilität mit zunehmenden Abstand zur Bestrahlung der Tumorzellen im Vergleich zu den Zellen der kutanen Wundheilung impliziert diese Beobachtung, dass bei der Strahlentherapie von oralen Plattenepithelkarzinomen sowohl eine adäquate Dosis gewählt werden muss, als auch die Zeitabstände zwischen den Bestrahlungsterminen möglichst kurz gehalten werden sollten.

Darüber hinaus wurden durch die Bestrahlung aber auch physiologische Prozesse, wie die Expression der Hitzeschockproteine HSP70, HSP27 und dessen Phosphorylierung initiiert. Diese Proteine besitzen anti-apoptotische Eigenschaften und können die Proliferation und Viabilität, v.a. von Tumorzellen, fördern. Dieser Effekt könnte sowohl mit der nicht messbaren Apoptoseaktivität, als auch der höheren Viabilität der Tumorzelllinien in Verbindung stehen. Die einmalige Bestrahlung und die damit verbundene Zunahme der Hitzeschockproteinkonzentration in den OSCC-Zelllinien könnte bei erneuter Bestrahlung protektiv wirken, was *in vivo* zu einer Desensibilisierung des Tumors im weiteren Therapieverlauf führen würde.

7. Literaturverzeichnis

1. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012.* CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
2. Warnakulasuriya, S., *Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer.* Oral Oncology, 2009. **45**(4–5): p. 309-316.
3. (IARC), I.A.f.R.o.C. *United Nations Development Programme; GLOBOCAN Global Burden of Cancer Study 2012*. 2012; Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
4. Black, R.J., et al., *Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990.* Eur J Cancer, 1997. **33**(7): p. 1075-107.
5. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2011/2012.* Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2015. **10. Ausgabe**.
6. Karim-Kos, H.E., et al., *Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s.* Eur J Cancer, 2008. **44**(10): p. 1345-89.
7. Bettendorf, O., J. Piffko, and A. Bankfalvi, *Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy?* Oral Oncol, 2004. **40**(2): p. 110-9.
8. Kaanders, J., et al., *Hypopharynxkarzinom*, in *Kompendium Internistische Onkologie*. 1997, Springer. p. 450-460.
9. Böcker, W., et al., *Pathologie*. 2008: Elsevier, Urban & Fischer.
10. Tanaka, T. and R. Ishigamori, *Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer.* J Oncol, 2011. **2011**: p. 603740.
11. Dissanayaka, W.L., et al., *Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012. **113**(4): p. 518-25.
12. Chi, A.C., T.A. Day, and B.W. Neville, *Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update.* CA Cancer J Clin, 2015. **65**(5): p. 401-21.
13. Gandini, S., et al., *Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis.* Int J Cancer, 2008. **122**(1): p. 155-64.
14. Hunter, K.D., E.K. Parkinson, and P.R. Harrison, *Profiling early head and neck cancer.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(2): p. 127-35.
15. Turati, F., et al., *A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers: results from subgroup analyses.* Alcohol Alcohol, 2013. **48**(1): p. 107-18.
16. (IARC), I.A.f.R.o.C.-c., *Section 2.2. Cancer of the oral cavity and pharynx.* ARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, eds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol Consumption and Ethyl-carbamate, 2010. **96**: p. 237-329.
17. Leon, X., et al., *Influence of the persistence of tobacco and alcohol use in the appearance of second neoplasm in patients with a head and neck cancer. A case-control study.* Cancer Causes Control, 2009. **20**(5): p. 645-52.
18. Rivera, C., *Essentials of oral cancer.* Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 11884-94.

19. Gillison, M.L., et al., *Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers.* J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(6): p. 407-20.
20. Mirghani, H., et al., *Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma?* Oral Oncol, 2015. **51**(3): p. 229-36.
21. Neville, B.W., et al., *Oral and maxillofacial pathology*. 2015: Elsevier Health Sciences.
22. Dalianis, T., *Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review).* Int J Oncol, 2014. **44**(6): p. 1799-805.
23. Miller, C.S. and D.K. White, *Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1996. **82**(1): p. 57-68.
24. Beck-Mannagetta, J. and G. Hutarew, *[Squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders of the oral mucosa].* Hautarzt, 2009. **60**(11): p. 859-65.
25. Suter, V.G., et al., *[Oral erythroplakia and erythroleukoplakia: red and red-white dysplastic lesions of the oral mucosa--part 2: cytodiagnosis, pathogenesis, therapy, and prognostic aspects].* Schweiz Monatsschr Zahnmed, 2008. **118**(6): p. 510-8.
26. Reichart, P.A., *[Oral precancerous conditions--an overview].* Mund Kiefer Gesichtschir, 2003. **7**(4): p. 201-7.
27. Schwenzer, N. and M. Ehrenfeld, *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. 2010: Georg Thieme Verlag.
28. Ferlito, A., et al., *Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer.* ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2001. **63**(4): p. 202-7.
29. Black, R.J., J.L. Gluckman, and D.A. Shumrick, *Screening for distant metastases in head and neck cancer patients.* Aust N Z J Surg, 1984. **54**(6): p. 527-30.
30. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2011: John Wiley & Sons.
31. Frederick, L., et al., *AJCC cancer staging manual*. Vol. 1. 2002: Springer Science & Business Media.
32. Kademani, D., et al., *Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade.* J Oral Maxillofac Surg, 2005. **63**(11): p. 1599-605.
33. Taghavi, N. and I. Yazdi, *Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts.* Arch Iran Med, 2015. **18**(5): p. 314-9.
34. Wenzel, S., et al., *[Retrospective analysis of the prognostic significance of depth of invasion of advanced oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas with lymph node metastases].* Hno, 2004. **52**(7): p. 604-10.
35. Baatenburg de Jong, R.J., et al., *Prediction of survival in patients with head and neck cancer.* Head Neck, 2001. **23**(9): p. 718-24.
36. Cojocariu, O.M., et al., *[Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers].* Bull Cancer, 2009. **96**(4): p. 369-78.
37. Haddad, R.I. and D.M. Shin, *Recent advances in head and neck cancer.* N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1143-54.
38. Huang, S.H. and B. O'Sullivan, *Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy.* Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2013. **18**(2): p. e233-40.
39. Güneri, P. and J.B. Epstein, *Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions.* Oral oncology, 2014. **50**(12): p. 1131-1136.
40. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer.* The Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-1709.

41. Yao, M., et al., *Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck.* Oral oncology, 2007. **43**(3): p. 213-223.
42. Trotti, A., et al., *Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review.* Radiother Oncol, 2003. **66**(3): p. 253-62.
43. Wang, Z.Q., et al., *A cell-targeted chemotherapeutic nanomedicine strategy for oral squamous cell carcinoma therapy.* J Nanobiotechnology, 2015. **13**: p. 63.
44. Naruse, T., et al., *Cetuximab for the treatment of locally advanced and recurrent/metastatic oral cancer: An investigation of distant metastasis.* Mol Clin Oncol, 2016. **5**(2): p. 246-252.
45. Al-mamgani, A., et al., *Hypofractionated radiotherapy denoted as the "Christie scheme": an effective means of palliating patients with head and neck cancers not suitable for curative treatment.* Acta Oncol, 2009. **48**(4): p. 562-70.
46. Agarwal, J.P., et al., *Hypofractionated, palliative radiotherapy for advanced head and neck cancer.* Radiother Oncol, 2008. **89**(1): p. 51-6.
47. Lazarus, G.S., et al., *Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing.* Wound Repair and Regeneration, 1994. **2**(3): p. 165-170.
48. Baisch, A. and F. Riedel, *Hyperplastic scars and keloids: part Ⅱ: Surgical and non-surgical treatment modalities.* HNO, 2006. **54**(12): p. 981-992.
49. Haubner, F., et al., *A Co-Culture Model of Fibroblasts and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Reveals New Insights into Impaired Wound Healing After Radiotherapy.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(11): p. 25947-58.
50. Li, Z., et al., *Increased cutaneous wound healing effect of biodegradable liposomes containing madecassoside: preparation optimization, in vitro dermal permeation, and in vivo bioevaluation.* International Journal of Nanomedicine, 2016. **11**: p. 2995.
51. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration.* Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
52. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing.* N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
53. Hoffmann-La-Roche-Aktiengesellschaft, G.D., *Roche Lexikon Medizin:[das große deutschsprachige Lexikon der Medizin; der laufende Begleiter für Klinik, Forschung, Ausbildung und Praxis]*. 2003: Urban & Fischer.
54. Scheithauer, M. and H. Riechelmann, *[Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing].* Laryngo-rhino-otologie, 2003. **82**(1): p. 31-35.
55. Tonnesen, M.G., X. Feng, and R.A. Clark. *Angiogenesis in wound healing*. in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2000. Nature Publishing Group.
56. Clark, R., *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2013: Springer Science & Business Media.
57. Eckes, B., et al., *Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis.* Matrix biology, 2000. **19**(4): p. 325-332.
58. Chen, C., et al., *Molecular and mechanistic validation of delayed healing rat wounds as a model for human chronic wounds.* Wound Repair and Regeneration, 1999. **7**(6): p. 486-494.
59. Diegelmann, R.F. and M.C. Evans, *Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.* Front Biosci, 2004. **9**(1): p. 283-289.
60. Bran, G.M., et al., *Keloids: current concepts of pathogenesis (review).* International journal of molecular medicine, 2009. **24**(3): p. 283.

61. Dormand, E.L., P.E. Banwell, and T.E. Goodacre, *Radiotherapy and wound healing.* International wound journal, 2005. **2**(2): p. 112-127.
62. Hom, D. and C. Lee, *Irradiatid skin and its postsurgical management.* Essential tissue healing of the face and the neck, 2009: p. 224-238.
63. Haubner, F., et al., *Wound healing after radiation therapy: review of the literature.* Radiat Oncol, 2012. **7**: p. 162.
64. Gu, Q., et al., *Expression of MMP1 in surgical and radiation-impaired wound healing and its effects on the healing process.* Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, 2002. **21**(1).
65. Hunt, T., et al., *Cellular control of repair.* Soft and hard tissue repair: biological and clinical aspects, 1984: p. 3-19.
66. Haubner, F., et al., *Effects of radiation on the expression of adhesion molecules and cytokines in a static model of human dermal microvascular endothelial cells.* Clinical hemorheology and microcirculation, 2013. **54**(4): p. 371-379.
67. Welch, W.J., *Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease.* Physiological reviews, 1992. **72**(4): p. 1063-1081.
68. Beckmann, R.P., L. Mizzen, and W.J. Welch, *Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly.* Science, 1990. **248**(4957): p. 850-854.
69. Wang, X., et al., *HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review).* International journal of oncology, 2014. **45**(1): p. 18-30.
70. Lindquist, S. and E. Craig, *The heat-shock proteins.* Annual review of genetics, 1988. **22**(1): p. 631-677.
71. Popli, D.B., et al., *Role of heat shock proteins in oral squamous cell carcinoma: A systematic review.* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2015. **159**(3): p. 366-371.
72. Jego, G., et al., *Targeting heat shock proteins in cancer.* Cancer letters, 2013. **332**(2): p. 275-285.
73. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties.* Cell cycle, 2006. **5**(22): p. 2592-2601.
74. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death.* Biochemical and biophysical research communications, 2001. **286**(3): p. 433-442.
75. Mehlen, P. and A.P. ARRIGO, *The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization.* European Journal of Biochemistry, 1994. **221**(1): p. 327-334.
76. Kostenko, S. and U. Moens, *Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology.* Cellular and molecular life sciences, 2009. **66**(20): p. 3289-3307.
77. Zoubeidi, A. and M. Gleave, *Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis.* The international journal of biochemistry & cell biology, 2012. **44**(10): p. 1646-1656.
78. Åkerfelt, M., R.I. Morimoto, and L. Sistonen, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan.* Nature reviews Molecular cell biology, 2010. **11**(8): p. 545-555.

79. Mehlen, P., K. Schulze-Osthoff, and A.-P. Arrigo, *Small stress proteins as novel regulators of apoptosis heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1-and staurosporine-induced cell death.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(28): p. 16510-16514.
80. Carbajal, E.M., et al., *Intramitochondrial localization of the main 70-kDa heat-shock cognate protein in Drosophila cells.* Experimental cell research, 1993. **207**(2): p. 300-309.
81. Nollen, E.A., et al., *In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance.* Molecular and cellular biology, 1999. **19**(3): p. 2069-2079.
82. Mayer, M. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.* Cellular and molecular life sciences, 2005. **62**(6): p. 670-684.
83. Zoubeidi, A. and M. Gleave, *Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis.* Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(10): p. 1646-56.
84. Xia, Y., et al., *Targeting heat shock response pathways to treat pancreatic cancer.* Drug discovery today, 2012. **17**(1): p. 35-43.
85. Ciocca, D.R., et al., *Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a review.* Journal of the National Cancer Institute, 1993. **85**(19): p. 1558-1570.
86. Vargas-Roig, L.M., et al., *Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy.* International journal of cancer, 1998. **79**(5): p. 468-475.
87. SCHUNEMANN, D.P., et al., *Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines.* International journal of oncology, 2004. **25**: p. 777-785.
88. Santarosa, M., et al., *Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients.* European Journal of Cancer, 1997. **33**(6): p. 873-877.
89. Acunzo, J., M. Katsogiannou, and P. Rocchi, *Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), αB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death.* The international journal of biochemistry & cell biology, 2012. **44**(10): p. 1622-1631.
90. Tominaga, H., et al., *Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation.* Journal of radiation research, 2004. **45**(2): p. 181-188.
91. Wang, A., et al., *Dysregulation of heat shock protein 27 expression in oral tongue squamous cell carcinoma.* BMC cancer, 2009. **9**(1): p. 1.
92. Aloy, M.T., et al., *Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **70**(2): p. 543-53.
93. Schmitt, E., et al., *Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant.* Cancer research, 2003. **63**(23): p. 8233-8240.
94. Zylicz, M., F.W. King, and A. Wawrzynow, *Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein.* The EMBO journal, 2001. **20**(17): p. 4634-4638.
95. Lo Muzio, L., et al., *HSP 27 as possible prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma.* Histol Histopathol, 2004. **19**(1): p. 119-28.
96. Lo, W.-Y., et al., *Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis.* Clinica chimica acta, 2007. **376**(1): p. 101-107.

97. Lee, S.-S., et al., *The upregulation of heat shock protein 70 expression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas.* Oral oncology, 2008. **44**(9): p. 884-890.
98. Wang, X., Q. Wang, and H. Lin, *Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human esophageal squamous cell carcinoma.* Clinical and Developmental Immunology, 2010. **2010**.
99. Taghavi, N. and I. Yazdi, *Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: Clinical, histologic, genetic and molecular concepts.* Arch Iran Med, 2015. **18**(5): p. 314-319.
100. Suzuki, H., H. Sugimura, and K. Hashimoto, *Overexpression of heat shock protein 27 is associated with good prognosis in the patient with oral squamous cell carcinoma.* British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2007. **45**(2): p. 123-129.
101. MUZIO, L.L., et al., *Prognostic value of HSP27 in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective analysis of 57 tumours.* Anticancer research, 2006. **26**(2B): p. 1343-1349.
102. Deyhimi, P. and F. Azmoudeh, *HSP27and HSP70 expression in squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study.* Dental research journal, 2012. **9**(2).
103. TEKKEŞİN, M.S., et al., *Expression of heat shock proteins 27, 60 and 70 in oral carcinogenesis: An immunohistochemical study.* Türk Onkoloji Dergisi, 2011. **26**(3): p. 115-20.
104. Kaur, J., J. Kaur, and R. Ralhan, *Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells.* International journal of cancer, 2000. **85**(1): p. 1-5.
105. Guttmann, D.M. and C. Koumenis, *The heat shock proteins as targets for radiosensitization and chemosensitization in cancer.* Cancer biology & therapy, 2011. **12**(12): p. 1023-1031.
106. Dote, H., et al., *Inhibition of hsp90 compromises the DNA damage response to radiation.* Cancer research, 2006. **66**(18): p. 9211-9220.
107. Kabakov, A.E., V.A. Kudryavtsev, and V.L. Gabai, *Hsp90 inhibitors as promising agents for radiotherapy.* Journal of molecular medicine, 2010. **88**(3): p. 241-247.
108. Se Lee, Y., et al., *Proteomic analysis of two head and neck cancer cell lines presenting different radiation sensitivity.* Acta oto-laryngologica, 2008. **128**(1): p. 86-92.
109. Mehlen, P., et al., *Intracellular reactive oxygen species as apparent modulators of heat-shock protein 27 (hsp27) structural organization and phosphorylation in basal and tumour necrosis factor α-treated T47D human carcinoma cells.* Biochemical Journal, 1995. **312**(2): p. 367-375.
110. Arrigo, A.-P., et al., *Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels.* Antioxidants & redox signaling, 2005. **7**(3-4): p. 414-422.
111. Moeller, B.J., et al., *Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules.* Cancer cell, 2004. **5**(5): p. 429-441.
112. Bisht, K.S., et al., *Geldanamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the in vitro and in vivo radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity.* Cancer research, 2003. **63**(24): p. 8984-8995.

113. Kim, W.-Y., et al., *Targeting heat shock protein 90 overrides the resistance of lung cancer cells by blocking radiation-induced stabilization of hypoxia-inducible factor-1α.* Cancer research, 2009. **69**(4): p. 1624-1632.
114. Hadchity, E., et al., *Heat shock protein 27 as a new therapeutic target for radiation sensitization of head and neck squamous cell carcinoma.* Mol Ther, 2009. **17**(8): p. 1387-94.
115. Bauer, R., et al., *Truncated P-cadherin is produced in oral squamous cell carcinoma.* Febs j, 2008. **275**(16): p. 4198-210.
116. Kleter, B., et al., *Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses.* The American journal of pathology, 1998. **153**(6): p. 1731-1739.
117. van Heijl, M., et al., *Neoadjuvant chemoradiation followed by surgery versus surgery alone for patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma of the esophagus (CROSS).* BMC surgery, 2008. **8**(1): p. 1.
118. Burdak-Rothkamm, S. and K.M. Prise, *New molecular targets in radiotherapy: DNA damage signalling and repair in targeted and non-targeted cells.* European journal of pharmacology, 2009. **625**(1): p. 151-155.
119. Fowler, J.F. and M.J. Lindstrom, *Loss of local control with prolongation in radiotherapy.* International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 1992. **23**(2): p. 457-467.
120. Harari, P.M. and T.J. Kinsella, *Advances in radiation therapy for head and neck cancer.* Current opinion in oncology, 1995. **7**(3): p. 248-254.
121. McGinn, C.J., et al., *Dose intensification in curative head and neck cancer radiotherapy—Linear quadratic analysis and preliminary assessment of clinical results.* International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 1993. **27**(2): p. 363-369.
122. Huang, S.-M., J.M. Bock, and P.M. Harari, *Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck.* Cancer research, 1999. **59**(8): p. 1935-1940.
123. Rai, N.P., et al., *Outcome of Palliative and Radical Radiotherapy in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma-a Retrospective Study.* Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 2014. **16**(16): p. 6919-6922.
124. Haikonen, J., et al., *Does skin fibroblast radiosensitivity predict squamous cancer cell radiosensitivity of the same individual?* International journal of cancer, 2003. **103**(6): p. 784-788.
125. Malaise, E., et al., *Initial slope of radiation survival curves is characteristic of the origin of primary and established cultures of human tumor cells and fibroblasts.* Radiation research, 1987. **111**(2): p. 319-333.
126. Dahlberg, W., et al., *Radiosensitivity in vitro of human soft tissue sarcoma cell lines and skin fibroblasts derived from the same patients.* International journal of radiation biology, 1993. **63**(2): p. 191-198.
127. Mackay, R.I. and J.H. Hendry, *The modelled benefits of individualizing radiotherapy patients' dose using cellular radiosensitivity assays with inherent variability.* Radiotherapy and oncology, 1999. **50**(1): p. 67-75.
128. Haubner, F., et al., *Effects of external radiation in a co-culture model of endothelial cells and adipose-derived stem cells.* Radiation Oncology, 2013. **8**(1): p. 1.

129. Liang, X., et al., *The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells.* Journal of radiation research, 2011. **52**(3): p. 380-386.
130. Suzuki, K., S. Kodama, and M. Watanabe, *Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells.* Cancer research, 2001. **61**(14): p. 5396-5401.
131. Kim, C.S., et al., *Low-dose of ionizing radiation enhances cell proliferation via transient ERK1/2 and p38 activation in normal human lung fibroblasts.* Journal of radiation research, 2007. **48**(5): p. 407-415.
132. Korystov, Y.N., et al., *The effect of low-dose irradiation on proliferation of mammalian cells in vitro.* Radiation research, 1996. **146**(3): p. 329-332.
133. Schmidt-Ullrich, R.K., et al., *Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation.* Oncogene, 1997. **15**(10): p. 1191-7.
134. Sofia Vala, I., et al., *Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis.* PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11222.
135. Bourhis, J., et al., *Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis.* The Lancet, 2006. **368**(9538): p. 843-854.
136. Withers, H., J. Taylor, and B. Maciejewski, *The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy.* Acta Oncologica, 1988. **27**(2): p. 131-146.
137. Fu, K.K., et al., *A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003.* International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 2000. **48**(1): p. 7-16.
138. Overgaard, J., et al., *Five compared with six fractions per week of conventional radiotherapy of squamous-cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6&7 randomised controlled trial.* The Lancet, 2003. **362**(9388): p. 933-940.
139. Maciejewski, B., et al., *Dose fractionation and regeneration in radiotherapy for cancer of the oral cavity and oropharynx: tumor dose-response and repopulation.* International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 1989. **16**(3): p. 831-843.
140. Zhou, L., R. Yuan, and S. Lanata, *Molecular mechanisms of irradiation-induced apoptosis.* Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2003. **8**: p. d9.
141. Roberg, K., et al., *Radiotherapy response in oral squamous carcinoma cell lines: evaluation of apoptotic proteins as prognostic factors.* Head & neck, 2007. **29**(4): p. 325-334.
142. Sakakura, C., et al., *Overexpression of bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis.* International journal of cancer, 1996. **67**(1): p. 101-105.
143. Verheij, M., *Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death.* Cancer and Metastasis Reviews, 2008. **27**(3): p. 471-480.
144. Sun, X., et al., *Selective induction of necrotic cell death in cancer cells by β-lapachone through activation of DNA damage response pathway.* Cell Cycle, 2006. **5**(17): p. 2029-2035.

145. Frame, F.M., et al., *Mechanisms of growth inhibition of primary prostate epithelial cells following gamma irradiation or photodynamic therapy include senescence, necrosis, and autophagy, but not apoptosis.* Cancer medicine, 2016. **5**(1): p. 61-73.
146. Rubner, Y., et al., *Fractionated radiotherapy is the main stimulus for the induction of cell death and of Hsp70 release of p53 mutated glioblastoma cell lines.* Radiation Oncology, 2014. **9**(1): p. 1.
147. Kim, K.W., et al., *Autophagy upregulation by inhibitors of caspase-3 and mTOR enhances radiotherapy in a mouse model of lung cancer.* Autophagy, 2008. **4**(5): p. 659-668.
148. Chen, Q., et al., *Apoptosis, necrosis, and autophagy in mouse intestinal damage after 15-Gy whole body irradiation.* Cell biochemistry and function, 2014. **32**(8): p. 647-656.
149. Roninson, I.B., E.V. Broude, and B.-D. Chang, *If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells.* Drug Resistance Updates, 2001. **4**(5): p. 303-313.
150. Sperandio, S., I. de Belle, and D.E. Bredesen, *An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14376-81.
151. Borner, C. and L. Monney, *Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine?* Cell Death Differ, 1999. **6**(6): p. 497-507.
152. Liu, T., B. Brouha, and D. Grossman, *Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells.* Oncogene, 2004. **23**(1): p. 39-48.
153. Lorenzo, H.K., et al., *Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death.* Cell death and differentiation, 1999. **6**(6): p. 516-524.
154. Cmielova, J., et al., *DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence.* Physiological Research, 2011. **60**(4): p. 667.
155. Langley, R., et al., *Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells.* British journal of cancer, 1997. **75**(5): p. 666.
156. Aldridge, D., M. Arends, and I. Radford, *Increasing the susceptibility of the rat 208F fibroblast cell line to radiation-induced apoptosis does not alter its clonogenic survival dose-response.* British journal of cancer, 1995. **71**(3): p. 571.
157. Pena, L.A., Z. Fuks, and R.N. Kolesnick, *Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency.* Cancer Research, 2000. **60**(2): p. 321-327.
158. Enns, L., et al., *Radiosensitivity in ataxia telangiectasia fibroblasts is not associated with deregulated apoptosis.* Radiation research, 1998. **150**(1): p. 11-16.
159. Dittmann, K., et al., *Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture.* Radiotherapy and Oncology, 1995. **34**(2): p. 137-143.
160. Gupta, K., et al., *VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling.* Experimental cell research, 1999. **247**(2): p. 495-504.
161. HIROSHIMESE, A.S., et al., *Prognostic significance of heat shock protein 27 (HSP27) in patients with oral squamous cell carcinoma.* Oncology reports, 2002. **9**: p. 341-344.
162. Deyhimi, P. and F. Azmoudeh, *HSP27 and HSP70 expression in squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study.* Dent Res J (Isfahan), 2012. **9**(2): p. 162-6.

163. Ferrarini, M., et al., *Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells.* International Journal of Cancer, 1992. **51**(4): p. 613-619.
164. MIYAKE, H., et al., *Enhanced expression of heat shock protein 27 following neoadjuvant hormonal therapy is associated with poor clinical outcome in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer.* Anticancer research, 2006. **26**(2B): p. 1583-1587.
165. Thanner, F., et al., *Heat shock protein 27 is associated with decreased survival in node-negative breast cancer patients.* Anticancer research, 2005. **25**(3A): p. 1649-1653.
166. Kapranos, N., et al., *Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance.* Journal of cancer research and clinical oncology, 2002. **128**(8): p. 426-432.
167. Lebret, T., et al., *Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90.* Cancer, 2003. **98**(5): p. 970-977.
168. FENG, X.-p., Z.-C. CHEN, and Z.-q. XIAO, *Radiation induced HSPs overexpression in nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1 [J].* Chinese Journal of Otorhinolaryngology-skull Base Surgery, 2005. **2**: p. 004.
169. Lee, Y.S., et al., *Proteomic analysis of two head and neck cancer cell lines presenting different radiation sensitivity.* Acta Otolaryngol, 2008. **128**(1): p. 86-92.
170. Milliat, F., et al., *Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages.* The American journal of pathology, 2006. **169**(4): p. 1484-1495.
171. Zanini, C., et al., *Proteomic profile modification of anaplastic medulloblastoma after in-vivo radiotherapy: a case study.* Journal of Cancer Therapy, 2010. **1**(02): p. 97.
172. Moens, U. and S. Kostenko, *Hsp27 Phosphorylation Patterns and Cellular Consequences*, in *Cellular Trafficking of Cell Stress Proteins in Health and Disease*. 2012, Springer. p. 43-74.
173. Bruey, J.-M., et al., *Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c.* Nature cell biology, 2000. **2**(9): p. 645-652.
174. GARRIDO, C., et al., *HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9.* The FASEB Journal, 1999. **13**(14): p. 2061-2070.
175. Pandey, P., et al., *Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3.* Oncogene, 2000. **19**(16): p. 1975-1981.
176. Teimourian, S., et al., *Down-regulation of Hsp27 radiosensitizes human prostate cancer cells.* International journal of urology, 2006. **13**(9): p. 1221-1225.
177. Konishi, H., et al., *Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27.* FEBS letters, 1997. **410**(2-3): p. 493-498.
178. Li, R., et al., *Phosphorylation of AKT induced by phosphorylated Hsp27 confers the apoptosis-resistance in t-AUCB-treated glioblastoma cells in vitro.* Journal of neuro-oncology, 2015. **121**(1): p. 83-89.
179. Bussink, J., A.J. van der Kogel, and J.H. Kaanders, *Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer.* The lancet oncology, 2008. **9**(3): p. 288-296.
180. Chen, H.F., S.J. Liu, and G. Chen, *Heat shock protein 27 phosphorylation in the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose through the phosphoinositide 3‐kinase/Akt and extracellular*

signal‐regulated kinase 1/2 pathways. Molecular medicine reports, 2015. **11**(2): p. 1504-1508.
181. Guttmann, D.M., et al., *Inhibition of Hsp27 radiosensitizes head-and-neck cancer by modulating deoxyribonucleic acid repair.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. **87**(1): p. 168-75.
182. Mori, E.T., Akihisa, Ohnishi Takeo, *The biology of heat-induced DNA double-strand breaks.* Thermal Medicine, 2008. **24**(2): p. 39-50.
183. Guay, J., et al., *Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27.* Journal of cell science, 1997. **110**(3): p. 357-368.
184. Hirano, S., R.S. Rees, and R.R. Gilmont, *MAP kinase pathways involving hsp27 regulate fibroblast-mediated wound contraction.* Journal of Surgical Research, 2002. **102**(2): p. 77-84.
185. Golembieski, W.A., et al., *HSP27 mediates SPARC-induced changes in glioma morphology, migration, and invasion.* Glia, 2008. **56**(10): p. 1061-1075.
186. López, L.A., F.E. Gago, and O. Tello, *Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples.* Cancer detection and prevention, 1997. **21**(5): p. 441-451.
187. Nanbu, K., et al., *Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas.* Cancer detection and prevention, 1997. **22**(6): p. 549-555.
188. COSTA, M.J.M., et al., *Expression of heat shock protein 70 and P53 in human lung cancer.* Oncology reports, 1997. **4**(5): p. 1113-1116.
189. Jäättelä, M., *Escaping cell death: survival proteins in cancer.* Experimental cell research, 1999. **248**(1): p. 30-43.
190. Ciocca, D.R., et al., *Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications.* Journal of the National Cancer Institute, 1993. **85**(7): p. 570-574.
191. Kaur, J., A. Srivastava, and R. Ralhan, *Expression of 70-kDa heat shock protein in oral lesions: marker of biological stress or pathogenicity.* Oral oncology, 1998. **34**(6): p. 496-501.
192. Gehrmann, M., et al., *The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells.* Cell Stress and Chaperones, 2008. **13**(1): p. 1-10.
193. Sierra-Rivera, E., G.J. Voorhees, and M.L. Freeman, *Gamma irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells.* Radiation research, 1993. **135**(1): p. 40-45.
194. Kleinjung, T., et al., *Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy—a target for natural killer (NK) cells.* International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 2003. **57**(3): p. 820-826.
195. Tavassol, F., et al., *Effect of neoadjuvant chemoradiation and postoperative radiotherapy on expression of heat shock protein 70 (HSP70) in head and neck vessels.* Radiation Oncology, 2011. **6**(1): p. 1.
196. Lanneau, D., et al., *Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27.* Prion, 2007. **1**(1): p. 53-60.
197. Wang, X., et al., *HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review).* Int J Oncol, 2014. **45**(1): p. 18-30.
198. Ravagnan, L., et al., *Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor.* Nature cell biology, 2001. **3**(9): p. 839-843.

199. Gurbuxani, S., et al., *Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor.* Oncogene, 2003. **22**(43): p. 6669-6678.
200. Kalinowska, M., et al., *Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP.* Apoptosis, 2005. **10**(4): p. 821-830.
201. Yang, X., et al., *Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells.* Cancer letters, 2012. **321**(2): p. 137-143.
202. Stankiewicz, A.R., et al., *Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(46): p. 38729-38739.
203. Gibbons, N., et al., *Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis.* The Prostate, 2000. **45**(1): p. 58-65.
204. Gao, T. and A.C. Newton, *The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(35): p. 31585-31592.
205. Wei, Y.-q., et al., *Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells.* Cancer Immunology, Immunotherapy, 1995. **40**(2): p. 73-78.
206. Zhao, Z.G., Q.Z. Ma, and C.X. Xu, *Abrogation of heat-shock protein (HSP)70 expression induced cell growth inhibition and apoptosis in human androgen-independent prostate cancer cell line PC-3m.* Asian J Androl, 2004. **6**(4): p. 319-24.
207. Kaur, J., J. Kaur, and R. Ralhan, *Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells.* Int J Cancer, 2000. **85**(1): p. 1-5.
208. Gyrd-Hansen, M., J. Nylandsted, and M. Jäättelä, *Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity.* Cell Cycle, 2004. **3**(12): p. 1484-1485.
209. Nylandsted, J., et al., *Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization.* The Journal of experimental medicine, 2004. **200**(4): p. 425-435.

8. Anhang

8.1 Verzeichnis der Abkürzungen

%. *Prozent*

°C. Grad celsius

17-DMAG. *17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin*

Abb.. *Abbildung*
ABD. *ATPase domain*
ADP. *Adenosindiphosphat*
AIF. *apoptosis inducing factor*
AJCC. *American Joint Committee on Cancer*
Ak. *Antikörper*
Akt. *Proteinkinase B*
ATP. *Adenosintriphosphat*

bFGF. *basic fibroblast growth factor*
BiP. *binding Protein*
bp. *Basenpaare*
BrdU. *5-bromo-2´-deoxyuridine*
BSA. *Bovine serum albumin*

CIS. *Carcinoma in situ*
cm. *Zentimeter*
CO_2. *Kohlenstoffdioxid*

Daxx. *death domain associated protein*
DNA. *Desoxyribonukleinsäure*

EGF. *epidermal growth factor*
EGFR. *epidermal growth factor receptor*
ELISA. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EndoG. *Endonuklease G*
ERK. *extracellular-signal-regulatet kinases*
et al.. *und andere*

FGF. *fibroblast growth factor*

g. *Gramm*
ggf.. *gegebenenfalls*
Gy. *Gray*

h. *Stunde*
H_2SO_4. *Schwefelsäure*
HDMEC. *humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen*
HIF-1α. *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*
HNSCC. *head and neck squamous cell carcinoma*
HPV. *humane Papillomviren*
HSFs. *heat shock transcription factors*
HSP. *Hitzeschockproteine*

IFN- γ. *Interferon-γ*
IL-1ß. *Interleukin-1ß*
IL-6. *Interleukin-6*
IL-8. *Interleukin-8*

kDa. *kilo Dalton*

M. *molare Masse*
MAPKAP. *MAP kinase-activated protein kinase*
min. *Minute*
ml. *Milliliter*
MMP. *Matrixmetalloproteinasen*

n. *Anzahl unabhängiger Versuche*
NHF. *normale dermale Fibroblasten*
nm. *Nanometer*

OSCC. *oral squamous cell carcinoma*

p. *p-value*
PBD. *peptide-binding domain*
PBS. *phosphate buffered saline*
PCR. *Polymerasekettenreaktion*
PDGF. *platelet-derived growth factor*
PDT. *Photodynamische Therapie*
pg. *Pikogramm*
Phospho-HSP27. *phosphoryliertes HSP27*
PI3K. *Phosphoinositid-3-Kinase*
pRb. *Retinoblastom-Protein*
PVL. *proliferative verruköse Leukoplakie*

ROS. *reaktive Sauerstoffspezies*
rpm. *rounds per minute*
RT. *Raumtemperatur*

TGF-ß. *transforming growth factor ß*
TIMP. *tissue inhibitor of metalloproteinases*
TNF-α. *tumor necrosis factor-α*
TNM. *Tumor-Nodus-Metastasen*
TNS. *trypsin neutralizing solution*

UICC. *Union Internationale Contre le Cancer*
UV. *Ultravioletttstrahlung*

VEGF. *vascular endothelial growth factor*

WHO. *World Health Organisation*
z.B.. *zum Beispiel*
µl. *Mikroliter*

8.2 Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Frank Haubner für die Möglichkeit an der Klinik für Hals-Nasen-und-Ohrenheilkunde der Universität Regensburg zu promovieren. Vielen Dank für die interessante Themenstellung, das tolle Laborteam, das Sie mir zur Seite gestellt haben und Ihre konstruktiven Ratschläge während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dominique und Petra bedanken, für die große Hilfe bei den Laborarbeiten und die ausgezeichnete Betreuung während des gesamten Entstehungsprozesses sowie das große Maß an Geduld. Ohne euch wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank!

Danke auch an meine Familie und Freunde, die mich die zu jeder Zeit unterstützt haben!

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vorname, Name:	Fabian Geyer
Geburtsdatum, -ort:	10.02.1993, Bayreuth
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Werdegang

Schulausbildung:

1999-2003	Grundschule Fichtelberg
2003-2011	Luisenburg-Gymnasium Wunsiedel
Schulabschluss:	Abitur

Hochschulausbildung:

April 2012	Beginn des Zahnmedizin-Studiums an der Universität Regensburg
April 2013	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
Oktober 2014	Zahnärztliche Vorprüfung
Juli 2017	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)